МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН»
(Институт полиомиелита)

На правах рукописи

ТРАЧУК
Кирилл Николаевич

ОНКОЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ КОМБИНАЦИИ ШТАММА 17D ВИРУСА ЖЕЛТОЙ ЛИХОРАДКИ С РУКСОЛИТИНИБОМ НА МОДЕЛЯХ РАКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

1.5.10. Вирусология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Колясникова Надежда Михайловна

Москва – 2026

Оглавление

Введение 6

Глава 1. Обзор литературы 16

1.1 Рак поджелудочной железы и обоснование онколитической терапии 16

1.1.1 Эпидемиология, прогноз и причины высокой летальности рака поджелудочной железы 16

1.1.2 Краткая характеристика молекулярных особенностей рака поджелудочной железы 17

1.1.3 Современные подходы к лечению рака поджелудочной железы и их ограничения 19

1.1.4 Онколитическая вирусная терапия как перспективное направление при раке поджелудочной железы 22

1.2 Онколитические вирусы при раке поджелудочной железы 23

1.2.1 Основные онколитические вирусы, использованные при раке поджелудочной железы в доклинических и клинических испытаниях 23

1.2.2 Механизмы противоопухолевого действия онколитических вирусов 26

1.2.3 Комбинированные схемы онколитической терапии при раке поджелудочной железы 27

1.3 Вакцинный штамм 17D вируса желтой лихорадки и роль JAK/STAT-сигналинга 29

1.3.1 Вакцинный штамм 17D вируса желтой лихорадки: биологические свойства, безопасность, иммуногенность 29

1.3.2 Онколитический потенциал вакцинного штамма 17D вируса желтой лихорадки 30

1.3.3 Молекулярные особенности клеточных линий рака поджелудочной железы, определяющие вирусную пермиссивность 33

1.4 Ингибитор JAK1/2 руксолитиниб и обоснование комбинации с вакцинным штаммом 17D вируса желтой лихорадки при раке поджелудочной железы .. 38

1.4.1 Руксолитиниб: мишени, основные эффекты, опыт применения в онкологии 38

1.4.2 Комбинация JAK-ингибиторов с онколитическими вирусами 40

Глава 2. Материалы и методы 43

2.1 Материалы, использованные в работе 43

2.1.1 Питательные среды 44

2.1.2 Клеточные линии 44

2.1.3 Вирусы 45

2.1.4 Лабораторные животные 45

2.2 Культивирование клеточных линий и вирусов 45

2.2.1 Хранение и культивирование клеточных линий 45

2.2.2 Хранение и культивирование вирусов 46

2.2.3 Титрование вируса методом бляшкообразующих единиц 46

2.3 Определение чувствительности клеточных линий к вирусам 47

2.3.1 Оценка жизнеспособности клеток по цитопатогенному действию 47

2.3.2 Оценка репликативной активности вируса желтой лихорадки в клеточных линиях рака поджелудочной железы 48

2.3.3 Качественная оценка апоптоза 49

2.3.4 Микроскопия 50

2.3.5 Определение инфекционных частиц вируса желтой лихорадки в гомогенатах из опухоли, мозга и селезенки мышей 50

2.4 Определение РНК вирусов методом ПЦР в режиме реального времени.. 50

2.4.1 Сбор и хранение материалов для ПЦР 51

2.4.2 Выделение РНК / получение кДНК 51

2.4.3 Определение РНК вируса желтой лихорадки методом ПЦР в режиме реального времени 51

2.5 Определение противоопухолевой активности комбинации штамма 17D вируса желтой лихорадки с руксолитинибом на сингенной модели Pan02.... 52

2.5.1 Формирование сингенной модели Pan02 в мышах C57BL/6..... 52

2.5.2 Терапия руксолитинибом 53

2.5.3 Виротерапия опухолей Pan02 штаммом 17D вируса желтой лихорадки 53

2.6 Исследование опухолей и крови мышей 54

2.6.1 Реакция нейтрализации 54

2.6.2 Исследования уровня цитокинов в опухолях Pan02 и крови мышей методом иммуноферментного анализа 55

2.6.3 Морфологический и иммуногистохимический анализ опухолей..... 56

2.7 Статистический анализ..... 58

Глава 3. Результаты и их обсуждение..... 59

3.1 Оценка онколитического действия комбинации штамма 17D вируса желтой лихорадки с руксолитинибом на панели клеточных линий рака поджелудочной железы 59

3.1.1 Оценка влияния руксолитиниба на репликативную активность и цитопатическое действие штамма 17D вируса желтой лихорадки на панели клеточных линий рака поджелудочной железы..... 61

3.1.2 Определение оптимальной концентрации руксолитиниба, обеспечивающей усиление репликации штамма 17D вируса желтой

лихорадки в резистентных клеточных линиях рака поджелудочной железы 79

3.2 Оценка онколитического действия комбинации штамма 17D вируса желтой лихорадки с руксолитинибом на сингенной мышиной модели рака поджелудочной железы Pan02 84

3.2.1 Оценка противоопухолевой эффективности: динамика объема опухолей и анализ выживаемости 84

3.2.2 Результаты иммуноферментного анализа цитокинового профиля (IFN-α, TNF-α, IL-12) 90

3.2.3 Оценка безопасности комбинированной схемы терапии 95

3.2.4 Оценка количества нейтрализующих антител к вирусу желтой лихорадки в крови мышей 96

3.2.5 Морфологическая оценка опухолевой ткани 98

3.2.6 Оценка иммунного ответа методом иммуногистохимического анализа 102

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 112

ВЫВОДЫ 115

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ 116

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ 117

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 118

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 123

Введение

Актуальность темы исследования

Рак поджелудочной железы (РПЖ) относится к числу наиболее летальных злокачественных новообразований человека. По данным глобального анализа бремени болезней, в 2021 году в мире было зарегистрировано около 508 тысяч новых случаев РПЖ и около 505 тысяч смертей от РПЖ, что отражает практически полное совпадение показателей заболеваемости и смертности [1]. В странах с высоким уровнем дохода РПЖ входит в тройку ведущих причин онкологической смертности и, по прогнозам, к 2030 году может занять второе место в этом списке [2]. Пятилетняя относительная выживаемость при протоковой аденокарциноме поджелудочной железы, наиболее распространенной гистологической форме РПЖ, составляет около 8%, а при метастатическом процессе не превышает 3% [3]. Более чем у 80% пациентов устанавливают диагноз уже на стадии местнораспространенного нерезектабельного или метастатического заболевания, что практически исключает возможность радикального лечения [4]. В Российской Федерации ситуация не менее тяжелая: РПЖ составляет около 3% от общего числа онкологических заболеваний, однолетняя летальность достигает 78–84%, а доля пациентов с III–IV стадией при первичной постановке диагноза превышает 79,5% [5–7]. Медиана общей выживаемости в российских популяционных когортах составляет 6,7–10 месяцев, что сравнимо с показателями других стран, например Казахстана [6,8]. Существующие стандарты лечения позволяют достигнуть медианы общей выживаемости лишь 11–13 месяцев.

Онколитическая вирусная терапия рассматривается как одно из перспективных направлений лечения РПЖ. Онколитические вирусы (ОВ) способны селективно реплицироваться в опухолевых клетках, индуцировать иммуногенную клеточную гибель, ремоделировать иммуносупрессивное микроокружение и запускать системный противоопухолевый иммунный ответ [9]. Но главным их преимуществом перед традиционными методами лечения, такими как химиотерапия и лучевая терапия, является отсутствие перекрестной

резистентности [10]. Особый интерес представляет вакцинный штамм 17D вируса желтой лихорадки (ВЖЛ 17D), широко применяемый в качестве живой аттенуированной вакцины с надежным профилем безопасности (более 400 миллионов вакцинированных людей) [11]. Сочетание прямого онколитического действия на клетки РПЖ человека *in vitro* и мощного иммуномодулирующего потенциала, опосредуемого $CD8^+$ (cluster of differentiation 8, кластер 8 дифференцировки Т-лимфоцитов) Т-лимфоцитами, делает ВЖЛ 17D перспективным агентом для иммунотерапии [12].

Вместе с тем ключевым молекулярным барьером для репликации ВЖЛ 17D и других онколитических вирусов в опухолевых клетках служит сигнальный путь JAK/STAT (janus kinase, янус-киназа / signal transducer and activator of transcription, белок передатчик сигнала и активатор транскрипции), активирующий экспрессию интерферон-стимулируемых генов (interferon-stimulated genes, ISG) [13]. Белок NS5 (non-structural 5) ВЖЛ 17D путем взаимодействия с человеческим белком STAT2 (hSTAT2) блокирует функцию ISGF3 (interferon-stimulated gene factor 3, стимулируемый генами интерферона фактор 3), главного белкового комплекса, который запускает противовирусный иммунный ответ клетки [14]. Однако базальная гиперактивация STAT1/STAT2/ISG-каскада, характерная для ряда клеточных линий РПЖ с высокой экспрессией ISG, сохраняет остаточный противовирусный барьер, снижающий репликативную активность вируса и ограничивающий его терапевтический эффект.

Руксолитиниб является первым одобренным FDA (Food and Drug Administration USA, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) и Министерством здравоохранения Российской Федерации пероральным селективным ингибитором JAK1/2-киназ (janus kinase 1/2, янус-киназа 1/2 типа), который способен снижать активность ISG-каскада в опухолевых клетках, тем самым временно создавая благоприятные условия для более эффективной репликации ВЖЛ 17D [15]. В доклинических моделях показано, что комбинация JAK1/2-ингибиторов с различными онколитическими вирусами (вирус везикулярного стоматита, вирус простого герпеса) преодолевает

резистентность опухолевых клеток к виротерапии без значимого угнетения противоопухолевого иммунного ответа [13,16]. Таким образом, исследование противоопухолевого эффекта комбинации ВЖЛ 17D с руксолитинибом на моделях РПЖ представляет собой актуальную научную задачу.

Степень разработанности темы исследования

В последние годы уделяется значительное внимание использованию онколитических вирусов не только как прямых цитолитических агентов, но и как инструментов для ремоделирования опухолевого микроокружения и индукции системного противоопухолевого иммунного ответа, в том числе в отношении РПЖ [17]. Показано, что внутриопухолевое введение онколитических вирусов способно усиливать инфильтрацию опухоли $CD8^+$ Т-лимфоцитами, снижать относительное содержание регуляторных Т-клеток и повышать экспрессию молекул, участвующих в презентации опухолевых антигенов, что создает предпосылки для сочетания онколитической терапии с иными видами иммунотерапии [18]. Вместе с тем вопрос оптимального выбора вирусной платформы и способов ее комбинации с таргетными и иммунотерапевтическими препаратами для РПЖ остается открытым.

Отдельное направление исследований связано с применением вакцинного штамма ВЖЛ 17D в качестве онколитического и иммуномодулирующего агента. Показано, что ВЖЛ 17D способен реплицироваться и вызывать гибель различных мышиных и человеческих опухолевых клеточных линий *in vitro*, практически не поражая нормальные клетки, а его внутриопухолевое введение приводит к замедлению роста трансплантируемых опухолей и формированию системного CD8-зависимого противоопухолевого ответа [12]. Недавно было продемонстрировано, что в сингенной модели РПЖ у мышей внутриопухолевое введение вакцинного штамма ВЖЛ 17D приводит к задержке роста опухоли и увеличению медианы выживаемости, однако эффект был ограничен противовирусным иммунным ответом [19].

Параллельно развивается направление комбинированной онколитической виротерапии, в рамках которого вирусные платформы сочетают с химиопрепаратами, иммунотерапевтическими препаратами и ингибиторами сигнальных путей, включая JAK/STAT [20]. Показано, что сохранный или гиперактивный интерферон-зависимый каскад JAK/STAT в опухолевых клетках может ограничивать репликацию онколитических вирусов и их цитолитическую активность, формируя один из ключевых механизмов резистентности к онколитической терапии [21]. В ряде экспериментальных работ продемонстрировано, что применение ингибитора JAK1/2 руксолитиниба в комбинации с онколитическими вирусами, в том числе модифицированным вирусом везикулярного стоматита и вирусом простого герпеса, усиливает репликацию вируса и цитотоксический эффект в резистентных опухолевых клеточных линиях, что сопровождается подавлением фосфорилирования белка STAT1 и в ряде случаев приводит к повышению выживаемости на иммунокомпетентных моделях животных [13,16]. При этом в большинстве случаев данные получены на моделях немелкоклеточного рака легкого, лимфом и других солидных опухолей, тогда как для РПЖ опыт сочетания ОВ с JAK-ингибиторами ограничен отдельными экспериментальными работами и не носит системного характера.

Таким образом, к настоящему времени доказана перспективность онколитической терапии РПЖ и накоплен значительный объем данных по использованию различных вирусных платформ, включая вакцинный штамм ВЖЛ 17D. В то же время комбинированное применение ВЖЛ 17D с ингибитором JAK1/2-киназ руксолитинибом при РПЖ практически не изучено: отсутствуют данные о диапазоне эффективных концентраций руксолитиниба для усиления репликации штамма ВЖЛ 17D в различных линиях РПЖ, о влиянии JAK/STAT-ингибирования на интерферон-зависимые сигнальные пути в этих моделях, а также о роли врожденного и адаптивного иммунного ответа в реализации противоопухолевого действия такой комбинации. Недостаточно

изучены вопросы безопасности и тканевого тропизма вакцинного штамма ВЖЛ 17D в условиях комбинированного применения с JAK1/2-ингибитором.

Перечисленные обстоятельства свидетельствуют о том, что проблема оптимизации онколитической терапии РПЖ путем комбинированного использования вакцинного штамма ВЖЛ 17D и ингибитора JAK1/2-киназ руксолитиниба находится на стадии активного развития и требует дальнейшей комплексной экспериментальной разработки на клеточных и животных моделях.

Целью работы явилось исследование онколитического потенциала комбинации вакцинного штамма 17D вируса желтой лихорадки с ингибитором JAK1/2-киназ руксолитинибом на моделях рака поджелудочной железы *in vitro* и *in vivo*.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать репликативную активность и цитопатическое действие вируса желтой лихорадки (штамм 17D) в комбинации с ингибитором JAK1/2-киназ руксолитинибом на панели клеточных линий рака поджелудочной железы.

2. Определить диапазон концентраций ингибитора JAK1/2-киназ руксолитиниба, обеспечивающих эффективную репликацию вируса желтой лихорадки (штамм 17D) в резистентных к нему клеточных линиях рака поджелудочной железы.

3. Оценить противоопухолевую эффективность комбинированной терапии вирусом желтой лихорадки (штамм 17D) с руксолитинибом на сингенной мышиной модели рака поджелудочной железы.

4. Исследовать влияние комбинированной терапии вирусом желтой лихорадки (штамм 17D) с руксолитинибом на формирование адаптивного иммунного ответа на сингенной мышиной модели рака поджелудочной железы.

Научная новизна

Впервые проведена комплексная оценка онколитического потенциала вакцинного штамма ВЖЛ 17D в сочетании с ингибитором JAK1/2-киназ руксолитинибом на панели клеточных линий РПЖ, что позволило выделить

несколько типов опухолевого ответа, различающихся по репликативной активности вируса и выраженности цитопатического эффекта.

Впервые для моделей РПЖ определен диапазон концентраций руксолитиниба, обеспечивающих эффективную репликацию ВЖЛ 17D, с учетом дозозависимых характеристик воздействия.

Впервые получены данные о противоопухолевом и иммуномодулирующем действии комбинации вакцинного штамма ВЖЛ 17D и руксолитиниба на сингенной модели РПЖ, включая вклад иммунного ответа, а также данные о тканевом тропизме и элиминации вируса в условиях комбинированной терапии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные экспериментальные данные на *in vitro* и *in vivo* моделях обосновывают потенциал применения вакцинного штамма ВЖЛ 17D в качестве компонента комбинированной онколитической терапии РПЖ в сочетании с ингибитором JAK1/2-киназ руксолитинибом.

Предложены возможные молекулярные и клеточные маркеры чувствительности опухолевых клеток РПЖ для комбинированной терапии ВЖЛ 17D с руксолитинибом, которые могут быть использованы для стратификации пациентов и индивидуализации подходов к онколитической виротерапии.

Разработана схема применения руксолитиниба, позволяющая усилить онколитическую активность штамма ВЖЛ 17D при сохранении безопасности в *in vivo* моделях, что может быть использовано при планировании дальнейших доклинических и клинических исследований.

Полученные сведения о характере противоопухолевого иммунного ответа и особенностях распределения и элиминации вируса в организме животного создают основу для оптимизации схем введения онколитического вируса и мониторинга безопасности при разработке новых терапевтических стратегий в клинической практике.

Методология и методы исследования

В диссертационной работе использовался комплекс современных вирусологических, молекулярно-биологических, иммунологических и

гистологических методов, обеспечивающих решение поставленных задач. Для *in vitro* оценки репликативной активности ВЖЛ 17D использовались методы количественного определения инфекционного титра (метод бляшкообразования) и количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией – для выявления и определения концентраций вирусной РНК. Цитопатическое действие моно- и комбинированной терапии (ВЖЛ 17D и ингибитора JAK1/2-киназ руксолитиниба) анализировали с помощью визуальной оценки жизнеспособности клеток, а также методов регистрации динамики клеточного роста и цитопатического эффекта в реальном времени. Исследования *in vivo* проводились на сингенной мышиной модели рака поджелудочной железы Pan02. Противоопухолевый эффект монотерапии ВЖЛ 17D и комбинированной терапии с руксолитинибом оценивался по динамике роста опухолей, времени дожития животных до гуманной конечной точки и гистологическим критериям. Для анализа системного и локального иммунного ответа определялись концентрации ключевых цитокинов (интерферон альфа (IFNa), фактор некроза опухоли альфа (TNFa), интерлейкин 12 (IL-12)) в сыворотке крови и опухолевой ткани методом иммуноферментного анализа. Характеристика опухолевого инфильтрата осуществлялась с использованием методов световой микроскопии и иммуногистохимического окрашивания с применением антител к основным популяциям иммунных клеток. Для оценки безопасности и тканевого тропизма вакцинного штамма ВЖЛ 17D при комбинированной терапии проводились исследования органов-мишеней (включая селезенку и головной мозг) методами вирусологического и молекулярно-генетического анализа на наличие вируса. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием общепринятых методов вариационной статистики с применением специализированного программного обеспечения Prism 8 (GraphPad Prism Software, США).

Положения, выносимые на защиту

1. Комбинированное воздействие вируса желтой лихорадки (штамм 17D) с ингибитором JAK1/2-киназ руксолитинибом *in vitro* приводит к усилению

цитопатического действия вируса в клеточных линиях рака поджелудочной железы мыши Pan02, человека PANC-1 и повышению его репликативной активности в клеточных линиях рака поджелудочной железы мыши Pan02, человека: PANC-1, Capan-2, AsPC-1, BxPC-3.

2. Ингибитор JAK1/2-киназ руксолитиниб в диапазоне концентраций 0,1-5 мкМ дозозависимо усиливает репликацию вируса желтой лихорадки (штамм 17D) в резистентных клеточных линиях рака поджелудочной железы Capan-2, AsPC-1, BxPC-3.

3. Внутриопухолевое введение вируса желтой лихорадки (штамм 17D) в сочетании с внутрибрюшинным введением ингибитора JAK1/2-киназ руксолитиниба увеличивает выживаемость животных и ингибирует рост опухолей в мышиной сингенной модели рака поджелудочной железы Pan02 по сравнению с группой монотерапии вирусом желтой лихорадки (штамм 17D) и контрольными группами.

4. Комбинация внутриопухолевого введения вируса желтой лихорадки (штамм 17D) с внутрибрюшинным введением руксолитиниба в мышиной сингенной модели рака поджелудочной железы Pan02 индуцирует адаптивный иммунный ответ, сопровождающийся увеличением инфильтрации опухоли CD3+ и CD8+ Т-лимфоцитами и ее регрессией.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается проведением достаточного числа исследований с применением разных подходов, включающих молекулярно-биологические, вирусологические, гистологические методы, при этом полученные данные были обработаны статистическими методами. Результаты данной работы были продемонстрированы и обсуждены на следующих конференциях:

1. Конференция молодых ученых и специалистов Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (Москва, 2023, 2024).

2. Саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус.Биотех 2025», «Сириус.Биотех 2026» (Сочи, 2025, 2026).

3. Научно-практическая конференция «Генетика 2025», Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН (ИОГен) (Москва, 2025).

4. Всероссийская конференция с международным участием «Инженерная биология и биофармацевтика», приуроченная к 100-летию со дня рождения академика Д. Г. Кнорре (Новосибирск, 2026).

5. Всероссийская конференция с международным участием «X Молодежная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии ИНЦ РАН» (Санкт-Петербург, 2026).

Личное участие автора

В рамках подготовительного этапа диссертантом был осуществлен самостоятельный всесторонний анализ актуальных научных публикаций, включая как отечественные, так и зарубежные источники. Автор принимал непосредственное участие в реализации всех экспериментальных исследований и самостоятельно произвел анализ полученных данных. Все результаты исследований, представленных в работе, изложены и интерпретированы лично автором. Все научные статьи и презентационные материалы были либо разработаны непосредственно автором, либо созданы при его активном участии в процессе их подготовки.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 6, 7 и 11 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

Публикации по теме исследования

По теме диссертационного исследования опубликовано 4 научные работы (3 – исследовательских статьи и 1 – научный обзор), из них 2 – в журнале из перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК для публикаций научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, индексируемом в международных базах цитирования Scopus и RSCI; 2 – в

международных журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, приравненных к журналам, рекомендованным ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 139 страницах и включает введение, главы обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, который включает 130 источников. Работа содержит 28 рисунков и 4 таблицы.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Рак поджелудочной железы и обоснование онколитической терапии

1.1.1 Эпидемиология, прогноз и причины высокой летальности рака поджелудочной железы

РПЖ относится к числу наиболее агрессивных злокачественных новообразований и характеризуется высокой заболеваемостью при стабильно низкой выживаемости пациентов. Согласно данным исследования Глобального Бремени Болезней (Global Burden of Disease), в 2021 году в мире зарегистрировано около 508 тысяч новых случаев РПЖ и 505 тысяч смертей от РПЖ, что отражает практически равное отношение заболеваемости и смертности [1]. В странах с высоким уровнем дохода РПЖ входит в тройку основных причин смерти от онкологических заболеваний и, согласно прогнозам, к 2030 году может выйти на второе место [2].

Пятилетняя относительная выживаемость при РПЖ остается крайне низкой и составляет порядка 11–13% для всех стадий совокупно [22,23]. Для наиболее часто встречающейся формы РПЖ – протоковой аденокарциномы поджелудочной железы – пятилетняя выживаемость оценивается примерно в 8%, а при метастатической стадии составляет около 3% [3]. Более 80% пациентов на момент установления диагноза имеют местно распространенную нерезектабельную или метастатическую форму заболевания, что практически исключает возможность радикального хирургического вмешательства [4].

В Российской Федерации РПЖ (2С10 по международной классификации болезней 11-го пересмотра) составляет около 3% от общего числа онкологических заболеваний и относится к числу наиболее летальных солидных новообразований [5]. По данным национальных исследований, возраст-стандартизованный показатель заболеваемости РПЖ в Российской Федерации составляет примерно 8,6 на 100 000 населения (в Москве — около 11,4 на 100 000), причем за последние

десятилетия отмечен более чем четырехкратный рост заболеваемости [6]. Для Российской Федерации также характерно крайне неблагоприятное соотношение заболеваемости и смертности: число ежегодно регистрируемых смертей от РПЖ практически равно или превышает число новых случаев, однолетняя летальность достигает 78–84% [5–7]. При этом доля пациентов с III–IV стадией в России составляет около 79,5%, тогда как ранние стадии (I–II) выявляются менее чем у 15% больных, а стадия IV диагностируется почти у 60% пациентов [6].

Анализ выживаемости в российских популяционных когортах показывает медиану общей выживаемости порядка 6,7–10 месяцев и пятилетнюю выживаемость около 6–11%, что сопоставимо с мировыми показателями [6,8]. Большинство пациентов, особенно с нерезектабельными и метастатическими формами РПЖ, умирают в течение первых 3–12 месяцев после постановки диагноза [6]. Таким образом, для Российской Федерации так же, как и для других стран с высокой заболеваемостью РПЖ, характерны очень высокая смертность в течение первого года после постановки диагноза и ограниченные возможности радикального лечения, что усиливает значимость поиска новых терапевтических подходов.

Столь неблагоприятная эпидемиологическая картина в мире и в Российской Федерации обусловлена сочетанием нескольких факторов: поздней диагностики (отсутствие специфических ранних симптомов и эффективного раннего скрининга), анатомической «скрытости» поджелудочной железы, агрессивного биологического поведения РПЖ (ранняя перинейральная и сосудистая инвазия, быстрое метастазирование), выраженной лекарственной резистентности и особенностей опухолевого микроокружения [24,25]. Все это подчеркивает актуальность разработки новых биологически ориентированных подходов к терапии.

1.1.2 Краткая характеристика молекулярных особенностей рака поджелудочной железы

Геномный профиль РПЖ относительно консервативен и характеризуется драйверными мутациями основных генов-супрессоров опухолей TP53 (tumor protein p53, белок-супрессор опухолей p53), CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, ингибитор циклинзависимой киназы 2A), SMAD4 (SMAD family member 4, белок 4 типа семейства SMAD), и онкогена KRAS (Kirsten rat sarcoma, белок крысиной саркомы Кирстен) [26]. Активирующие мутации гена KRAS (преимущественно G12D, G12V, G12R, G12C) выявляются в 88–95% случаев РПЖ и представляют собой раннее и почти обязательное событие панкреатического канцерогенеза [26,27]. Потеря функции гена TP53 отмечается примерно в 60–77% опухолей и ассоциируется с сокращением общей выживаемости, особенно у пациентов с локализованным РПЖ [28]. Изменения гена CDKN2A (точечные мутации, делеции, гиперметилирование) регистрируются в 30-40% случаев, а инактивирующие изменения гена SMAD4 наблюдаются в 17–32% случаев РПЖ [26,29]. Накопление этих драйверных нарушений генов (KRAS, CDKN2A, TP53, SMAD4) коррелирует с ухудшением общей выживаемости.

Ключевой гистологической особенностью РПЖ является выраженная десмопластическая строма: фиброзный матрикс, формируемый активированными панкреатическими звездчатыми клетками и ассоциированными с опухолью фибробластами (Cancer-Associated Fibroblasts, CAF), который может составлять до 70% объема опухолевого образования [25,30]. Десмоплазия обусловливает повышение интерстициального давления, коллапс внутриопухолевых микрососудов, снижение перфузии и ограничение диффузии лекарственных препаратов [31]. CAF и другие компоненты стромы секретируют целый ряд цитокинов и хемокинов (TGFβ (transforming growth factor beta, трансформирующий фактор роста бета), CXCL12 (C-X-C motif chemokine ligand 12, C-X-C подобные хемокины 12), IL-6 и др.), поддерживающих опухолевый рост, инвазию и иммуносупрессивное микроокружение [17].

Иммунное микроокружение РПЖ характеризуется преобладанием иммуносупрессивных популяций над эффекторными [32]. В опухоли присутствует значительное количество миелоидных супрессорных клеток (myeloid-derived

suppressor cells, MDSC), опухоль-ассоциированных макрофагов, регуляторных Т-клеток (regulatory T cells, Treg), а также плотная сеть CAF [18]. Эти клетки продуцируют TGF-β, IL-10, IL-35, CCL5 (C-C motif chemokine ligand 5, C-C подобный хемокин лиганд 5 типа), CXCL12 и другие медиаторы, которые подавляют активность CD8+ Т-лимфоцитов и естественных клеток-киллеров (natural killer cells, NK-клетки), усиливают экспрессию белков PD-L1 и CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, белок 4, связанный с цитотоксическими Т-лимфоцитами), отвечающих за регуляцию Т-лимфоцитов, а также блокируют инфильтрацию эффекторных клеток в опухоль [17,33]. В результате формируется «иммунологически холодная» опухоль с физическим барьером (стромой), устойчивость которой к стандартной химиотерапии и иммунотерапии обусловлена как молекулярным профилем, так и микроокружением [34].

1.1.3 Современные подходы к лечению рака поджелудочной железы и их ограничения

Единственным потенциально куративным методом лечения РПЖ остается хирургическая резекция, но лишь 10–20% пациентов являются резектабельными при первичной диагностике [22]. Даже при R0-резекции и проведении адъювантной химиотерапии медиана общей выживаемости редко превышает 20–22 месяца [35].

В системной терапии нерезектабельного и метастатического РПЖ стандартами первой линии являются схемы FOLFIRINOX (сочетание 5-фторурацила, лейковорина, иринотекана, оксалиплатина) и комбинация гемцитабина с альбумин-связанным паклитакселом (Gemcitabine/nab-paclitaxel, Gem/nab-P) [36]. Модифицированный FOLFIRINOX обеспечивает медиану общей выживаемости порядка 11–13 месяцев, значимо превосходя монотерапию гемцитабином (около 6–7 месяцев) [37]. В Российской Федерации системная терапия РПЖ осуществляется в соответствии с национальными клиническими рекомендациями, где FOLFIRINOX и Gem/nab-P также закреплены как основные

схемы первой линии для соматически сохранных пациентов [38,39]. Российские данные свидетельствуют о том, что медиана общей выживаемости в популяционных когортах пациентов с местно распространенным и метастатическим РПЖ часто составляет 6,7–10 месяцев, а большинство больных погибают в течение первого года после постановки диагноза, несмотря на использование современных схем лечения [6,7]. Расширенные хирургические вмешательства после неоадъювантных схем (например, FOLFIRINOX) в отдельных центрах позволяют повысить медиану выживаемости до 20–22 месяцев, но такие результаты достигаются лишь у строго отобранных пациентов [40]. Российские обзорные исследования подчеркивают, что высокая токсичность применяемых схем, ограниченные ресурсы и поздняя диагностика существенно ограничивают эффективность терапии, поэтому вклад даже оптимальной химиотерапии в общую популяционную выживаемость остается невелик [38,39].

Иммунотерапия ингибиторами контрольных точек (ИКТ), такими как анти-PD-1/PD-L1 (programmed cell death protein 1, рецептор программируемой клеточной смерти / programmed death-ligand 1, лиганд рецептора программируемой клеточной смерти), anti-CTLA-4, пока не продемонстрировала значимого улучшения исходов при РПЖ, за исключением крайне небольшой подгруппы больных (1–2%) с опухолями, характеризующимися высокой микросателлитной нестабильностью и дефицитом системы репарации неспаренных оснований [41]. Систематический обзор показал медиану общей выживаемости около 8,6 месяца и низкую частоту объективных ответов при использовании ИКТ у пациентов с нерезектабельным РПЖ [41]. Комбинации ИКТ с химиотерапией (например, дурвалумаб/тремелимумаб в комбинации с Gem/nab-P) не улучшили выживаемость по сравнению с химиотерапией в рандомизированных исследованиях II фазы [41].

Таргетная терапия при РПЖ на данный момент имеет нишевое значение: PARP-ингибиторы (poly(ADP-ribose) polymerase, поли(АДФ-рибоза)-полимераза), такие как олапариб, используются у пациентов с зародышевыми мутациями в гене BRCA1/2 (breast cancer gene 1/2, ген рака молочной железы 1/2), составляющих около 5–7% популяции, а ингибиторы KRAS-G12C применимы к крайне малой

доле пациентов, поскольку эта мутация редка при РПЖ [42]. Попытки таргетировать сигнальные пути, которые управляют ростом, делением, выживанием и обменом веществ клеток, такие как MAPK (mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа), PI3K-AKT-mTOR (phosphoinositide 3-kinase – protein kinase B – mechanistic target of rapamycin, фосфоинозитид-3-киназа – протеинкиназа B – механистическая мишень рапамицина) и другие, в многочисленных клинических испытаниях пока не привели к принципиальному повышению выживаемости [43]. Тем не менее в 2026 году в данной области был достигнут важный прорыв. Дараксонрасиб (RMC-6236) – пероральный мультиселективный ингибитор белков RAS (rat sarcoma protein, белок саркомы крысы), направленный на гуанозинтрифосфат связанную активную форму мутантного и дикого типа белков RAS, стал первым RAS-ингибитором, продемонстрировавшим клинически значимое улучшение выживаемости при метастатическом РПЖ [44]. В рамках фазы 1/2 клинических испытаний (RMC-6236-001, NCT05379985) у 26 пациентов с мутацией RAS G12, получавших терапию второй линии в дозе 300 мг/сут, объективный ответ был достигнут в 35% случаев, медиана продолжительности ответа составила 8,2 месяца, медиана выживаемости без прогрессирования - 8,5 месяца, а медиана общей выживаемости составила 13,1 месяца. В группе, включавшей все мутации RAS (G12, G13, Q61; n=38), медиана общей выживаемости достигла 15,6 месяца по сравнению с 6–7 месяцами при стандартной химиотерапии второй линии. Эти данные были подтверждены в последующем рандомизированном исследовании фазы 3 RASolute 302 (n=500): в группе дараксонрасиба зафиксированы статистически значимые и клинически значимые улучшения как выживаемости без прогрессирования, так и общей выживаемости по сравнению с химиотерапией [45].

Таким образом, и в мире, и в Российской Федерации, несмотря на внедрение более эффективных химиотерапевтических схем лечения, прогноз РПЖ остается крайне неблагоприятным, а классическая иммунотерапия и таргетная терапия дают клинически значимый эффект лишь у ограниченного числа пациентов. Это подчеркивает необходимость принципиально новых биотерапевтических

стратегий, способных модифицировать опухолевое микроокружение и преодолевать как лекарственную, так и иммунную резистентность – в том числе онколитической вирусной терапии.

1.1.4 Онколитическая вирусная терапия как перспективное направление при раке поджелудочной железы

Онколитические вирусы (ОВ) представляют собой класс противоопухолевых агентов, способных селективно инфицировать и лизировать опухолевые клетки, индуцируя противоопухолевый иммунный ответ [9]. Онкоселективность ОВ обеспечивается использованием вирусами дефектов интерфероновой системы, нарушений контроля клеточного цикла и онкогенных сигнальных путей, характерных для опухолевых клеток [10]. Для лечения РПЖ онколитические вирусы особенно перспективны по двум причинам: во-первых, из-за высокой частоты KRAS-мутаций и нарушений IFN-ответа, создающих благоприятные условия для вирусной репликации, а во-вторых, благодаря способности ОВ ремоделировать десмопластическое иммуносупрессивное микроокружение РПЖ [46,47].

Ключевые преимущества онколитической виротерапии включают: отсутствие перекрестной резистентности с химио- и таргетными препаратами; возможность локального внутриопухолевого введения (в том числе под контролем эндоскопической ультрасонографии) с минимизацией системной токсичности; использование ОВ как платформ для экспрессии иммуномодулирующих трансгенов (цитокины, костимуляторные молекулы, антитела и др.) [10,48]. ОВ способны вызывать не только прямой цитолиз опухолевых клеток, но и индуцировать иммуногенную клеточную гибель с высвобождением опухолевых антигенов, как ассоциированных с повреждением клетки (damage-associated molecular patterns, DAMPs), так и ассоциированных с патогеном (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Высвобождение в межклеточное пространство DAMPs и PAMPs приводит к активации дендритных клеток (ДК), Т-

лимфоцитов и NK-клеток и тем самым превращая иммунологически «холодную» опухоль в «горячую» [17,46].

Однако существуют значительные проблемы, ограничивающие эффективность ОВ при РПЖ. Выраженная десмоплазия и высокое интерстициальное давление препятствуют равномерному распространению вируса в опухоли [30,31]. Системный и локальный интерферон-зависимый противовирусный ответ приводит к быстрому клиренсу вируса и ограничению его репликации в опухолевых клетках [49]. Предсуществующий иммунитет к некоторым вирусам (особенно к широко используемым вакцинным штаммам) может сокращать время циркуляции вируса в крови [50]. Наконец, сложной задачей остается оптимизация дозирования, режима введения, а также сочетания ОВ с другими видами терапии.

В совокупности все это определяет необходимость разработки рациональных комбинированных подходов, в которых ОВ используются совместно с химиотерапией, ИКТ, таргетной терапией и особенно, с ингибиторами JAK/STAT-сигналинга, способными временно ослабить противовирусную защиту опухолевых клеток и повысить репликацию ОВ, сохранив при этом возможность формирования полноценного противоопухолевого иммунного ответа.

1.2 Онколитические вирусы при раке поджелудочной железы

1.2.1 Основные онколитические вирусы, использованные при раке поджелудочной железы в доклинических и клинических испытаниях

В течение последних лет для лечения РПЖ изучен широкий спектр ОВ, включающий аденовирусы, реовирус, вирус простого герпеса (ВПГ), вирус осповакцины, вирус везикулярного стоматита (ВВС), а также другие вирусы [51,52]. Наиболее подробно клинико-доклиническая база описана для онколитических аденовирусов и реовируса, тогда как данные по ВВС, ВПГ и

вируса осповакцины для терапии РПЖ преимущественно представлены доклиническими исследованиями [20].

Аденовирусы являются одной из первых вирусных платформ, примененных у больных РПЖ. В ранних клинических исследованиях использовался условно-реплицирующий аденовирус ONYX-015, с делецией в гене E1B, в сочетании с гемцитабином у пациентов с нерезектабельным РПЖ [48]. В открытом исследовании I/II фазы внутриопухолевое введение ONYX-015 в сочетании с системной химиотерапией показало приемлемую безопасность, а также отдельные случаи стабилизации заболевания и регрессии опухоли, хотя для большинства пациентов эффективность терапии была низкой [51]. Последующие поколения аденовирусов были сконструированы с учетом особенностей микроокружения РПЖ и направленной экспрессии иммуномодулирующих факторов. Так, LOAd703 (Lokon oncolytic adenovirus 703, онколитический аденовирус 703) представляет собой аденовирус, который кодирует трансгены CD40L и 4-1BBL, предназначенные для усиления ко-стимуляции Т-лимфоцитов [53]. В рамках исследования NCT02705196 этот вирус вводили внутриопухолево пациентам с нерезектабельным РПЖ на фоне стандартной химиотерапии (Gem/nab-p и FOLFIRINOX). По полученным данным, сочетание оказалось безопасным и сопровождалось стабильным увеличением доли эффекторных клеток памяти CD8+ и аденовирус-специфических Т-клеток у 15 из 16 пациентов (94%) [53].

Реовирус является двухцепочечным РНК-вирусом, онколитическая активность которого была показана на опухолевых клетках с активацией пути RAS, что делает РПЖ перспективной целью в силу высокой частоты мутаций KRAS [54]. В ранних исследованиях I фазы препарата Pelareorep на основе реовируса было показано, что его системное введение в сочетании с гемцитабином при РПЖ безопасно и сопровождается ростом вирусной репликации и иммунной активацией [52]. Более значимые клинические данные получены в многоцентровом исследовании I/II фазы, где у пациентов с метастатическим РПЖ оценивалась эффективность сочетания реовируса Pelareorep с Gem/nab-p и атезолизумабом [55].

По промежуточным результатам, частота объективных ответов достигла около 70%, медиана выживаемости без прогрессирования составила 7,2 месяца, а промежуточная медиана общей выживаемости – 10,6 месяца, что превышает исторические показатели при применении только химиотерапии [55].

Вирус осповакцины рассматривается как платформа с высокой емкостью генома для доставки терапевтических трансгенов, включая цитокины (например, IL-2, IL-21), костимуляторные молекулы, антитела и другое [56]. Доклинические исследования при РПЖ показали, что модифицированные штаммы вируса осповакцины, экспрессирующие IL-21 или другие иммуномодулирующие молекулы, способны усиливать инфильтрацию CD8+ Т-лимфоцитов и повышать чувствительность опухоли к ИКТ [20]. В то же время клинический опыт применения вируса осповакцины у пациентов с РПЖ на сегодняшний день ограничен.

ВПГ и ВВС также продемонстрировали высокую литическую активность в отношении ряда клеточных линий РПЖ, однако значительная часть клеточных культур остается резистентной, что связывается с сохраненной или гиперактивной интерфероновой системой опухолевых клеток [20,21]. Для ВПГ показаны перспективные доклинические результаты, особенно для генетически модифицированных вариантов, экспрессирующих иммуномодулирующие гены, однако результаты клинических исследований по РПЖ остаются ограниченными [20]. ВВС интенсивно изучался в доклинических моделях РПЖ, где была продемонстрирована связь между базальной активностью IFN/JAK/STAT-оси опухолевых клеток с вирусной репликацией и эффектом терапии, что подчеркивает потенциал сочетания онколитических вирусов с JAK-ингибиторами [13].

Таким образом, в настоящее время существующие подходы терапии онколитическими вирусами РПЖ демонстрируют низкую эффективность, что требует поиска и изучения новых подходов и стратегий в иммуноонкологии, в том числе комбинированной терапии.

1.2.2 Механизмы противоопухолевого действия онколитических вирусов

Механизмы противоопухолевого действия ОВ постоянно исследуются и на сегодняшний день определено три ключевых компонента: прямой онколиз опухолевых клеток, модификация опухолевого микроокружения и индукция адаптивного противоопухолевого иммунного ответа [9]. Прямой онколиз реализуется за счет селективной репликации вируса в опухолевых клетках с последующим лизисом и высвобождением дочерних вирионов. Онкоселективность вируса может определяться дефектами интерферонового ответа, активацией онкогенных путей (например, RAS / RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma protein, белок быстро прогрессирующей фибросаркомы) / MEK (mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа)), нарушениями регуляции клеточного цикла и антиапоптотическими механизмами, свойственными опухолевым клеткам [9]. При этом для ряда ОВ показана способность индуцировать различные типы клеточной гибели, включая апоптоз, некроптоз и пироптоз, что влияет на характер последующей иммунной реакции [46].

Воздействие на опухолевое микроокружение заключается в индукции иммуногенной клеточной гибели и ремоделировании стромы [17]. После вирус-индуцированного лизиса опухолевые клетки высвобождают опухолеассоциированные антигены (tumor-associated antigen, TAA), а также DAMPs (провоспалительный белок HMGB1 (high-mobility group box 1, ядерный белок высокой мобильной группы 1), внеклеточный аденозинтрифосфат, кальретикулин) и PAMPs (вирусные нуклеиновые кислоты и белки), которые распознаются дендритными клетками и другими антигенпрезентирующими клетками посредством рецепторов распознавания паттернов, таких как, толл-подобные рецепторы (Toll-like receptor, TLRs), RIG-I-подобные рецепторы (RIG-I-like receptors, RLRs) и других сенсоров [46,57]. Это приводит к созреванию дендритных клеток, усилению кросс-презентации TAA и продукции провоспалительных цитокинов (IL-12, IFN-α/β), что в совокупности способствует привлечению и активации CD8+ Т-лимфоцитов и NK-клеток [18]. Для РПЖ,

характеризующейся выраженной десмоплазией и иммуносупрессивной стромой, данный механизм имеет особое значение, поскольку ОВ потенциально могут снижать плотность стромы и изменять фенотип стромальных и иммунных клеток в сторону менее иммуносупрессивного состояния [31].

Индукция системного адаптивного иммунного ответа представляет собой еще один критически важный компонент действия ОВ. В ряде клинических и доклинических исследований показано, что терапия ОВ сопровождается появлением и расширением опухолеспецифических CD8+ Т-клеточных клонов [9,48]. В частности, в исследовании I/II фазы применение реовируса Pelareorep в комбинации с химиотерапией и атезолизумабом у пациентов с РПЖ ассоциировалось с экспансией как уже существовавших, так и новых Т-клонов, что интерпретируется как результат кросс-презентации ТАА после вирус-индуцированной гибели клеток [55]. В доклинических моделях описаны так называемые абскопальные эффекты, при которых локальная интратуморальная виротерапия приводит к контролю над отдаленными, неинфицированными очагами за счет системного Т-клеточного ответа [12].

Таким образом, онколитическая виротерапия при РПЖ представляет собой комбинированное воздействие на опухоль, включающее непосредственный онколиз, модификацию десмопластического и иммуносупрессивного микроокружения и запуск системного противоопухолевого иммунного ответа. Эти эффекты создают предпосылки для сочетания ОВ с другими видами лечения, в том числе с химиотерапией, ИКТ и таргетными агентами.

1.2.3 Комбинированные схемы онколитической терапии при раке поджелудочной железы

Анализ результатов доклинических и клинических исследований показывает, что монотерапия ОВ при РПЖ, как правило, обладает недостаточной эффективностью, тогда как наибольший терапевтический потенциал реализуется в составе комбинированных схем [20,51]. В связи с этим в настоящее время основное

внимание уделяется поиску оптимальных комбинаций ОВ с химиопрепаратами, иммунными препаратами и таргетными агентами, а также выбору последовательности и режима введения.

Комбинации с химиотерапией являются наиболее изученным направлением в области онколитической виротерапии. Показано, что химиопрепараты, такие как гемцитабин, Gem/nab-P, FOLFIRINOX способствуют уменьшению опухолевой массы с повреждением десмопластической стромы, что облегчает распространение ОВ и способствует индукции иммуногенной клеточной гибели [54,58]. Примером является клиническое исследование GOBLET, где Pelareorep применялся совместно с Gem/nab-P и атезолизумабом, что в результате приводило к увеличению частоты ответов на терапию и увеличению выживаемости по сравнению с одной химиотерапией [55]. Аналогично, для онколитических аденовирусов показана синергия с Gem/nab-P и другими препаратами в доклинических моделях и ранних клинических исследованиях при РПЖ [58,59].

Еще одним перспективным направлением является комбинирование терапии ОВ с ИКТ. Поскольку РПЖ, как правило, характеризуется выраженным иммуносупрессивным состоянием, ОВ рассматриваются как средство преобразования иммунологически «холодной» опухоли в «горячую». В доклинических моделях РПЖ описаны примеры, когда сочетание ОВ (включая модифицированные аденовирусы и вирус осповакцины) с анти-PD-1 или анти-PD-L1 антителами усиливало инфильтрацию CD8+ Т-клеток и приводило к более выраженному замедлению роста опухоли по сравнению с монотерапией [20,54]. Также ОВ способны повышать экспрессию PD-L1 рецепторов и увеличивать количество инфильтрирующих опухоль эффекторных Т-клеток, создавая благоприятные условия для терапии ИКТ [9,60].

В настоящее время активно изучаются подходы, основанные на комбинировании ОВ с различными клеточными препаратами (CAR-T клетки (chimeric antigen receptor T-cells, Т-клетки с химерным антигенным рецептором), TIL терапия (tumor-infiltrating lymphocytes, опухоль-инфильтрирующие

лимфоциты)). В доклинических моделях РПЖ показано, что аденовирусы и вирус осповакцины, экспрессирующие провоспалительные цитокины (IL-2, IL-21) и хемокины (например, CXCL11), могут способствовать рекрутированию CAR-T клеток в опухоль, преодолевая часть барьеров, обусловленных десмоплазией и иммуносупрессией [10,61].

1.3 Вакцинный штамм 17D вируса желтой лихорадки и роль JAK/STAT-сигналинга

1.3.1 Вакцинный штамм 17D вируса желтой лихорадки: биологические свойства, безопасность, иммуногенность

Вакцинный штамм ВЖЛ 17D получен в 1930-х годах путем многократного серийного пассирования вирулентного штамма Asibi на мышиных эмбриональных тканях и куриных эмбрионах [62]. В результате этого процесса в геноме вируса накопились 68 нуклеотидных замен, обусловивших 32 аминокислотные замены в структурных и неструктурных белках по сравнению с родительским штаммом Asibi [63]. Анализ, проведенный Zhang J. и соавторами, позволил установить, что ключевую роль в аттенуации ВЖЛ 17D играют аминокислотные замены в белках E и NS2A, которые обусловливают снижение вирулентности и одновременно индукцию противовирусного иммунного ответа [64]. Ранее было установлено, что стабильность аттенуированного фенотипа обеспечивается в том числе механизмом высокоточной репликации ВЖЛ 17D, который проявляет устойчивость к нуклеозидному аналогу рибавирину, что свидетельствует о низкой вероятности реверсии вирусного генома к дикому типу [65].

За более чем восемь десятилетий применения вакцина на основе штамма ВЖЛ 17D введена более чем 400 миллионам человек, что соответствует одному из самых обширных мировых опытов использования живых аттенуированных вакцин [11]. Штамм ВЖЛ 17D имеет хорошо охарактеризованный профиль безопасности: частота тяжелых вакциноассоциированных осложнений, включая редкие

синдромы вакциноассоциированного нейротропного и висцеротропного поражения, не превышает единичных случаев на миллион доз [66]. Систематический обзор нежелательных явлений в уязвимых группах населения (дети, беременные, ВИЧ-инфицированные, пожилые) подтверждает допустимый профиль безопасности при стандартных показаниях [67]. При этом продемонстрировано, что одна доза вакцины обеспечивает длительную, нередко пожизненную иммунную защиту, тогда как сероконверсия по нейтрализующим антителам достигает более 95% вакцинированных [11,63].

Иммунологические свойства ВЖЛ 17D хорошо охарактеризованы на клеточном и молекулярном уровнях. Вакцина активирует несколько субпопуляций дендритных клеток (миелоидные и плазмоцитоидные ДК) через TLR2, TLR7, TLR8 и TLR9, что сопровождается продукцией IL-12, IL-6 и IFN-α [68]. Формирующийся адаптивный иммунный ответ характеризуется смешанным профилем Th1/Th2 и наличием антигенспецифических CD8+ Т-клеток [11,68]. ВЖЛ 17D способен инфицировать незрелые и зрелые ДК человека и обеспечивать кросс-презентацию антигенов, что было показано в работе Barba-Spaeth G. с соавторами [11]. Совокупность этих иммунологических характеристик: широкий спектр активируемых TLR-рецепторов, активация нескольких субтипов ДК, мощный и длительный Т-клеточный ответ – послужила основанием для рассмотрения ВЖЛ 17D как онколитического и иммуномодулирующего агента [12].

1.3.2 Онколитический потенциал вакцинного штамма 17D вируса желтой лихорадки

Первое систематическое изучение противоопухолевых свойств ВЖЛ 17D представлено в работе Aznar M.A. и соавторов [12]. Авторы показали, что ВЖЛ 17D реплицируется и оказывает цитопатическое действие на широкий спектр линий опухолевых клеток человека и мышей, тогда как нормальные клеточные линии практически не поражались [12]. При внутриопухолевом введении в иммунокомпетентных мышах с подкожными сингенными опухолями ВЖЛ 17D

значительно замедлял рост опухолей и увеличивал время дожития до гуманной точки животных. При этом было установлено, что эффект носил CD8-зависимый характер, что подтверждалось его исчезновением при деплеции CD8+ Т-лимфоцитов. Примечательно, что предварительная иммунизация животных ВЖЛ 17D не снижала, а напротив, увеличивала противоопухолевый эффект последующей терапии, сопровождаясь усилением инфильтрации опухоли CD4+ и CD8+ Т-клетками. Дополнительно была показана синергия с анти-CD137 терапией, что указывает на совместимость ОВ-терапии с ИКТ подходами [50]. Противоопухолевый потенциал ряда других флавивирусных аттенуированных штаммов и вакцин, в том числе конструкций на основе вируса Западного Нила, также был продемонстрирован в доклинических моделях, что в совокупности свидетельствует о биологическом классовом эффекте, связанном с активацией врожденного иммунитета флавивирусами [69].

В ранее проведенных исследованиях в лаборатории клещевого энцефалита и других вирусных энцефалитов ФГАНУ "ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН" (Институт полиомиелита) были получены ключевые данные об онколитическом действии ВЖЛ 17D в моделях РПЖ, где оценивались цитопатическое действие ВЖЛ 17D *in vitro* на мышиной линии Pan02 и нескольких линиях рака поджелудочной железы человека, а также противоопухолевая активность в сингенной модели подкожных опухолей Pan02 у иммунокомпетентных мышей [19]. Было установлено, что ВЖЛ 17D оказывает выраженный цитопатический эффект на клеточные линии рака поджелудочной железы человека *in vitro*, тогда как в отношении мышиных клеток Pan02 прямой литический эффект *in vitro* был минимален. Несмотря на это, однократное внутриопухолевое введение ВЖЛ 17D в подкожные опухоли Pan02 приводило к задержке опухолевого роста и увеличению медианы выживаемости на 30%, при этом предварительная системная иммунизация животных ВЖЛ 17D дополнительно повышала эффективность терапии [19].

Один из важнейших механизмов уклонения флавивирусов, включая ВЖЛ, от иммунной системы человека опосредуется их неструктурным белком NS5 [14]. Белок NS5 специфически связывается с hSTAT2, способствуя его полиубиквитинированию и деградации через протеасому, тем самым блокируя сигнализацию интерферона I типа и продукцию ISGs (Рисунок 1). Этот антагонизм является видоспецифичным: белок NS5 эффективно деградирует hSTAT2, но не связывает мышиный STAT2 (mSTAT2) [70]. Взаимодействие NS5-STAT2 обуславливает фундаментальное различие в вирусной пермиссивности между мышиными и человеческими линиями опухолевых клеток. Именно с этим связано отсутствие цитопатического эффекта ВЖЛ 17D на клеточной линии Pan02 *in vitro*.

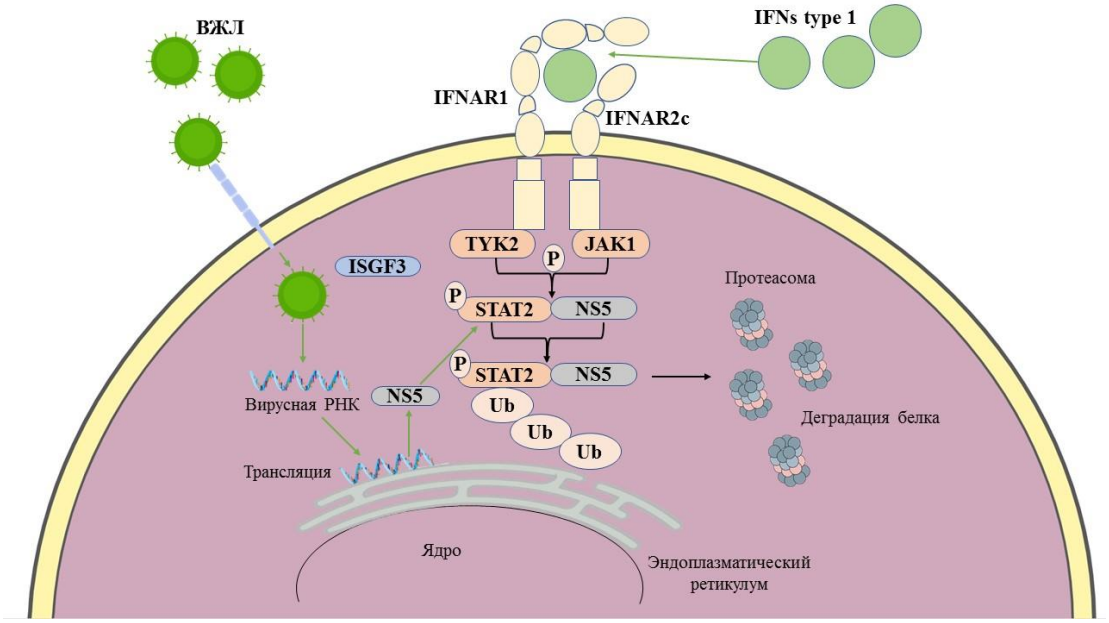


Рисунок 1 - Ингибирование белком NS5 ВЖЛ сигнального пути интерферона 1 типа в опухолевых клетках

Таким образом, совокупность имеющихся данных свидетельствует о том, что ВЖЛ 17D сочетает прямой онколитический потенциал (особенно выраженный применительно к линиям РПЖ человека) с мощной иммуномодулирующей активностью, опосредуемой CD8+ Т-клеточным ответом, что делает его перспективной платформой для онколитической и иммунотерапии РПЖ.

1.3.3 Молекулярные особенности клеточных линий рака поджелудочной железы, определяющие вирусную пермиссивность

Использование панелей клеточных линий РПЖ является проверенной методологической практикой для изучения межклеточной гетерогенности молекулярных мишеней и противоопухолевых агентов [21,71]. Молекулярные характеристики отдельных линий РПЖ, в том числе статус генов KRAS, TP53, SMAD4 и CDKN2A, базальная активность JAK/STAT-каскада, уровень экспрессии ISG, чувствительность к IFN – все это определяет пермиссивность к онколитическим вирусам.

Сигнальный каскад JAK/STAT – это универсальная внутриклеточная программа, через которую клетка передает сигналы от более чем 50 цитокинов, включая все типы интерферонов, интерлейкины и колониестимулирующие факторы [72]. В иммунологии он выполняет ключевую функцию в формировании как противовирусного, так и противоопухолевого ответа, однако в зависимости от типа лиганда и клеточного контекста его функциональные исходы различаются.

Интерфероны I типа (IFN-α и IFN-β) секретируются клетками практически любого типа в ответ на вирусную инфекцию. При связывании с гетеродимерным рецептором IFNAR1/IFNAR2c (interferon alpha/beta receptor 1/2c, интерфероновый рецептор альфа/бета 1/2c) на поверхности клетки, ассоциированные с ним тирозинкиназы JAK1 и TYK2 (tyrosine kinase 2, тирозин киназа 2 типа), активируются и фосфорилируют внутриклеточные домены рецептора (Рисунок 2). Это создает стыковочные сайты для белков STAT1 и STAT2, которые рекрутируются, фосфорилируются и образуют гетеродимер [73]. Затем к этому димеру присоединяется транскрипционный фактор IRF9 (interferon regulatory factor 9, интерферон-регуляторный фактор 9), формируя тримерный комплекс ISGF3 (Interferon-Stimulated Gene Factor 3). Комплекс ISGF3 транслоцируется в ядро, где связывается с регуляторными элементами ISRE (interferon-stimulated response element, интерферон-стимулируемый элемент ответа) в промоторах ISG и запускает их транскрипцию [74]. Среди ключевых продуктов этого каскада – белки

MX1 (myxovirus resistance protein 1, миксовирус-резистентный белок 1), OAS1/2/3 (oligoadenylate synthetase 1/2/3, 2'-5'-олигоаденилатсинтетаза 1/2/3), PKR (protein kinase R, протеинкиназа R), ISG15, IFITM3 (interferon-induced transmembrane protein 3, интерферон-индуцированный трансмембранный белок 3) и GBP1 (guanylate binding protein 1, гуанилат-связывающий белок 1), которые непосредственно блокируют проникновение вируса в клетку, его репликацию и сборку новых вирионов [75,76]. Именно эта ось каскада формирует основной молекулярный барьер для репликации ОВ в опухолевых клетках с функциональным IFN-ответом.

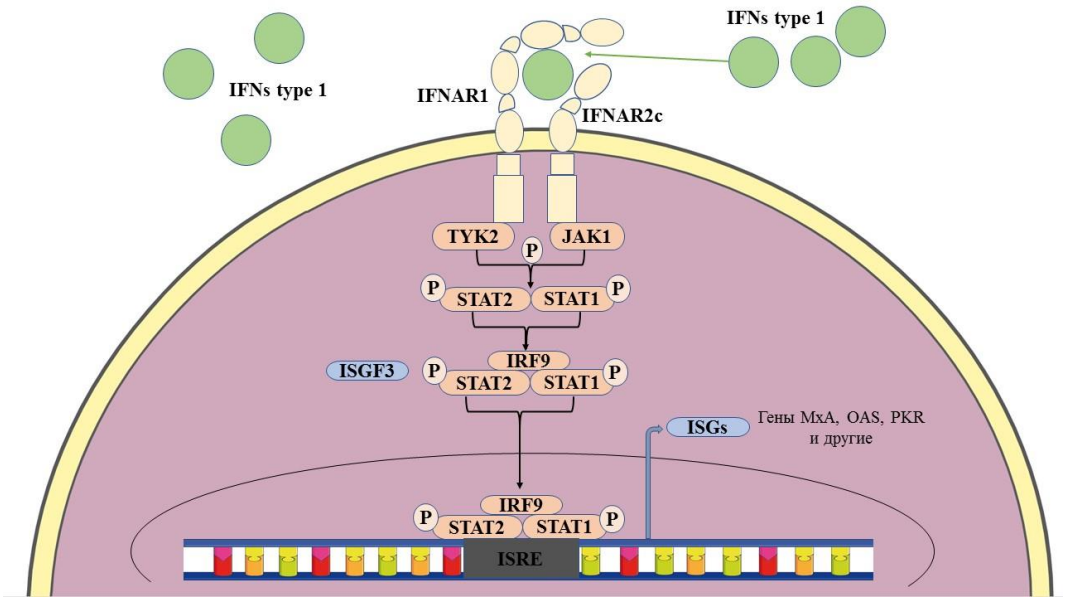


Рисунок 2 - Сигнальный путь интерферонов I типа: взаимодействие интерферонов I типа с рецепторами IFNAR1/IFNAR2c на поверхности клетки активируют сигнальный каскад JAK/STAT, что в конечном итоге приводит к транскрипции ISG и продукции ключевых противовирусных белков, таких как MX1, OAS1/2/3, PKR и другие

Интерферон II типа (IFN-γ), секретируемый преимущественно Т-лимфоцитами и NK-клетками, действует через рецептор IFNGR (interferon-gamma receptor, рецептор интерферона гамма), ассоциированный с JAK1 и JAK2 киназами [72]. В результате активации этой пары киназ фосфорилируется только STAT1, который образует GAF-комплекс (gamma activated factor, гамма-активируемый фактор). GAF-комплекс связывается с регуляторными GAS-элементами (gamma activation site, сайт активации интерфероном-гамма) и запускает транскрипцию генов, обеспечивающих цитотоксический иммунный ответ: MHC-I, MHC-II (major

histocompatibility complex class I/II, главный комплекс гистосовместимости 1/2 типа), TAP1/2 (transporter associated with antigen processing 1/2, транспортерный комплекс, связанный с обработкой антигенов 1/2), а также TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TNF-апоптоз-индуцирующий лиганд) и другие гены индукции апоптоза [74]. Таким образом, IFN-γ/JAK/STAT1-ось каскада отвечает за усиление презентации опухолеассоциированных антигенов и прямое подавление пролиферации опухолевых клеток.

Наряду с противовирусной и противоопухолевой функциями JAK/STAT-каскад реализует онкогенные программы через ось IL-6/JAK2/STAT3. При ее базальной активации STAT3 напрямую индуцирует транскрипцию антиапоптотических генов (BCL-2 (B-cell lymphoma 2 protein, белок B-клеточной лимфомы 2 типа), BCL-XL (B-cell lymphoma extra large protein), белок B-клеточной лимфомы экстра-большого типа), MCL-1 (myeloid cell leukemia 1 protein, белок миелоидного лейкоза клеток 1 типа)), регуляторов пролиферации (MYC (myelocytomatosis oncogene cellular homolog, клеточный гомолог онкогена миелоцитоматоза), циклин D1) и ангиогенеза (VEGF (vascular endothelial growth factor, сосудисто-эндотелиальный фактор роста)), что в совокупности обеспечивает выживание опухолевых клеток, их инвазию и формирование иммуносупрессивного микроокружения [77,78]. Для предотвращения избыточной активации этого каскада в здоровой клетке функционирует несколько уровней обратного регулирования: белки SOCS1 и SOCS3 (suppressor of cytokine signaling 1/3, супрессоры цитокиновой сигнализации 1/3 типа) конкурируют с молекулами STAT за фосфотирозиновые сайты JAK-киназ, белки PIAS (protein inhibitor of activated STAT, белковый ингибитор активированного STAT) препятствуют связыванию активированных белков STAT с ДНК, а тирозиновые фосфатазы SHP1 и SHP2 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1/2, тирозиновые фосфатазы 1/2 типа) дефосфорилируют рецепторные комплексы, ограничивая продолжительность сигнала [73,79].

В контексте онколитической виротерапии JAK/STAT-каскад занимает ключевое положение, поскольку именно он определяет исход взаимодействия

вируса и опухолевой клетки. Функциональный IFN-I/STAT1/STAT2-ответ защищает клетку от вирусной репликации через транскрипцию ISG и продукцию противовирусных белков [21]. Одновременно IFN-γ/STAT1-зависимые апоптотические гены могут приводить к гибели инфицированных клеток даже в отсутствии прямого цитопатического лизиса [72]. Базальная гиперактивация STAT3 в клетках РПЖ, напротив, поддерживает выживание опухолевых клеток и снижает воспалительный ответ на инфекцию [77]. Итогом функционирования этих конкурирующих осей каскада в конкретной клеточной линии является уникальный молекулярный фенотип, определяющий ее чувствительность или резистентность к ОВ.

Активирующие мутации онкогена KRAS в кодоне 12 обнаруживаются в 88–95% случаев РПЖ [80]. Показано, что различные варианты мутаций KRAS (G12D, G12V, G12C, G12R) приводят к неравнозначным функциональным изменениям: они влияют на скорость гидролиза гуанозинтрифосфата, активацию эффекторов белка RAS и аллельно-специфическому сигналингу, что определяет пролиферацию и выживание опухолевых клеток [81,82]. Следует отметить, что мутация KRAS G12D ассоциирована с более высокой активацией IFN-I/IFNAR1/STAT3-оси каскада по сравнению с G12V и G12C: в изогенных моделях РПЖ активация STAT3-сигналинга максимальна при G12D и коррелирует с более агрессивным фенотипом [83]. В опухолях с мутацией G12V активация STAT1-сигналинга и транскрипция TRAIL-зависимых генов выше, чем при G12D. Таким образом, аллельная специфичность KRAS-мутации является одним из факторов, определяющих функциональный статус JAK/STAT в конкретной линии РПЖ.

Дикий тип (Wild Type, WT) гена-супрессора опухолей p53 выполняет двойную функцию в контексте противовирусного ответа. С одной стороны, WT p53 является транскрипционным активатором IRF9 и ряда ISRE-содержащих ISG (ISG15, OAS1, IFN-β), усиливая противовирусный ответ клетки [84]. Важно, что в клетках с GOF-мутантным TP53 нарушена ко-транскрипционная активация гена IRF9 со стороны p53, что снижает базальный потенциал IFN-JAK/STAT-ответа на вирусную инфекцию, и это напрямую связано с вирусной пермиссивностью [85]. С

другой стороны, p53-зависимый апоптоз в ответ на вирусную инфекцию протекает через активацию митохондриального пути (гены PUMA (p53-upregulated modulator of apoptosis, проапоптотический белок регулятор p53), NOXA (pro-apoptotic BH3-only protein, проапоптотический BH3 белок), BAX (BCL-2-associated X protein, BCL-2-ассоциированный проапоптотический белок)) и подавление гена BCL-2 при участии IFN/STAT-зависимой ко-стимуляции [72,73]. Это означает, что в клетках с WT p53 IFN-сигналинг и p53-зависимый апоптоз усиливают друг друга, эффективнее активируя программу гибели клетки при вирусной инфекции. Однако эффект меняется при мутациях гена TP53 типа GOF (gain-of-function, мутации с приобретением функции), наиболее распространенных при РПЖ. Мутации R248W и R273H в гене TP53 не только блокируют естественную функцию WT p53, но и наделяют белок новыми онкогенными свойствами, включая активацию промоторов генов метастазирования, хемоустойчивость и повышенную иммуносупрессивную активность опухолевого микроокружения [86,87].

Гомозиготная делеция гена-супрессора опухолей CDKN2A встречается в 30–40% случаев РПЖ и является одним из ключевых событий онкопрогрессии, устраняя CDK4/6-зависимый (cyclin-dependent kinase 4/6, циклинзависимые киназы 4/6) контроль клеточного цикла, что приводит к неконтролируемой клеточной пролиферации [26]. В контексте IFN-ответа важно, что ген CDKN2A и кластер генов IFN-I типа локализованы в одном регионе хромосомы 9p21.3. При гомозиготной делеции CDKN2A в РПЖ нередко происходит ко-делеция генов IFN-I типа, что приводит к структурному нарушению IFN-I-сигналинга и иммунному уклонению опухоли за счет снижения числа молекул IFN-I типа [88,89]. Такое явление приводит к снижению интенсивности противовирусного ответа в клетках с гомозиготной делецией CDKN2A независимо от функционального состояния нижестоящих компонентов JAK/STAT-каскада. Также показано, что в клетках с двойной потерей функции p53 и CDKN2A базально активированный JAK-STAT1-ISG-каскад функционирует как положительный драйвер пролиферации, а не как ее

ингибитор, причем JAK1/2-ингибиторы (руксолитиниб, барицитиниб) подавляют эту пролиферацию [90].

Мутации или делеции гена-супрессора опухолей SMAD4 обнаруживаются приблизительно в 17-32% случаев РПЖ и устраняют ключевой механизм подавления опухолей TGF-β/SMAD-зависимый [26]. В контексте онколитической терапии показано, что SMAD4 является предиктором пермиссивности клеток РПЖ к H-1PV (human parvovirus H-1, парвовирус H-1 человека): делеция или мутация SMAD4 резко снижает активность вирусного промотора P4, тогда как SMAD4-позитивные линии (PANC-1, MiaPaCa-2) значительно более чувствительны к H-1PV [91]. Это свидетельствует о том, что SMAD4 участвует в регуляции вирусной транскрипции как транскрипционный ко-фактор, хотя применительно к ВЖЛ 17D данный аспект в литературе не описан.

1.4 Ингибитор JAK1/2 руксолитиниб и обоснование комбинации с вакцинным штаммом 17D вируса желтой лихорадки при раке поджелудочной железы

1.4.1 Руксолитиниб: мишени, основные эффекты, опыт применения в онкологии

Руксолитиниб (INCB018424) — первый одобренный FDA пероральный селективный ингибитор JAK1/JAK2-киназ, блокирующий их путем связывания с аденозинтрифосфат связывающим сайтом [15]. Руксолитиниб блокирует способность JAK1/2-киназ фосфорилировать белки STAT, тем самым прерывая передачу сигнала по множеству цитокиновых осей одновременно (Рисунок 3). Основные клеточные эффекты этого ингибирования – подавление экспрессии ISG (MX1, OAS, PKR), снижение продукции провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF-α, IL-1β), торможение пролиферации и активации иммунных клеток, а в контексте опухолевых клеток – снижение экспрессии PD-L1, индуцируемой через JAK/STAT-ось [92].

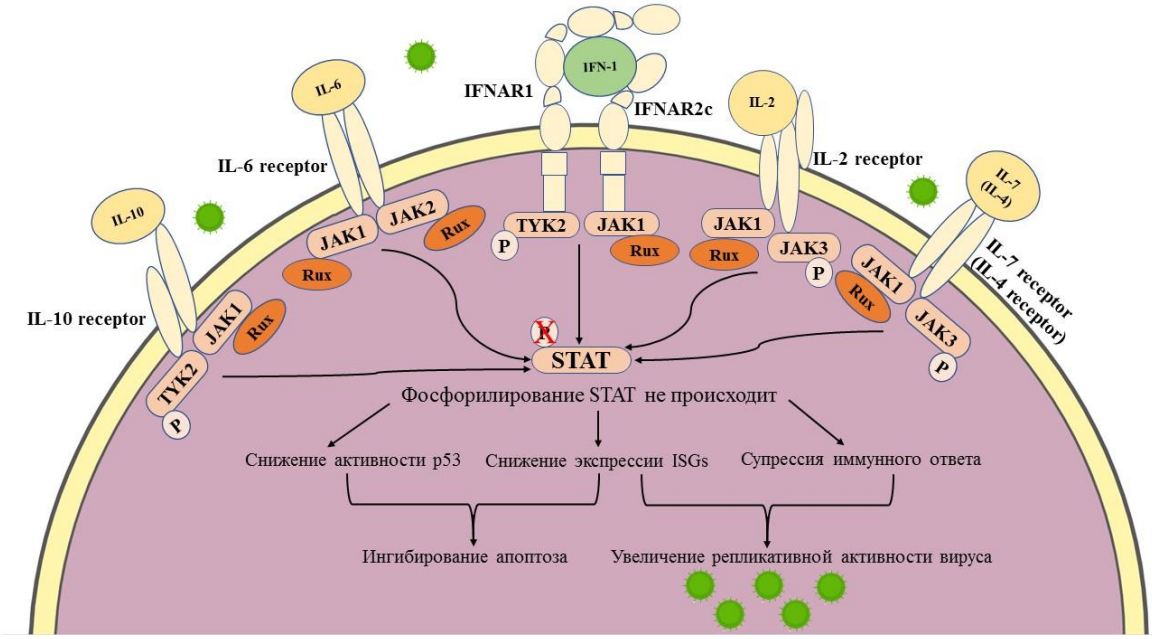


Рисунок 3 - Механизм действия руксолитиниба: руксолитиниб блокирует способность JAK1/2-киназ фосфорилировать белки STAT, тем самым прерывая передачу сигнала по множеству цитокиновых осей одновременно

Область клинического применения руксолитиниба в онкологии последовательно расширялась после его первоначального одобрения для лечения миелофиброза. Впоследствии препарат был одобрен при истинной полицитемии и реакции «трансплантат против хозяина» [92]. При РПЖ были проведены рандомизированные исследования фазы II (RECAP) и фазы III (JANUS 1, NCT02117479; JANUS 2, NCT02119663), в которых оценивалась комбинация руксолитиниба с капецитабином во второй линии терапии у пациентов с системным воспалением [93]. Несмотря на обнадеживающие результаты предварительного исследования у пациентов с высоким уровнем С-реактивного белка, исследования JANUS 1 и 2 не показали улучшения общей выживаемости и были досрочно прекращены. Эти результаты свидетельствуют о том, что системное применение руксолитиниба как монотерапевтической стратегии с противовоспалительной целью при РПЖ не обеспечивает достаточного терапевтического эффекта, однако они не исключают потенциал руксолитиниба в иных комбинаторных схемах, в частности, совместно с онколитическими вирусами.

1.4.2 Комбинация JAK-ингибиторов с онколитическими вирусами

Основной целью комбинирования ОВ с ингибиторами JAK1/2-киназ является временное фармакологическое подавление противовирусного ответа клетки и создание благоприятных условий для вирусной репликации, что приводит к выбросу в межклеточное пространство большого количества DAMPs, PAMPs и ассоциированных с опухолью антигенов. Ключевым фактором является ограничение действия ингибиторов во времени. После окончания действия препарата JAK1/2-ингибитора клетка восстанавливает способность детектировать большое количество чужеродных антигенов и запускает провоспалительные сигнальные каскады, что приводит к активации врожденного и адаптивного иммунного ответа [13]. Эта гипотеза получила экспериментальное подтверждение в нескольких независимых исследованиях на разных ОВ и типах опухолей [13,94].

При РПЖ наиболее детально данный подход исследован на модели ВВС. Работа Felt S.A. и соавторов показала, что руксолитиниб значительно усиливает репликацию и онколиз ВВС во всех резистентных линиях РПЖ, снижая экспрессию базально активных ISG, в особенности MX1, EPSTI1 (epithelial stromal interaction protein 1, белок 1, взаимодействующий с эпителием и стромой), XAF1 (XIAP-associated factor 1, проапоптотический фактор XIAP 1) и GBP1, идентифицированных как биомаркеры резистентности к ОВ [13,95]. Стоит отметить, что использование поликатионов с руксолитинибом изменяло способность вируса прикрепляться к наиболее резистентным клеткам опухолевой линии HPAF-II: добавление поликатионов к комбинации ВВС с руксолитинибом дополнительно повышало эффективность терапии, позволяя одновременно устранять IFN-зависимые механизмы резистентности [13]. В отношении ВВС усиленного трансгеном, кодирующим IFNβ, на модели немелкоклеточного рака легкого Patel M.R. и соавторы показали, что руксолитиниб увеличивает клеточную гибель в линиях с частично сохраненным IFN-ответом и одновременно подавляет индукцию PD-L1, вызываемую вирусной инфекцией [96]. Таким образом,

комбинация одновременно усиливает вирусную репликацию и создает более благоприятный иммунный статус в опухоли для последующей терапии.

Также важные данные получены при злокачественных опухолях из оболочек периферических нервов (malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST). Ghonime M.G. и соавторы показали, что предварительная обработка руксолитинибом превращает исходно резистентные сингенные опухоли MPNST в пермиссивные к онколитическому ВПГ, а комбинированная терапия сопровождается значимым увеличением CD8+ Т-клеточной инфильтрации опухоли [94]. В последующей работе той же группы было установлено, что комбинация руксолитиниба с онколитическим ВПГ ремоделирует иммунное микроокружение опухоли: помимо Т-цитотоксического ответа, активируются CD4+ Т-клетки с цитотоксическим потенциалом и зародышевые В-клетки, что указывает на формирование долгосрочного адаптивного ответа [16]. Принцип сочетания руксолитиниба с ОВ был также исследован на модели реовируса при Т-клеточных лимфомах, где снятие JAK/STAT-барьера значительно повышало репликацию и противоопухолевую активность онколитического реовируса [97].

Таким образом, совокупность данных, изложенных в настоящем обзоре, формирует многоуровневое обоснование для применения комбинации ВЖЛ 17D с руксолитинибом при РПЖ. Во-первых, ВЖЛ 17D обладает прямым цитопатическим действием в отношении человеческих линий РПЖ и иммуноопосредованной противоопухолевой активностью *in vivo*. Во-вторых, главным барьером для репликации ВЖЛ 17D в резистентных линиях РПЖ является функциональный IFN-I/JAK/STAT-каскад по механизму, описанному для ВВС, ВПГ и других ОВ. В-третьих, руксолитиниб доказанно преодолевает JAK/STAT-зависимую резистентность опухолевых линий к ОВ в нескольких экспериментальных системах, в том числе непосредственно при РПЖ. В-четвертых, видоспецифичность NS5-STAT2-взаимодействия ВЖЛ 17D предполагает, что вирус уже обладает собственным механизмом частичного подавления IFN-I-ответа в человеческих клетках, а руксолитиниб должен усиливать этот эффект в линиях, где противовирусной активности белка NS5

недостаточно для полного подавления ISG-экспрессии. Наконец, РПЖ характеризуется выраженной гетерогенностью по базальному JAK/STAT-статусу, мутационным статусом KRAS, TP53, CDKN2A и другими факторами, что создает предпосылки к изучению взаимосвязи между этими молекулярно-генетическими маркерами и чувствительностью к данному виду комбинированной терапии.

Вместе с тем ряд вопросов, принципиальных для трансляции этого подхода в клиническую практику, остается открытым. В опубликованной литературе отсутствуют данные о диапазоне эффективных концентраций руксолитиниба, при которых достигается усиление репликации ВЖЛ 17D в линиях с гиперактивным IFN-ответом. Не охарактеризованы фенотипы чувствительности к комбинации ВЖЛ 17D с руксолитинибом в панели линий РПЖ с различными молекулярно-генетическими профилями. Не изучено влияние данной комбинации на системный противоопухолевый иммунный ответ, включая инфильтрацию CD8+ Т-лимфоцитами и иммунный профиль опухолевого микроокружения *in vivo*. Перечисленные вопросы определяют научную цель и задачи настоящего диссертационного исследования.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Материалы, использованные в работе

В работе были использованы реактивы отечественного и зарубежного производства:

1. ПанЭко (Россия): питательные среды DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, модифицированная среда Игла по Дульбекко), фосфатно-солевой буфер (phosphate buffered saline, PBS), антибиотики пенициллин-стрептомицин и гентамицин, L-глутамин, ДМСО, раствор 0,25% трипсин-ЭДТА.
2. ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (Москва, Россия): питательные среды DMEM, 199 с солями Эрла и Хэнкса, L-глутамин, растворы Версена 0,02% и Трипсина 0,25%.
3. Руксолитиниб (BLD Pharmatech, Китай).
4. FITC (fluorescein isothiocyanate, флуоресцеин изотиоцианат) Apoptosis Detection Kit II (BD, США).
5. Gibco (США): фетальная бычья сыворотка (Fetal Bovine Serum, FBS).
6. АмплиСенс (Россия): наборы реагентов для проведения ПЦР «АмплиСенс Yellow fever virus-FL», «Рибо-преп».
7. Евроген (Россия): набор реагентов для проведения ПЦР Myco Real-Time.
8. Sigma-Aldrich (США): метилцеллюлоза, агароза, ДМСО, кристаллический фиолетовый, формалин 37%, буфер для клеточного лизиса NP-40 с ингибиторами протеаз.
9. Наборы для определения уровня цитокинов IFN-α, TNF-α и IL-12 методом иммуноферментного анализа (ИФА) (Cloud Clone Corp, cat. no. IEA033Mu, SEA133Mu, SEA058Mu).
10. Реактивы для иммуногистохимического анализа: антитела anti-CD3 (Abcam, cat. no. ab135372), антитела anti-CD4 (Abcam, cat. no. ab237722), антитела anti-CD8 (Abcam, cat. no. ab217344).

2.1.1 Питательные среды

Для проведения экспериментов с клеточными культурами в основной части работы были использованы питательные среды следующего состава:

1. среда для культивирования клеток: питательная среда DMEM с добавлением 2 мМ L-глутамина, антибиотиков пенициллина (250 МЕ/мл) и стрептомицина (200 мкг/мл) и 5-10% FBS;
2. среда для культивирования вирусов: питательная среда DMEM с 2 мМ L-глутамина, антибиотиками пенициллин (250 МЕ/мл) и стрептомицин (200 мкг/мл) и 0-2% FBS.

2.1.2 Клеточные линии

В работе использовали клеточные линии, полученные из разных источников: клетки почки африканской зеленой мартышки Vero (ATCC, США), аденокарцинома поджелудочной железы человека BxPC-3 (ПраймБиоМед, Россия), карцинома поджелудочной железы человека MiaPaCa-2 (ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия), карцинома протоков поджелудочной железы человека PANC-1 (ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия), мышиная аденокарцинома поджелудочной железы Pan02 (ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия), аденокарцинома поджелудочной железы человека Capan-2 (ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия), аденокарцинома поджелудочной железы человека AsPC-1 (ФГБУН Институт Биологии Гена РАН, Россия), фибробласты легкого человека Wi-38 (ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия).

Все клеточные линии регулярно проверяли на контаминацию микоплазмой с помощью набора для обнаружения микоплазмы Myco Real-Time (Евроген). Все

линии клеток человека, использованные в этом исследовании, были аутентифицированы с помощью профилирования коротких тандемных повторов (STR) и регулярно тестировались для подтверждения их идентичности и исключения перекрестного загрязнения.

2.1.3 Вирусы

В работе использовали штамм ВЖЛ 17D из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

2.1.4 Лабораторные животные

В работе использовали самок мышей линии C57BL/6 в возрасте от шести до восьми недель, приобретенные в ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН», г. Новосибирск, Россия.

2.2 Культивирование клеточных линий и вирусов

2.2.1 Хранение и культивирование клеточных линий

Клеточные линии хранили в холодильнике при -80^{0}С или при -196^{0}С в жидком азоте. Размораживание производили при 37^{0}С с последующим центрифугированием при 2000 об/мин в течение 3 минут, далее отделяли супернатант от клеточной взвеси. Клетки ресуспензировали в среде для культивирования клеток, переносили в культуральный флакон и культивировали в среде для культивирования клеток в атмосфере 5% CO_2 при 37^{0}С до достижения клетками монослоя на 2-3 сутки.

При пассировании клеточной культуры, клетки промывали раствором Версена 0,02%, с последующим инкубированием при 37^{0}С с раствором Трипсин-Версен в соотношении 1:1 для снятия клеточной культуры с поверхности культурального флакона. После открепления клеток к ним добавляли среду для

культивирования клеток в соотношении трипсин-версен/среда 1:3. Далее клетки центрифугировали при 2000 об/мин в течение 3 минут, удаляли супернатант, ресуспензировали в среде для культивирования клеток и переносили в новый культуральный флакон. В случае использования клеточных линий Capan-2, AsPC-1, BxPC-3 для открепления клеток с поверхности флакона использовали 0,25% трипсин-ЭДТА.

2.2.2 Хранение и культивирование вирусов

Для культивирования ВЖЛ 17D использовали клеточную линию Vero. Клетки Vero культивировали в культуральных флаконах до достижения 85-90% конфлюентности. Затем из флаконов аспирировали питательную среду, вносили вирусосодержащую жидкость с титром ВЖЛ не менее 10^7 бляшкообразующих единиц в миллилитре (БОЕ/мл) и инкубировали в атмосфере 5% CO_2 при температуре 37^0C в течение 1 часа при постоянном перемешивании. Затем во флаконы добавляли среду для культивирования вируса. Клеточную линию с вирусом инкубировали в атмосфере 5% CO_2 при температуре 37^0C в течение 2-5 суток до достижения 50-70% цитопатического действия (ЦПД), после чего собирали вируссодержащую жидкость и хранили в морозильной камере при температуре -80^0C. Титр вируса оценивали методом бляшкообразующих единиц.

2.2.3 Титрование вируса методом бляшкообразующих единиц

Культуральную жидкость с вирусом, собранную в ходе эксперимента от разных клеточных линий в объеме не менее 100 мкл, хранили в криопробирках при температуре -80^0C.

Титр ВЖЛ определяли методом бляшек под покрытием 1,26% метилцеллюлозы на клеточной линии Vero, как описано в ранних протоколах [98]. Клетки высевали на 24-луночные планшеты в количестве 10^5 клеток на лунку. Через сутки формировался клеточный монослой, который использовали для титрования. На среде 199 готовили десятикратные разведения вирусных образцов

и добавляли их к клеткам в объеме 200 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в атмосфере 5% CO_2 при 37^0C в течение 1 часа при периодическом омывании клеточного монослоя вируссодержащей жидкостью. Затем в каждую лунку вносили 1 мл 1,26% метилцеллюлозы в среде 199 с солями Эрла и Хэнкса в соотношении 2:1 с добавлением 0,1% гентамицина и 2% FBS. Далее планшеты инкубировали в течение шести суток в атмосфере 5% CO_2 при 37^0C. На седьмой день планшет дважды промывали PBS и выдерживали с 96% этиловым спиртом в течение часа. Затем панель проявляли 0,1% кристаллическим фиолетовым.

Количество бляшек подсчитывали в каждом разведении для определения количества бляшкообразующих единиц на мл (БОЕ/мл). Титр рассчитывали по формуле (1):

$$\frac{\Sigma N}{d \times V \times n} = \text{БОЕ/мл}, \quad (1)$$

где N – количество бляшек в одной лунке для соответствующего разведения;

n – количество лунок для одного разведения, шт;

V – объем пробы (дозы для заражения), мл;

d – разведение (в виде 10^{-x}).

2.3 Определение чувствительности клеточных линий к вирусам

2.3.1 Оценка жизнеспособности клеток по цитопатогенному действию

Прижизненный мониторинг за пролиферацией и гибелью клеток осуществляли с помощью xCELLigence Real-Time Cell Analysis (Agilent Technologies, США). Снятие сигнала производили с шагом 2 ч в течение 7 дней после инфицирования. С использованием программного обеспечения Prism 8 (GraphPad Prism Software, США) осуществляли анализ данных с выводом средней кривой по лункам (n=8) и погрешностей стандартного отклонения (SD).

Опухолевые клетки каждой клеточной линии РПЖ культивировали в двух флаконах Т25 (25 см²) в среде для культивирования клеток при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO_2 до достижения 70–80% конфлюентности. Затем

культуральную среду аспирировали из обеих колб. В одну колбу добавляли 2 мл свежей среды DMEM, содержащей 1 мкМ руксолитиниба, а в другую 2 мл среды DMEM без препарата руксолитиниба. Клетки инкубировали в течение 3 часов при 37°C и 5% CO_2.

После предварительной обработки клетки отделяли с помощью 0,25% раствора трипсина-ЭДТА в сбалансированном солевом буфере Хэнкса, ресуспендировали в среде DMEM с добавлением или без добавления 1 мкМ руксолитиниба и разливали в четыре пробирки. Две пробирки инокулировали вакцинным штаммом ВЖЛ 17D с множественностью инфекции (MOI) 1; в контрольные пробирки добавляли эквивалентный объем среды DMEM. Затем клетки высевали на планшет E-Plate 16 (система Agilent xCELLigence RTCA (real-time cell analysis, анализ клеток в реальном времени)) с плотностью $1x10^6$ клеток/мл, добавляя по 100 мкл клеточной суспензии в каждую лунку в соответствии с экспериментальной схемой. Планшеты подключали к системе Agilent и инкубировали при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO_2 с регистрацией клеточного индекса (пролиферация) в режиме реального времени каждые 2 часа в течение 7 дней.

2.3.2 Оценка репликативной активности вируса желтой лихорадки в клеточных линиях рака поджелудочной железы

Опухолевые клетки культивировали в 12-луночных планшетах в среде для культивирования клеток при 37°C и 5% CO_2 до достижения 70–80% конфлюентности. Затем культуральную среду удаляли, и в каждую лунку добавляли 400 мкл среды DMEM, содержащей руксолитиниб в конечной концентрации 0,1, 0,5, 1 или 5 мкМ, в соответствии со схемой эксперимента. В контрольные лунки добавляли 400 мкл среды DMEM без руксолитиниба. Клетки инкубировали в течение 3 часов при 37°C и 5% CO_2 . После этого в каждую лунку добавляли 400 мкл вирусной суспензии, содержащей ВЖЛ 17D в титре 10^7 БОЕ/мл. В лунки отрицательного вирусного контроля добавляли эквивалентный объем

среды DMEM. Планшеты инкубировали при непрерывном перемешивании в течение 1 часа при 37°C и 5% CO_2 . Затем инокулят удаляли, и в каждую лунку добавляли 2 мл свежей среды для культивирования вирусов, содержащего руксолитиниб в концентрации 0,1, 0,5, 1 или 5 мкМ (за исключением лунок отрицательного контроля руксолитиниба, в которые добавляли эквивалентный объем DMEM). Затем клетки инкубировали в течение 7 дней при 37°C и 5% CO_2 . Цитопатический эффект оценивали ежедневно с помощью световой микроскопии, а культуральную надосадочную жидкость из лунок собирали для оценки титра вируса методом бляшкообразующих единиц и количественной ПЦР в реальном времени.

2.3.3 Качественная оценка апоптоза

Апоптоз в клетках Capan-2, AsPC-1 и BxPC-3 оценивали с использованием набора для обнаружения апоптоза Annexin V–FITC APO Detection Kit II, в соответствии с инструкциями производителя с небольшими изменениями. Клетки высевали в 12-луночные планшеты и культивировали, как описано в разделе 2.3.2. На 5-й и 7-й дни после обработки вирусом культуральную среду отбирали из двух лунок для каждого условия, и клетки дважды промывали PBS. Рабочий раствор для окрашивания готовили путем разведения FITC-конъюгированного Annexin V в соотношении 1:10 в буфере для связывания Annexin V (100 мкл FITC Annexin V смешивали с 900 мкл буфера для связывания на две лунки). Затем в каждую лунку добавляли 500 мкл раствора для окрашивания, и планшеты инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре в темноте. После инкубации раствор для окрашивания удаляли аспирацией, клетки промывали один раз буфером для связывания Annexin V, и в каждую лунку добавляли 500 мкл свежего буфера для связывания. Образцы немедленно исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа при увеличении ×100 с использованием набора фильтров FITC (возбуждение ~488 нм, эмиссия ~520 нм). Клетки, демонстрирующие связанную с

мембраной флуоресценцию FITC, считались Annexin V-положительными, что указывает на экстернализацию фосфатидилсерина и апоптоз.

2.3.4 Микроскопия

Визуальный осмотр, фотографии клеток осуществляли с помощью инвертированного биологического микроскопа OLYMPUS CKX53 (Olympus Corporation, Япония), оснащенного цифровой камерой и программным обеспечением ADFImageCapture версии 4.11.21522.20221011 [98].

2.3.5 Определение инфекционных частиц вируса желтой лихорадки в гомогенатах из опухоли, мозга и селезенки мышей

Анализ проводили для оценки наличия инфекционного вируса в гомогенатах опухоли, мозга и селезенки, собранных от мышей с опухолями Pan02, получавших виротерапию ВЖЛ 17D в комбинации с руксолитинибом или без него. Образцы опухолей собирали у мышей на 3 и 5 сутки после терапии ВЖЛ 17D у групп с комбинированной терапией и монотерапией вирусом, после чего гомогенизировали. Образцы мозга и селезенки собирали у мышей групп с комбинированной терапией и монотерапией вирусом после эвтаназии по гуманной точке, после чего гомогенизировали. К суточному монослою клеточной линии Vero в 24-луночном планшете добавляли гомогенат в объеме 200 мкл/лунка и выдерживали в течение часа при периодическом омывании клеточного монослоя гомогенатом. Затем в каждую лунку вносили 1 мл 1,26% метилцеллюлозы в среде 199 с солями Эрла и Хэнкса в соотношении 2:1 с добавлением 0,1% гентамицина и 2% FBS. Далее планшеты инкубировали в течение шести суток в атмосфере 5% CO2 при 37^0C, после чего проводили анализ инфекционного титра ВЖЛ 17D согласно ранее описанному протоколу в разделе 2.2.3.

2.4 Определение РНК вирусов методом ПЦР в режиме реального времени

2.4.1 Сбор и хранение материалов для ПЦР

Культуральную жидкость с вирусом, собранную в ходе эксперимента от разных клеточных линий в объеме не менее 100 мкл, хранили в криопробирках при температуре -80^{0}С.

Опухоли хранили в PBS при температуре -80^{0}С. Перед использованием опухоли гомогенизировали растиранием в ступках с добавлением PBS. Полученные суспензии центрифугировали при параметрах: 13000 об/мин, 5 мин. Опухолевый экссудат (надосадочную жидкость) забирали и использовали для выделения РНК.

2.4.2 Выделение РНК / получение кДНК

Выделение РНК вируса из полученного супернатанта, сыворотки крови или культуральной жидкости проводили с помощью набора реагентов «Рибо-преп» из 100 мкл материала, а обратную транскрипцию (получение кДНК) проводили с помощью набора «Реверта-L» согласно инструкции производителя (АмплиСенс, Россия).

2.4.3 Определение РНК вируса желтой лихорадки методом ПЦР в режиме реального времени

Количественную ПЦР в режиме реального времени проводили на термическом циклере CFX-96 (BioRad, США) с использованием каналов детекции (FAM, HEX) и определением цикла детекции (Ct). Все действия совершали согласно инструкции производителя. Для определения использовали набор реагентов «АмплиСенс *Yellow fever virus-FL*». В качестве стандартов использовали предварительно выделенную РНК штамма ВЖЛ 17D в титрах 1х10^6, 1х10^5, 1х10^4, 1х10^3 БОЕ/мл.

2.5 Определение противоопухолевой активности комбинации штамма 17D вируса желтой лихорадки с руксолитинибом на сингенной модели Pan02

Самки мышей линии C57BL/6-SPF, возраст 6-8 недель были приобретены в питомнике (SPF-виварий, ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, РФ). Работа с животными проводилась строго согласно Протоколу №28082025 от 28.08.2025 г, одобренному этическим комитетом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). Мыши содержались в клетках со сплошным дном по 4-5 особей в условиях, согласно особенностям их жизнедеятельности (наличие материала для строительства гнезда, наличие мест для укрытия, доступ к воде и еде, проведение хендлинга и т.д.). Животные после поступления прошли карантин и адаптировались к новым условиям содержания в течение двух недель перед началом эксперимента.

Эксперимент был проведен в двух биологических повторах, каждый из которых включал 60 мышей. Образцы опухолей, крови, мозгов, селезенок для ПЦР и ИФА исследований были использованы из первого биологического повтора. Количество мышей в экспериментальных группах было по 12 особей. Отбор мышей проводили по критериям включения: попадание в терапевтическое окно (формирование опухоли до 14 дней), размер опухоли 5-6 мм, масса мышей 18-21 г, отсутствие признаков болезни, боли, дистресса. Образцы опухолей из второго биологического повтора были использованы для и иммуногистохимических (ИГХ) исследований иммунного ответа мышей на терапию.

2.5.1 Формирование сингенной модели Pan02 в мышах C57BL/6

Клетки аденокарциномы протоков поджелудочной железы мыши Pan02 с использованием игл, размером 29G, имплантировали подкожно 1×10^6 клеток в 100 мкл PBS в левое бедро мышей. Мониторинг состояния животных проводили ежедневно. Объем опухоли измеряли три раза в неделю с помощью

штангенциркуля в двухкратной повторности. Объем опухоли рассчитывали по следующей формуле (2):

$$V = \frac{a * b^2}{2}, \qquad (2)$$

где

a — большее из двух измерений;

b — меньшее из двух измерений.

Терапию начинали проводить по достижении опухоли размера 5-6 мм в диаметре (примерно 100 мм^3), который является оптимальным для внутриопухолевого введения препарата.

2.5.2 Терапия руксолитинибом

В группах животных с комбинированной терапией за 24 часа и за 3 часа до введения препарата ВЖЛ 17D мышам вводили внутрибрюшинно 100 мкл рабочего раствора препарата руксолитиниба с концентрацией 10 мг/мл. Затем руксолитиниб в той же концентрации повторно вводили через 24 часа и 48 часов после введения препарата ВЖЛ 17D. В контрольной группе животных для оценки эффекта руксолитиниба мышам вводили внутрибрюшинно 100 мкл рабочего раствора препарата руксолитиниба с концентрацией 10 мг/мл в те же временные точки, что и в группе комбинированной терапии.

Изначально порошок руксолитиниба с чистотой 98% был растворен в чистом ДМСО до концентрации 100 мг/мл. Рабочий раствор для внутрибрюшинного введения с концентрацией руксолитиниба 10 мг/мл включал 40% ПЭГ 400, 5% Tween 80, 45% PBS.

2.5.3 Виротерапия опухолей Pan02 штаммом 17D вируса желтой лихорадки

После формирования опухолей Pan02 мышам внутриопухолево, используя иглу 29G, вводили очищенный препарат ВЖЛ 17D с титром 10^5 БОЕ/100 мкл, растворенный в PBS. Группам без виротерапии (контроль) интратуморально

вводили 100 мкл PBS. Мониторинг состояния животных проводили ежедневно. Объем опухоли измеряли три раза в неделю и рассчитывали, используя формулу 2 (Раздел 2.5.1).

При достижении гуманной конечной точки, определяемой как опухоль более 10 мм в двух измерениях или значительное ухудшение здоровья животного, потенциально вызывающее сильные страдания (атрофия конечностей, отказ от еды или критическая потеря веса), мышей подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации. Перед эвтаназией мышам подавали анестезию с помощью системы анастезии для лабораторных грызунов R540 (RWD LifeScience) с использованием 3% изофлуорана с последующим снижением до 2,5%, затем собирали кровь в пробирки с гелем-активатором свертывания крови. После эвтаназии проводили вскрытие, осматривали органы на наличие метастазов и собирали образцы опухоли и региональных лимфоузлов. Опухоли вместе с близлежащими лимфатическими узлами иссекали и фиксировали в забуференном 10% формальдегиде для гистологического исследования или в чистом PBS для ПЦР-исследований.

Эффективность терапии оценивали по кинетике роста опухоли, общему состоянию здоровья мыши (включающего переносимость инъекции, клинический анализ крови, изменения массы, оценки поведенческого состояния животного) и времени дожития до гуманной точки.

2.6 Исследование опухолей и крови мышей

2.6.1 Реакция нейтрализации

Для анализа титров нейтрализующих антител к ВЖЛ у мышей использовали метод бляшкообразования. Сыворотку крови мышей, с терапией только ВЖЛ или ВЖЛ с руксолитинибом, собирали перед эвтаназией в конце эксперимента. Сыворотку изначально разводили в 10 раз, затем проводили три или четыре трехкратных разведения и смешивали их с ВЖЛ 17D в дозе $3x10^3$ БОЕ/мл в соотношении 1:1 с последующей инкубацией в течение 1 ч при 37^0C. В качестве

контроля вируса использовали штамм ВЖЛ 17D в дозе 1,5x10^3 БОЕ/мл, в качестве контроля клеток - бессывороточную среду 199. Полученными смесями инфицировали монослой клеток Vero в 12-луночных планшетах по 100 мкл/лунка с инкубацией в течение 1ч в атмосфере 5% CO_2 при 37^0C, периодически омывая монослой клеток. Затем добавляли 1 мл покрытия, состоящего из 1,25% метилцеллюлозы, среды 199 с солями Эрла и Хэнкса в соотношении 2:1, 0,1% гентамицина и 2% FBS. Через семь дней после инфицирования среду удаляли, клетки дважды промывали PBS, фиксировали 95% этанолом в течение 1 часа и окрашивали 0,1% кристаллическим фиолетовым. После подсчитывали количество бляшек для каждого разведения для расчета титра нейтрализующих антител. Расчет производили в логарифмических единицах методом Рида-Менча по формуле (3):

$$lg(nAB) = \lg(A) + (f \times \lg(d)), \qquad (3)$$

где A — разведение, при котором количество бляшек составляет менее 50% по сравнению с контролем;

f — логарифмическая разность (коэффициент интерполяции), рассчитываемая по формуле (4):

$$f = (50\% - M1) / (M2 - M1), \qquad (4)$$

где

M1 — количество бляшек менее 50% по сравнению с контролем;

M2 — количество бляшек более 50% по сравнению с контролем;

d — коэффициент разбавления.

Каждый образец исследовали в трёх параллельных повторностях. Средний геометрический титр (СГТ) нейтрализующих антител в исследуемых группах рассчитывали путём усреднения логарифмов индивидуальных титров с последующим обратным преобразованием. Нижний предел определения титра нейтрализующих антител соответствовал разведению сыворотки 1:10.

2.6.2 Исследования уровня цитокинов в опухолях Pan02 и крови мышей методом иммуноферментного анализа

Для исследований методом ИФА содержания цитокинов (IFNa, IL-12, TNFa) в крови у мышей перед эвтаназией под анестезией изофлураном собирали кровь в пробирки с гелем-активатором свертывания крови. Затем образцы инкубировали 60 минут при комнатной температуре, после чего центрифугировали со скоростью 8000g в течение 5 минут. Чистую сыворотку разбивали на аликвоты по 50 мкл и хранили при температуре -80 °C.

Образцы опухолей вырезали на 7, 14, 21 и более сутки (при достижении размера опухоли гуманной точки), ополаскивали холодным PBS, собирали в стерильные пробирки, взвешивали и немедленно замораживали для последующего хранения при температуре -80 °C. Для гомогенизирования опухолей в предварительно охлажденную ступку наливали 1-2 мл жидкого азота, помещали в ступку образец опухоли и растирали пестиком до получения порошкообразной однородной массы. Затем в ступку с гомогенизированным образцом добавляли предварительно охлажденный буфер для клеточного лизиса NP-40, содержащий ингибиторы протеаз. Объем добавленного лизис буфера рассчитывался исходя из массы опухоли перемноженной на 10х. Затем гомогенизированный образец опухоли в лизис буфере переносили в стерильную пробирку и инкубировали 60 минут при температуре +4 °C. Следующим шагом образцы центрифугировали при скорости 10 000g в течение 10 минут, супернатант отбирали и аликвотировали в новые пробирки по 100 мкл. Аликвоты хранили при температуре -80 °C.

Образцы опухолей и крови анализировали методом ИФА с использованием наборов для детекции мышиных цитокинов IFNa (Cloud-Clone Corp., MEA033Mu), TNFa (Cloud-Clone Corp., SEA133Mu), IL-12 (Cloud-Clone Corp., SEA111Mu) согласно инструкции производителя.

2.6.3 Морфологический и иммуногистохимический анализ опухолей

Гистологические исследования проводились под руководством д.м.н., заведующего лабораторией гистологии и иммуногистохимии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет)

Демяшкина Григория Александровича. Для гистологической оценки были выбраны три временные точки, отражающие основные фазы противоопухолевого ответа: 7-й день, соответствующий ранней фазе репликации вируса и активации врожденного иммунитета; 14-й день, соответствующий точке максимального объема опухоли перед началом лизиса; 21-й день, соответствующие активной фазе лизиса в группе комбинированной терапии и ожидаемому пику инфильтрации цитотоксических Т-лимфоцитов. В каждой временной точке шесть мышей из каждой экспериментальной группы были эвтаназированы для сбора тканей. Были включены следующие группы: мыши с опухолями, не получавшие лечения; мыши с опухолями, получавшие лечение только ВЖЛ 17D (монотерапия); и мыши с опухолями, получавшие комбинированное лечение ВЖЛ 17D и руксолитинибом. При вскрытии у каждого животного были собраны первичная опухоль, ближайший дренирующий лимфатический узел и селезенка. Ткани фиксировали в 10% забуферном растворе формалина (pH 6,8–7,2), проводили дегидратацию в возрастающей концентрации спирта, просветляли в ксилоле и заливали в парафин в соответствии со стандартными гистологическими процедурами. Для последующего окрашивания готовили парафиновые срезы толщиной 3-4 мкм. Для рутинного гистологического (морфологического) исследования срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимическое окрашивание проводили с использованием стандартного автоматизированного протокола на платформе для окрашивания Ventana Benchmark XT (Ventana Medical Systems, США) с помощью набора ultra-View Universal DAB Detection Kit (Ventana, США). Для исследования использовали следующие первичные антитела: анти-CD3 (Abcam, кат. № ab135372), анти-CD4 (Abcam, кат. № ab237722) и анти-CD8 (Abcam, кат. № ab217344). Иммуногистохимическое окрашивание проводили для всех экспериментальных и контрольной групп в каждой временной точке. Количественный анализ иммуногистохимического окрашивания выполняли с помощью программного обеспечения QuPath v.0.7.0 (Великобритания). Количество положительно окрашенных клеток определяли как число иммунореактивных клеток на 1 мм²

площади ткани. Для каждого маркера плотность клеток оценивали в репрезентативных срезах опухоли с использованием одинаковых параметров анализа во всех группах для обеспечения сопоставимости.

2.7 Статистический анализ

Для анализа данных использовали программное обеспечение Prism 8 (GraphPad Prism Software, США). Для анализа статистических различий между двумя группами применяли двусторонний t - критерий Стьюдента. Для анализа статистических различий между тремя или более группами использовали дисперсионный анализ one-way ANOVA с поправкой Dunnett’s для множественных сравнений. Перед проведением анализа с использованием t - критерия Стьюдента или ANOVA все выборки проверяли на нормальность распределения. В случае выборок с ненормальным распределением применяли критерий Краскела-Уоллиса. Для анализа влияния двух факторов применяли двухфакторный дисперсионный анализ two-way ANOVA с поправкой Sidak на множественные сравнения. Для долей рассчитывали двусторонние 95%-ные доверительные интервалы (ДИ) методом Вальда. Статистическую значимость кривых выживаемости Каплана-Майера определяли с помощью логрангового критерия (критерия Мантеля-Кокса). Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1 Оценка онколитического действия комбинации штамма 17D вируса желтой лихорадки с руксолитинибом на панели клеточных линий рака поджелудочной железы

Для оценки онколитической активности вакцинного штамма ВЖЛ 17D в комбинации с ингибитором JAK1/2-киназ руксолитинибом была сформирована панель из шести клеточных линий РПЖ с различными молекулярно-генетическими характеристиками: мышиная линия Pan02, а также пять линий аденокарциномы поджелудочной железы человека – PANC-1, MiaPaCa-2, Capan-2, AsPC-1 и BxPC-3. Выбор данных линий был обусловлен их различиями по ключевым молекулярным детерминантам, определяющим базальную активность JAK/STAT-сигналинга и пермиссивность к онколитическим вирусам: варианту мутации гена KRAS (G12D, G12V, G12C, WT), статусу гена TP53 (WT, GOF-мутации R273H и R248W, p53-null), статусу гена CDKN2A (WT или гомозиготная делеция) и уровню экспрессии компонентов интерферонового рецептора IFNAR1/2c (Таблица 1). Также в панель была добавлена условно-нормальная клеточная линия фибробластов легкого человека Wi-38 для оценки опухолевой селективности изучаемой комбинации ВЖЛ 17D с руксолитинибом.

Онколитическую активность оценивали путем мониторинга пролиферации опухолевых клеток в режиме реального времени с помощью системы xCELLigence RTCA на протяжении 7 суток после инфицирования ВЖЛ 17D при MOI = 1 в комбинации с руксолитинибом в концентрации 1 мкМ. Вирусную репликацию оценивали по вирусным титрам в культуральной среде методом бляшкообразования и количественной ПЦР в реальном времени.

Таблица 1 - Молекулярно-генетические характеристики клеточных линий РПЖ

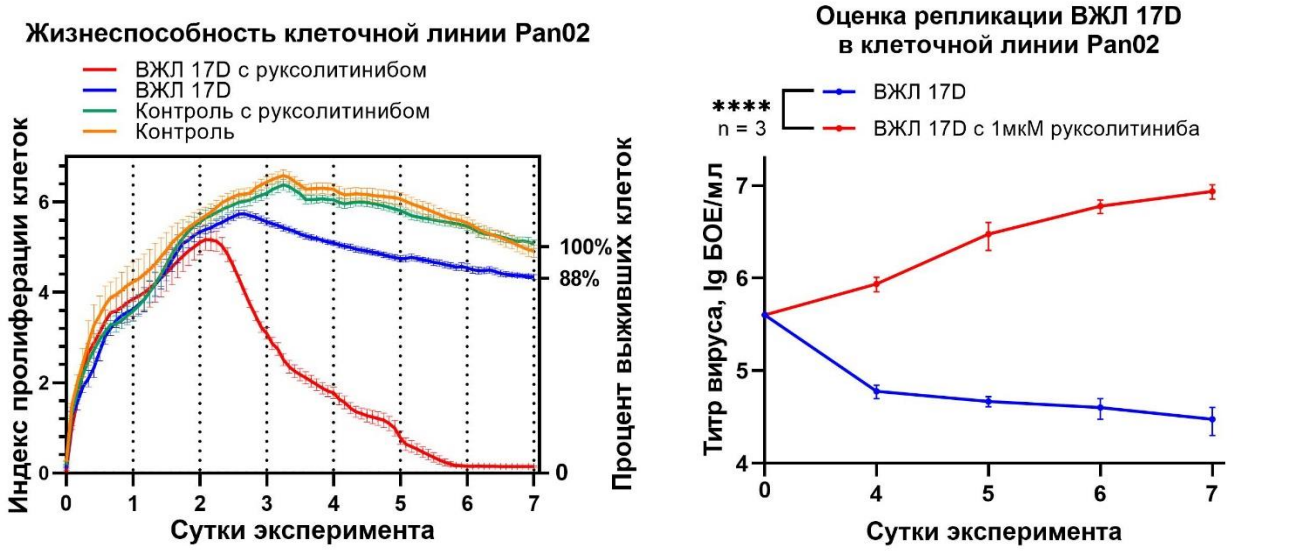
Клеточная линия	**Организм**	**Мутация гена KRAS**	**Мутация гена TP53**	**Мутация гена SMAD4**	**Мутация гена CDKN2A**	**Базальная активность JAK/STAT**	**Вирусная пермиссивность**	**Количество IFNAR1/2 рецепторов на поверхности клетки**	**Ссылки**
PAN02	мышь	WT	WT	SMAD4-null	WT	умеренная	умеренная	нет данных	[99]
PANC-1	человек	G12D (гетерозиготная)	R273H (гетерозиготная)	WT	гомозиготная делеция	умеренная	умеренная	низкое	[100,101]
MiaPaCa-2	человек	G12C (гомозиготная)	R248W (гомозиготная)	WT	гомозиготная делеция	очень низкая	очень высокая	умеренно	[101,102]
Capan-2	человек	G12V (гомозиготная)	WT	WT	гомозиготная делеция*	высокая	очень низкая	высокое	[103,104]
AsPC-1	человек	G12D (гомозиготная)	C135AfsTer35 (p53-null)	WT*	гомозиготная делеция	высокая	низкая	умеренное	[105,106]
BxPC-3	человек	WT	Y220C (гомозиготная)	гомозиготная делеция	гомозиготная делеция	высокая	низкая	высокое	[106,107]
Wi-38	человек	WT	WT	WT	WT	нет данных	умеренная	нет данных	[108,109]

* данные в литературе противоречивы

3.1.1 Оценка влияния руксолитиниба на репликативную активность и цитопатическое действие штамма 17D вируса желтой лихорадки на панели клеточных линий рака поджелудочной железы

3.1.1.1 Оценка влияния руксолитиниба на репликативную активность и цитопатическое действие штамма 17D вируса желтой лихорадки в клетках Pan02

Комбинированное воздействие руксолитиниба (1 мкМ) и ВЖЛ 17D при MOI = 1 на мышиные опухолевые клетки Pan02 привело к практически полной гибели опухолевых клеток к 6-му дню после инфицирования, тогда как заражение только ВЖЛ 17D привело к гибели не более 12% клеток (Рисунок 4А). Титр вируса при комбинированном воздействии увеличивался на несколько логарифмов к 7-му дню, тогда как титр вируса при воздействии только ВЖЛ 17D стабильно снижался на протяжении всего времени (Рисунок 4Б).



А Б

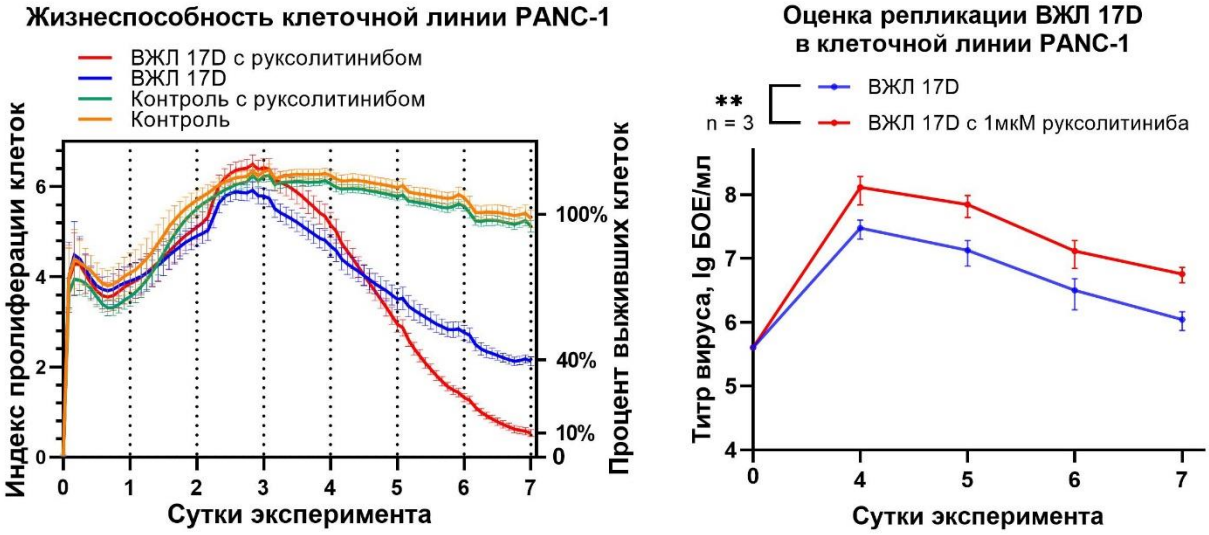
Рисунок 4 - (А) Жизнеспособность клеток Pan02 после контрольной обработки, обработки руксолитинибом (1мкМ), заражения ВЖЛ 17D (MOI = 1) и комбинированной обработки руксолитинибом (1 мкМ) и заражения ВЖЛ 17D (MOI = 1). (Б) Репликативная активность ВЖЛ 17D в культуре клеток Pan02 (статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа Two-way ANOVA с поправкой Sidak на множественные сравнения; n = 3; **** $p < 0{,}0001$)

Мы предполагаем, что повышенная онколитическая активность ВЖЛ 17D, наблюдаемая в клетках Pan02, в первую очередь обусловлена видоспецифическими взаимодействиями белков NS5-STAT2. Клетки Pan02 способны экспрессировать мышиный белок STAT2 (mSTAT2), с которым белок ВЖЛ NS5 связывается неэффективно, в отличие от белка STAT2 человека [70]. В отсутствие обработки руксолитинибом поддерживается базальный уровень сигнализации IFN-I типа. Предположительно, инфицирование клеток ВЖЛ 17D индуцирует интенсивную экспрессию ISG, включая гены MX1, OAS и PKR, которые ограничивают репликацию вируса. Руксолитиниб, механизм действия которого заключается в ингибировании JAK1/2-киназ, предотвращает фосфорилирование и активацию mSTAT2 в ответ на сигнализацию интерферона, тем самым подавляя экспрессию критически важных ISG. Благодаря эффективному подавлению JAK/STAT-сигнализации, ВЖЛ 17D реплицируется с минимальными противовирусными ограничениями, что приводит к увеличению вирусного титра на несколько порядков (до 10^7 БОЕ/мл) и, следовательно, к полной гибели клеток (Рисунок 4).

3.1.1.2 Оценка влияния руксолитиниба на репликативную активность и цитопатическое действие штамма 17D вируса желтой лихорадки в клетках PANC-1

Клеточная линия PANC-1 происходит из первичной опухоли поджелудочной железы человека и содержит мутации KRAS G12D и p53 R273H [99,100]. Комбинированное воздействие руксолитиниба (1 мкМ) и ВЖЛ 17D при MOI = 1 на клеточную линии рака поджелудочной железы человека PANC-1 привело к практически полной гибели опухолевых клеток (90%) к 7-му дню после инфицирования, тогда как заражение только вирусом вызвало гибель не более 60% клеток (Рисунок 5А). Примечательно, что руксолитиниб сам по себе не оказывал влияния на пролиферацию клеток PANC-1. Титр ВЖЛ 17D (БОЕ/мл) в супернатантах культуры PANC-1 был примерно в 6 раз выше в присутствии

руксолитиниба по сравнению с обработкой только вирусом и достигал пика на 4-й день (Рисунок 5Б).



А Б

Рисунок 5 - (А) Жизнеспособность клеток PANC-1 после контрольной обработки, обработки руксолитинибом (1мкМ), заражения ВЖЛ 17D (MOI = 1) и комбинированной обработки руксолитинибом (1 мкМ) и заражения ВЖЛ 17D (MOI = 1). (Б) Репликативная активность ВЖЛ 17D в культуре PANC-1 (статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа Two-way ANOVA с поправкой Sidak на множественные сравнения; n = 3; ** $p < 0,01$)

Белок NS5 ВЖЛ способен связываться с hSTAT2 в клетках PANC-1, причем необходимое для этого взаимодействия убиквитинирование NS5 зависит от предварительной активации сигнального пути IFN-I типа [70]. Усиление репликации вируса при добавлении руксолитиниба позволяет предположить, что NS5-опосредованный антагонизм интерферонового сигналинга не обеспечивает полного подавления противовирусной защиты клеток PANC-1. Таким образом, в исследуемых условиях эндогенный интерфероновый ответ ограничивает репликацию вируса, но не предотвращает ее. Снижение вирусного титра после 4-го дня, вероятно, связано с цитопатическим действием вируса и гибелью 60% клеток, наблюдаемой к 7-му дню (Рисунок 5).

Кроме того, клеточная линия PANC-1 по литературным данным демонстрирует выраженную гетерогенность в экспрессии рецепторов IFNAR1 и IFNAR2 на поверхности клеток. В связи с этим возникают клеточные

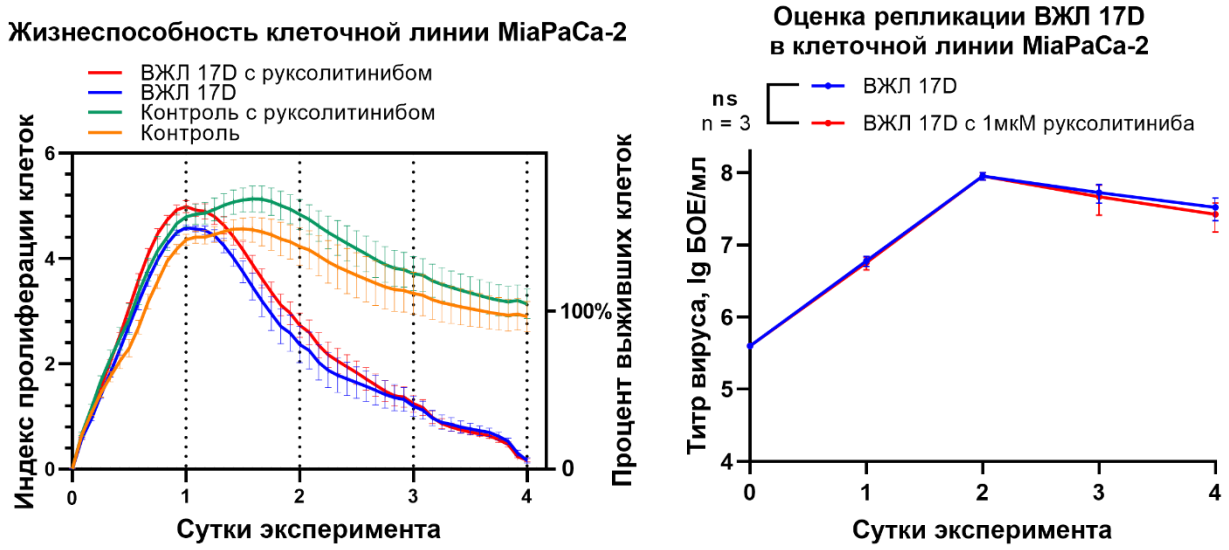
субпопуляции с высоким и низким уровнями экспрессии рецептора IFN-I типа, которые связаны с различиями в фосфорилировании STAT и чувствительности к IFN-I типа [95]. Следовательно, субпопуляция клеток PANC-1 с высоким уровнем экспрессии IFNAR1/2 демонстрирует сильный ответ на IFN-I типа и повышенную устойчивость к онколитическим вирусам, тогда как субпопуляции с низким уровнем экспрессии IFNAR1/2 более пермиссивны к вирусу. При воздействии ВЖЛ 17D в отсутствии руксолитиниба, вероятно, вирус преимущественно инфицирует субклоны с низким уровнем экспрессии IFNAR1/2, а клетки с высоким уровнем экспрессии IFNAR1/2 остаются относительно устойчивыми. При добавлении руксолитиниба JAK/STAT-зависимая резистентность в субклонах с высоким уровнем экспрессии IFNAR1/2 ослабляется, что приводит к усилению репликации ВЖЛ 17D и последующей гибели клеток. Однако следует отметить, что предложенный механизм онколитического действия на субклональные популяции клеток с гетерогенным уровнем экспрессии IFNAR1/2 в PANC-1 является предположением, основанным на опубликованных данных по характеристике клеточных линий, а не прямым измерением в нашей экспериментальной системе [95].

3.1.1.3 Оценка влияния руксолитиниба на репликативную активность и цитопатическое действие штамма 17D вируса желтой лихорадки в клетках MiaPaCa-2

Клеточная линия MiaPaCa-2 происходит из первичной опухоли поджелудочной железы и содержит мутации KRAS и p53, но имеет значительно более низкую базальную активность JAK/STAT и ISG по сравнению с Capan-2 и AsPC-1 [101,110]. MiaPaCa-2 классифицируется как классический подтип РПЖ (в отличие от базальноподобного подтипа клеточных линий Capan-2 и AsPC-1) и является более дифференцированной и менее агрессивной. Специфическое сочетание мутации KRAS G12C (связанной с более слабой активацией JAK/STAT

по сравнению с G12D или G12V) и мутации p53 R248W в линии MiaPaCa-2 может способствовать снижению базального ответа на интерферон [111].

Добавление руксолитиниба в нашей экспериментальной системе не усиливало цитопатический эффект ВЖЛ 17D на клетки MiaPaCa-2. Комбинированное воздействие руксолитиниба (1 мкМ) и ВЖЛ 17D при MOI = 1 привело к полной гибели опухолевых клеток к 4-му дню после инфицирования, аналогично тому, что наблюдалось в клетках, инфицированных только ВЖЛ 17D (Рисунок 6А). Титр вируса в клетках, получавших комбинированную обработку, был аналогичен титру в клетках, получавших обработку только вирусом, и достигал пика на 2-й день, после чего снижался, что связано с гибелью клеток.



А Б

Рисунок 6 - (А) Жизнеспособность клеток MiaPaCa-2 после контрольной обработки, обработки руксолитинибом (1мкМ), заражения ВЖЛ 17D (MOI = 1) и комбинированной обработки руксолитинибом (1 мкМ) и заражения ВЖЛ 17D (MOI = 1). (Б) Репликативная активность ВЖЛ 17D в культуре MiaPaCa-2 (статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа Two-way ANOVA с поправкой Sidak на множественные сравнения; n = 3; ns — статистически незначимо)

Отсутствие усиления вирусного ЦПД в ответ на воздействие руксолитинибом в клетках MiaPaCa-2 связано с дефектной системой клеточного ответа на интерферон, что согласуется с имеющимися данными в литературе [103]. Клетки демонстрируют самую низкую базальную экспрессию компонентов интерфероновой сигнализации (STAT1, STAT2, IRF-9) среди изученных линий

РПЖ и практически отсутствующую базальную экспрессию ISG. Это позволяет ВЖЛ 17D реплицироваться в клетках MiaPaCa-2 с минимальными ограничениями: в нашем эксперименте титр ВЖЛ 17D достиг 10^8 БОЕ/мл независимо от присутствия руксолитиниба (Рисунок 6Б). Таким образом, ингибирование JAK1/2-киназ не усиливает репликацию ВЖЛ 17D в отсутствие функциональной интерфероновой сигнализации, что делает использование руксолитиниба избыточным в данном случае.

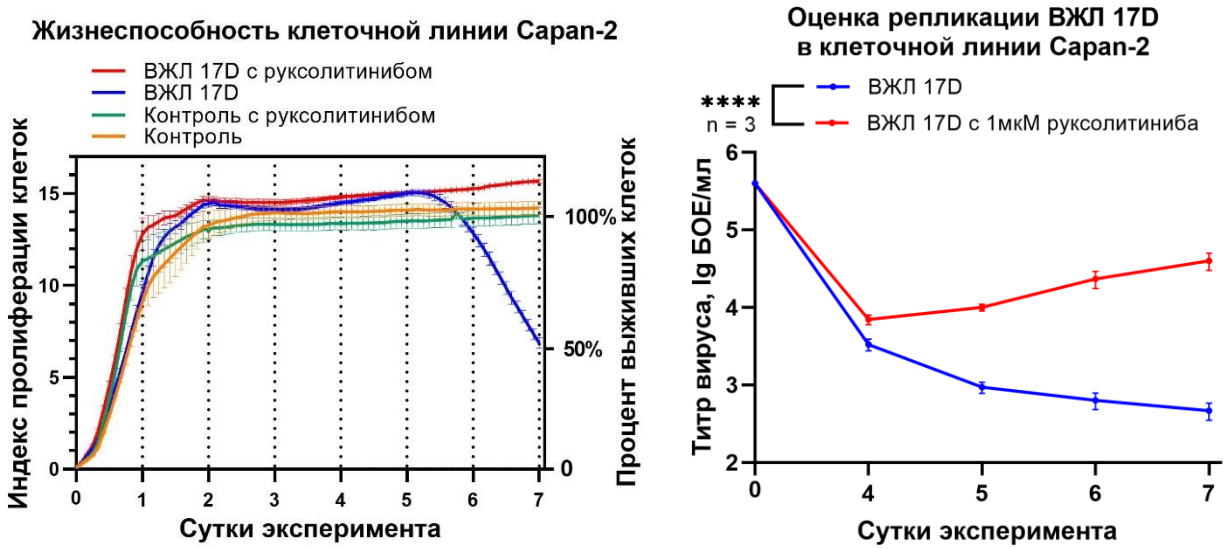
Эти результаты представляют собой важный отрицательный контроль, демонстрирующий, что эффект терапии ВЖЛ 17D, усиленной руксолитинибом, зависит от потенциального ингибирования интерферонового ответа в различных типах клеток РПЖ. В клеточных линиях с изначально дисфункциональной интерфероновой сигнализацией ингибирование JAK-киназ является нецелесообразной стратегией.

3.1.1.4 Оценка влияния руксолитиниба на репликативную активность и цитопатическое действие штамма 17D вируса желтой лихорадки в клетках Capan-2

Клеточная линия Capan-2 имеет мутацию KRAS G12V, дикий тип гена TP53, интактный ген SMAD4 и частично измененный ген CDKN2A. Важно отметить, что Capan-2 классифицируется как подтип РПЖ с высокой базальной экспрессией множества ISG, включая белки MX1, EPSTI1, XAF1 и GBP1 [95]. Эта клеточная линия, наряду с BxPC-3, обладает самой высокой базальной активностью пути JAK/STAT среди всех изученных линий РПЖ человека.

Комбинированное воздействие руксолитинибом (1 мкМ) и вирусом ВЖЛ 17D на клетки Capan-2 не привело к гибели опухолевых клеток к 7-му дню после инфицирования, в то время как воздействие только ВЖЛ 17D привело к гибели 50% опухолевых клеток к 7-му дню (Рисунок 7А). Присутствие руксолитиниба (1 мкМ) в культуральной среде не влияло на пролиферацию клеток, аналогично тому, что наблюдалось с другими линиями клеток РПЖ. Было установлено, что ВЖЛ 17D в

присутствии руксолитиниба не вызывал цитопатического эффекта на клетках Capan-2. Однако его титры в культуральной среде клеток, обработанных руксолитинибом, увеличивались с 4-го по 7-й день, в отличие от клеток, обработанных только вирусом, где его титры снижались к 7-му дню (Рисунок 7Б).



А Б

Рисунок 7 - (А) Жизнеспособность клеток Capan-2 после контрольной обработки, обработки руксолитинибом (1мкМ), заражения ВЖЛ 17D (MOI = 1) и комбинированной обработки руксолитинибом (1 мкМ) и заражения ВЖЛ 17D (MOI = 1). (Б) Репликативная активность ВЖЛ 17D в культуре Capan-2 (статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа Two-way ANOVA с поправкой Sidak на множественные сравнения; n = 3; **** $p < 0,0001$)

Мы предполагаем, что в отсутствии руксолитиниба высокая базальная экспрессия ISG (MX1, GBP1 и других) в клетках Capan-2 приводит к активации противовирусного ответа и ингибированию репликации ВЖЛ 17D. Взаимодействие NS5-STAT2 во время вирусной инфекции в клетках Capan-2, вероятно, способно связывать лишь небольшую часть STAT2, чего недостаточно для полного подавления интерферонового ответа из-за высокой базальной активности ISG. Руксолитиниб, ингибируя JAK1/2-киназы, снижает фосфорилирование STAT1 и STAT2 и экспрессию ISG, что дает вирусу преимущество и позволяет ему более активно размножаться.

Статус WT p53 в клеточной линии Capan-2 обеспечивает канонический ответ на стресс, включая экспрессию белков PUMA, NOXA и BAX и подавление генов

BCL2 и BCL-XL, а также остановку клеточного цикла через p21 с последующим апоптозом в ответ на длительный клеточный стресс [104]. После инфицирования клеток Capan-2 вирусом ВЖЛ 17D наблюдалось снижение титра вируса и гибель 50% клеток к 7-му дню (Рисунок 7Б). Окрашивание клеток Capan-2 Annexin V подтвердило значительное увеличение апоптотических событий на 7-й день после инфицирования в клетках, обработанных только ВЖЛ 17D, в отличие от контрольной группы и группы клеток, подвергнутых комбинированному воздействию (Рисунок 8). Мы предполагаем, что вирусная инфекция и связанный с ней стресс (наличие вирусных нуклеиновых кислот и стресс эндоплазматического ретикулума) активируют p53 и его митохондриальный апоптотический путь [112]. Кроме того, высокие уровни экспрессии ISG в ответ на вирусную инфекцию также могут способствовать активации апоптотических путей в Capan-2 [113].

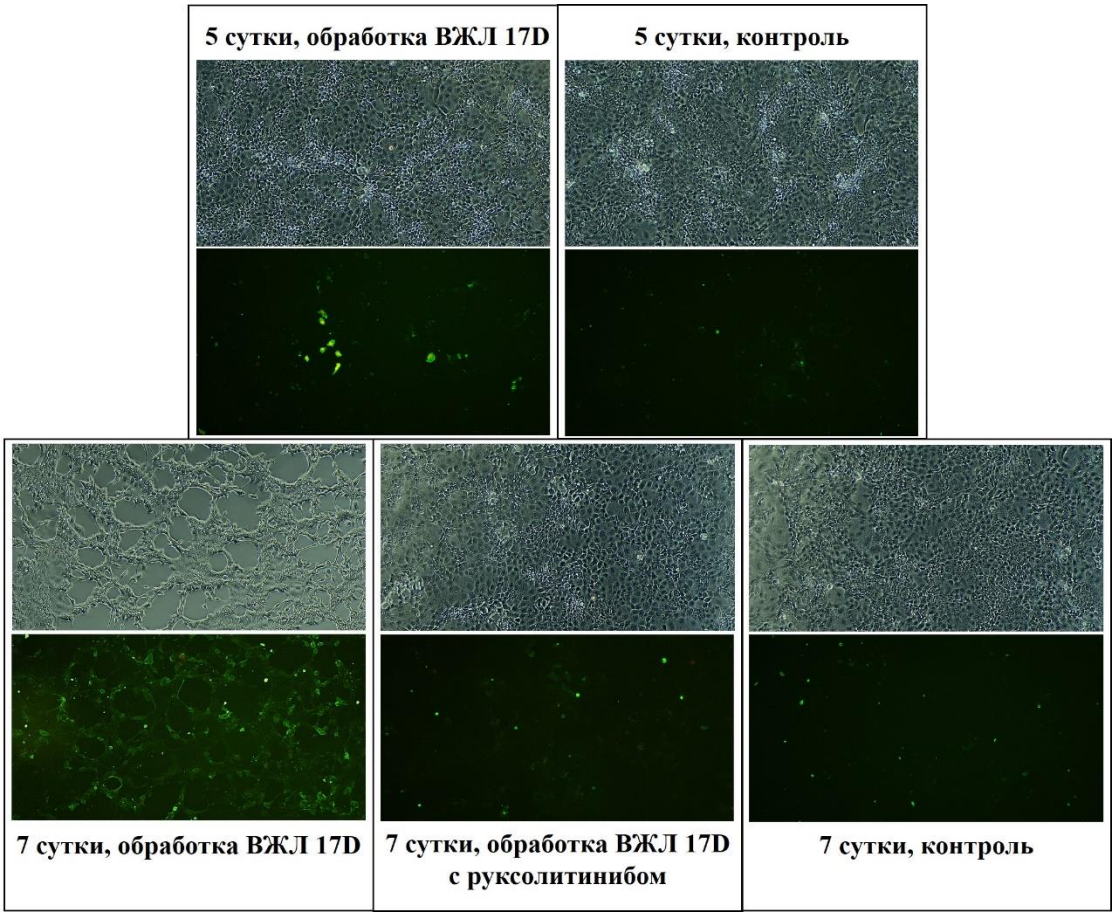


Рисунок 8 - Анализ апоптотической гибели клеток Capan-2. Флуоресцентная микроскопия с использованием Annexin V-FITC показывает апоптотические события, индуцированные ВЖЛ 17D в клетках Capan-2, и его снижение под действием руксолитиниба. Клетки Capan-2 были инфицированы ВЖЛ 17D с руксолитинибом или без него и окрашены Annexin V-FITC на 5-й и 7-й дни после инфицирования; представлены репрезентативные изображения в светлом поле и соответствующие флуоресцентные изображения FITC (увеличение x100) для контрольных лунок, лунок только с ВЖЛ 17D и лунок с ВЖЛ 17D и руксолитинибом

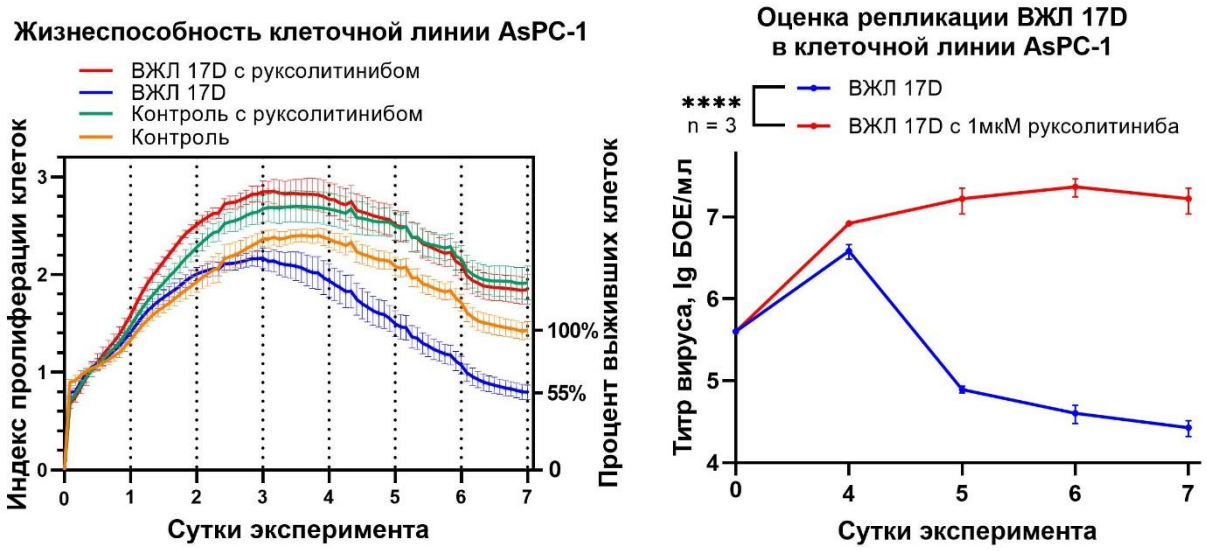
Присутствие руксолитиниба, механизм действия которого заключается в ингибировании JAK1/2-киназ, снижает фосфорилирование STAT1/STAT2 и экспрессию ISG, что ослабляет IFN-опосредованное ограничение репликации ВЖЛ 17D и приводит к увеличению его титра в культуральной среде (Рисунок 7Б). Одновременно руксолитиниб снижает IFN-индуцированную транскрипцию проапоптотических генов (включая ряд генов, связанных с p53) и снижает стрессовую сигнализацию через STAT1/STAT2 [114]. Следовательно, вирус размножается более интенсивно, а апоптоз, опосредованный p53, подавляется из-за ослабления интерферонового ответа (Рисунок 7А). В результате мы наблюдаем

цитопатический эффект ВЖЛ 17D на клетки Capan-2 и его отсутствие при воздействии руксолитиниба.

3.1.1.5 Оценка влияния руксолитиниба на репликативную активность и цитопатическое действие штамма 17D вируса желтой лихорадки в клетках AsPC-1

Клеточная линия AsPC-1 имеет мутацию гена KRAS G12D и множественные структурные аберрации в гене TP53 (делеции, сдвиги рамки считывания), что делает линию p53-null – сильно дисфункциональной по отношению к p53 [105]. Следовательно, транскрипционный ответ p53 нарушается, что смещает регуляцию апоптоза в сторону p53-независимых путей (TRAIL, стресс эндоплазматического ретикулума, митохондриальный стресс и другие).

Комбинированное воздействие руксолитинибом (1 мкМ) и ВЖЛ 17D на клетки AsPC-1 не привело к гибели опухолевых клеток к 7-му дню после инфицирования, тогда как воздействие только вирусом привело к гибели 45% клеток (Рисунок 9А). Присутствие руксолитиниба (1 мкМ) в культуральной среде не повлияло на скорость пролиферации клеток AsPC-1. Хотя ВЖЛ 17D не вызывал цитопатического эффекта в присутствии руксолитиниба, титр вируса в культуральной среде, тем не менее, увеличился с 10^5 до 10^7 БОЕ/мл с 4-го по 7-й день после инфицирования. Примечательно, что титр вируса в культуральной среде клеток, обработанных только ВЖЛ 17D, снизился до 10^4 БОЕ/мл к 7-му дню эксперимента (Рисунок 9Б).



А Б

Рисунок 9 - (А) Жизнеспособность клеток AsPC-1 после контрольной обработки, обработки руксолитинибом (1мкМ), заражения ВЖЛ 17D (MOI = 1) и комбинированной обработки руксолитинибом (1 мкМ) и заражения ВЖЛ 17D (MOI = 1). (Б) Репликативная активность ВЖЛ 17D в культуре AsPC-1 (статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа Two-way ANOVA с поправкой Sidak на множественные сравнения; n = 3; **** $p < 0,0001$)

Deer E. L. и соавторы продемонстрировали, что AsPC-1 имеет высокую базальную экспрессию JAK/STAT и ISG [106]. Инфекция, вызываемая ВЖЛ 17D, предположительно запускает экспрессию STAT1/STAT2/IRF9, что приводит к активации ISG, включая проапоптотические компоненты (модуляторы TRAIL, FasL, XAF1 и CASP8 (caspase 8 gene, ген каспазы-8)), а также к повышению уровня стресса эндоплазматического ретикулума и активных форм кислорода [112]. Учитывая дефицит p53, эти события приводят к гибели до 45% апоптотических клеток к 7-му дню (Рисунок 9А). Вирусный белок NS5 связывается с hSTAT2 и частично ингибирует ответ IFN, но, вероятно, из-за базально высокой экспрессии ISG в AsPC-1 его ингибирующая активность менее эффективна.

Для подтверждения характера гибели клеток, наблюдаемого в клетках при воздействии только ВЖЛ 17D, мы провели окрашивание Annexin V–FITC с последующей флуоресцентной микроскопией на 5-й и 7-й дни после инфицирования (Рисунок 10). В клетках с обработкой только ВЖЛ 17D, Annexin V-положительные клетки были обнаружены в обеих временных точках. Это

указывает на экстернализацию фосфатидилсерина и ранний апоптоз, что согласуется с 45% цитопатическим эффектом, измеренным методом пролиферативного анализа (Рисунок 9А). В отличие от этого, в группе клеток, обработанных ВЖЛ 17D с руксолитинибом, наблюдалось сравнительно меньше Annexin V-положительных клеток, несмотря на значительно более высокий титр вируса в культуральной среде. В контрольной группе клеток без обработки, апоптотического сигнала не наблюдалось. Эти результаты подтверждают, что гибель клеток, наблюдаемая при воздействии только ВЖЛ 17D в клетках AsPC-1, носит апоптотический характер, и что руксолитиниб специфически подавляет этот апоптотический ответ.

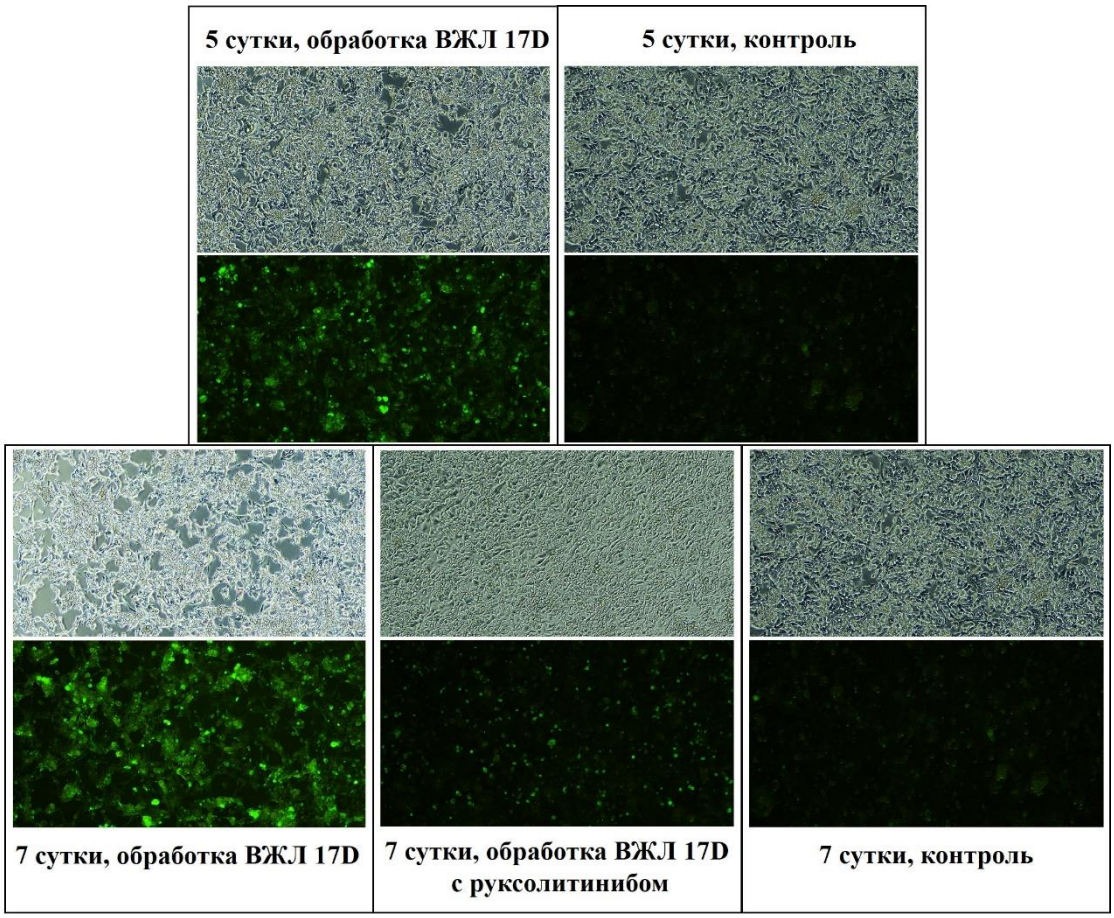


Рисунок 10 - Анализ апоптотической гибели клеток AsPC-1. Флуоресцентная микроскопия с использованием Annexin V-FITC показывает апоптотические события, индуцированные ВЖЛ 17D в клетках AsPC-1, и его снижение под действием руксолитиниба. Клетки AsPC-1 были инфицированы ВЖЛ 17D с руксолитинибом или без него и окрашены Annexin V-FITC на 5-й и 7-й дни после инфицирования; представлены репрезентативные изображения в светлом поле и соответствующие флуоресцентные изображения FITC (увеличение x100) для контрольных лунок, лунок только с ВЖЛ 17D и лунок с ВЖЛ 17D и руксолитинибом

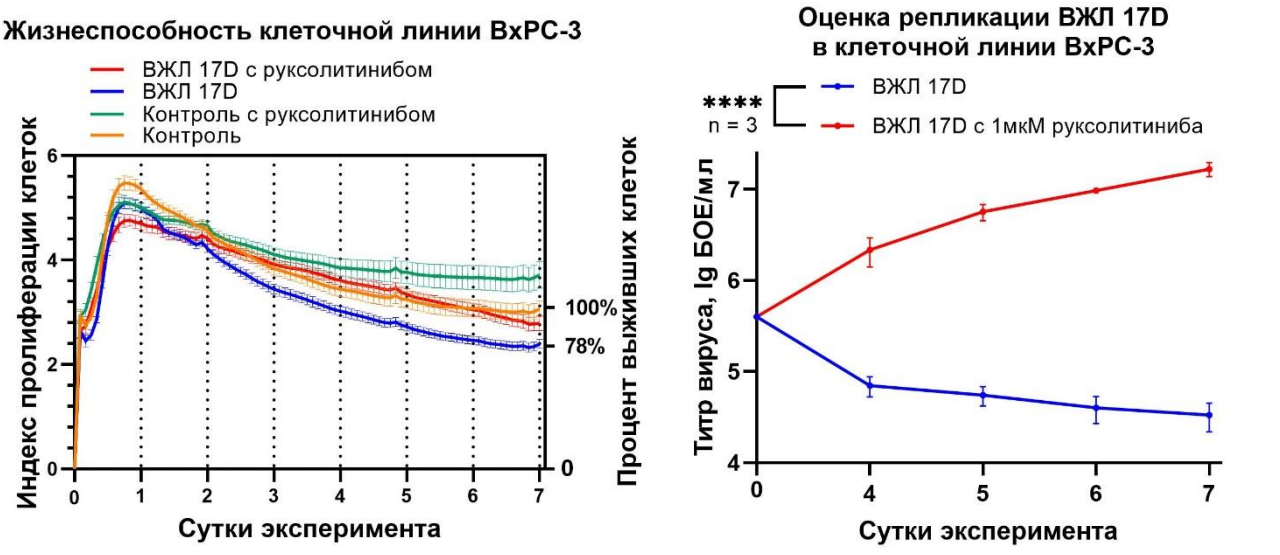
Поскольку канонический p53-зависимый апоптоз подавлен в клетках AsPC-1 из-за отсутствия p53, ось IFN/STAT представляет собой доминирующий действующий апоптотический путь в ответ на инфекцию, вызываемую ВЖЛ 17D в этой линии. Поэтому его подавление руксолитинибом приводит к значительному снижению апоптотической сигнализации, что было подтверждено незначительным количеством Annexin V-положительных клеток в группе комбинированной обработки (Рисунок 10). В тоже время удаление ISG-опосредованного противовирусного барьера обеспечивает усиление репликации ВЖЛ 17D, что приводит к увеличению титра вируса на три логарифма к 7-му дню (Рисунок 9Б).

3.1.1.6 Оценка влияния руксолитиниба на репликативную активность и цитопатическое действие штамма 17D вируса желтой лихорадки в клетках BxPC-3

Клеточная линия BxPC-3 характеризуется диким типом гена KRAS, структурной мутацией Y220C гена TP53, а также высокой чувствительностью к интерферону I типа и выраженной базальной активностью JAK/STAT-сигналинга, сопоставимой с линиями Capan-2 и AsPC-1 [106,107].

Комбинированное воздействие руксолитинибом (1 мкМ) и ВЖЛ 17D при MOI = 1 на клетки BxPC-3 приводило к незначительной гибели опухолевых клеток (9%) к 7-м суткам наблюдения, тогда как воздействие только ВЖЛ 17D вызывало гибель примерно 22% клеток по сравнению с контрольной кривой пролиферации (Рисунок 11А). Добавление руксолитиниба (1 мкМ) не оказывало влияния на скорость пролиферации BxPC-3 в отсутствии вируса. Несмотря на отсутствие цитопатического эффекта в условиях комбинированной обработки, титр ВЖЛ 17D в культуральной среде BxPC-3 существенно увеличивался с 10^5 до 10^7 БОЕ/мл между 4-ми и 7-ми сутками после инфицирования. При воздействии вирусом в отсутствии руксолитиниба, напротив, титр к 7-м суткам снижался примерно до 10^4 БОЕ/мл (Рисунок 11Б). Таким образом, для BxPC-3 менее выраженный паттерн комбинированного воздействия руксолитиниба с ВЖЛ 17D повторяет эффект,

наблюдаемый для клеток Capan-2 и AsPC-1, при котором усиленная репликация вируса в присутствии руксолитиниба сочетается с подавлением вирус-индуцированного цитопатического эффекта.



А Б

Рисунок 11 - (А) Жизнеспособность клеток BxPC-3 после контрольной обработки, обработки руксолитинибом (1мкМ), заражения ВЖЛ 17D (MOI = 1) и комбинированной обработки руксолитинибом (1 мкМ) и заражения ВЖЛ 17D (MOI = 1). (Б) Репликативная активность ВЖЛ 17D в культуре BxPC-3 (статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа Two-way ANOVA с поправкой Sidak на множественные сравнения; n = 3; **** $p < 0,0001$)

Клеточная линия BxPC-3 дополняет наблюдаемый нами спектр фенотипов вирусной репликации в отсутствии ЦПД, ранее описанных для Capan-2 (TP53 WT) и AsPC-1 (p53-null). В отличие от этих линий, BxPC-3 имеет дикий тип KRAS и структурную LOF-мутацию TP53 Y220C, при этом сохраняет высокую базальную активность JAK/STAT-сигналинга и интерферон-чувствительный профиль.

Мы предполагаем, что в условиях воздействия только ВЖЛ 17D на клетки BxPC-3 вирусная репликация запускает интерфероновый ответ, сопровождающийся активацией ISG, включая проапоптотические эффекторные звенья (TRAIL, XAF1, модуляторы CASP8) и стресс эндоплазматического ретикулума, что приводит к незначительной апоптотической клеточной гибели (Рисунок 12) при снижении вирусного титра (Рисунок 11Б).

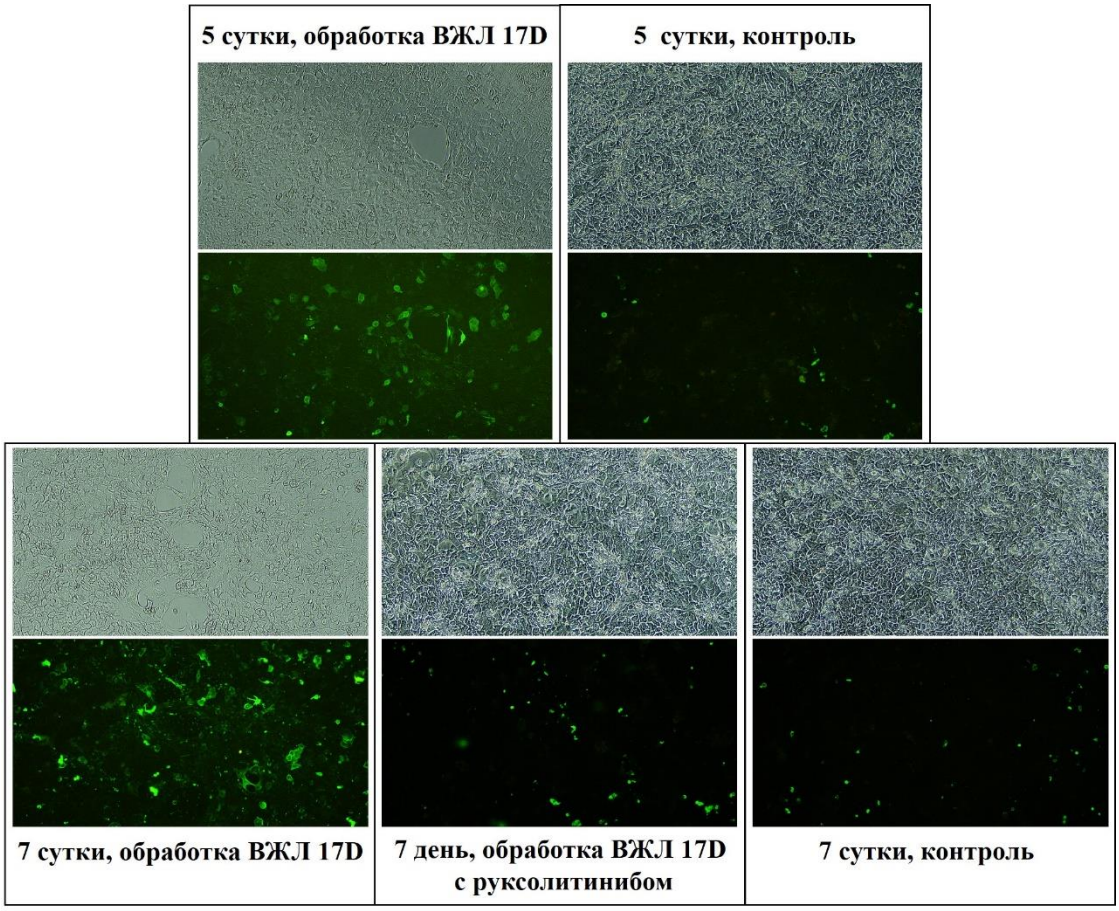


Рисунок 12 - Анализ апоптотической гибели клеток BxPC-3. Флуоресцентная микроскопия с использованием Annexin V-FITC показывает апоптотические события, индуцированные ВЖЛ 17D в клетках BxPC-3, и его снижение под действием руксолитиниба. Клетки BxPC-3 были инфицированы ВЖЛ 17D с руксолитинибом или без него и окрашены Annexin V-FITC на 5-й и 7-й дни после инфицирования; представлены репрезентативные изображения в светлом поле и соответствующие флуоресцентные изображения FITC (увеличение x100) для контрольных лунок, лунок только с ВЖЛ 17D и лунок с ВЖЛ 17D и руксолитинибом

Добавление руксолитиниба блокирует фосфорилирование STAT1/STAT2 и, соответственно, экспрессию ISG, что снимает интерферон-опосредованный противовирусный барьер и позволяет ВЖЛ 17D интенсивно реплицироваться, достигая высокого титра в среде. Одновременно подавляется IFN-зависимая проапоптотическая сигнализация, которая в условиях LOF-мутации TP53 остается одним из ключевых путей гибели клетки. В результате в BxPC-3, как и в Capan-2 и AsPC-1, при воздействии ВЖЛ 17D с руксолитинибом происходит высокая вирусная репликация с подавлением апоптотической гибели клеток.

Таким образом, эффект, наблюдаемый для BxPC-3, свидетельствует о том, что описанный фенотипический паттерн (Capan-2, AsPC-1, BxPC-3) не

ограничивается опухолями с гиперактивным KRAS или полностью отсутствующим p53, но может формироваться и в контексте KRAS WT и структурной мутации TP53 при условии высокой базальной активности JAK/STAT-оси. Это дополнительно подтверждает то, что определяющим фактором данного фенотипического эффекта является не столько конкретный тип мутации KRAS и TP53, сколько состояние интерферон-зависимой ISG-активации и ее блокада JAK1/2-ингибитором.

По результатам сравнительного анализа онколитического действия вакцинного штамма ВЖЛ 17D в комбинации с ингибитором JAK1/2-киназ руксолитинибом на панели из шести клеточных линий РПЖ с различными молекулярно-генетическими характеристиками было выявлено три основных паттерна ответа: синергетическое усиление репликативной активности и ЦПД вируса (Pan02, PANC-1), отсутствие синергизма – дополнительного усиления эффекта от добавления руксолитиниба (MiaPaCa-2) и усиление репликации без усиления ЦПД (Capan-2, AsPC-1, BxPC-3) (Таблица 2). Несмотря на то, что все исследованные линии имели разные мутации в генах KRAS и TP53 (Таблица 1), мы обнаружили, что паттерны ответа клеток в меньшей степени зависили от наличия, отсутствия или типа этих мутаций. Напротив, ключевыми предикторами были базальный уровень активности JAK/STAT-сигнализации и функциональная целостность интерферонового барьера в опухолевой линии, что согласуется с данными литературы о центральной роли ISG-зависимой противовирусной защиты в устойчивости РПЖ к онколитическим вирусам [13].

Таблица 2 - Оценка влияния руксолитиниба на репликативную активность и цитопатическое действие ВЖЛ 17D в панели клеточных линий РПЖ с различным уровнем базальной активности JAK/STAT (статистический анализ для значений ЦПД проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа one-way ANOVA с поправкой Dunnett's на множественные сравнения, где n = 8; для титра вируса указано среднее значение, где n=3)

Базальная активность JAK/STAT		Умеренная		Низкая	Высокая			
ЦПД 0-25%; Титр $<10^3$ ЦПД 25-75%; Титр $10^3<x<10^6$ ЦПД 75-100%; Титр $>10^6$		**Pan02** 7 сутки	**PANC-1** 7 сутки	**MiaPaCa-2** 4 сутки	**Capan-2** 7 сутки	**AsPC-1** 7 сутки	**BxPC-3** 7 сутки	**Фибро-бласты Wi-38** 7 сутки
Руксолитиниб	ЦПД	**0%,** p=0,0045	**4%,** p=0,0469	**3%,** p=0,0628	**3%,** p=0,1041	**0%,** p<0,0001	**0%,** p<0,0001	**0%,** p<0,0001
ВЖЛ 17D	ЦПД	**12%,** p<0,0001	**60%,** p<0,0001	**97%,** p<0,0001	**50%,** p<0,0001	**45%,** p<0,0001	**22%,** p<0,0001	**14%,** p=0,0062
	Титр	**$3x10^4$**	**$1x10^6$**	**$3x10^7$**	**$4x10^2$**	**$3x10^4$**	**$3x10^4$**	**0**
ВЖЛ 17D с руксолитинибом (1 мкМ)	ЦПД	**97%,** p<0,0001	**90%,** p<0,0001	**97%,** p<0,0001	**0%,** p<0,0001	**0%,** p<0,0001	**9%,** p=0,0083	**23%,** p=0,0087
	Титр	**$9x10^6$**	**$6x10^6$**	**$3x10^7$**	**$4x10^4$**	**$2x10^7$**	**$1x10^7$**	**0**

Первый паттерн – это синергичное усиление онколитической активности ВЖЛ 17D, который зарегистрирован в клетках Pan02 и PANC-1, исходно характеризующихся умеренным, функционально активным IFN-I/JAK/STAT-барьером. В клетках Pan02 применение руксолитиниба (1 мкМ) обеспечило практически полную гибель клеток (97%) к 7-м суткам и увеличение вирусного титра на 2 порядка по сравнению с воздействием только ВЖЛ 17D (12% гибели), что, вероятно, обусловлено подавлением mSTAT1/2-зависимого ISG-ответа (Таблица 2). В клетках PANC-1 комбинация ВЖЛ 17D и руксолитиниба обеспечивала 90% гибель клеток к 7-м суткам против 60% при воздействии только ВЖЛ 17D, с увеличением вирусного титра в 6 раз, что предположительно может быть связано с нейтрализацией JAK/STAT-зависимой резистентности в

субпопуляции с высоким уровнем IFNAR рецепторов, которые оставались невосприимчивы к вирусу при отсутствии руксолитиниба.

Второй паттерн – отсутствие усиливающего эффекта руксолитиниба, был выявлен в клетках MiaPaCa-2, исходно лишенных функционального противовирусного барьера. В данных клетках ВЖЛ 17D обеспечивал практически полную гибель к 4-м суткам (97%) с пиковым значением вирусного титра 10^8 БОЕ/мл независимо от присутствия ингибитора JAK1/2-киназ, подтверждая, что эффект усиления руксолитинибом обусловлен наличием функциональной JAK/STAT-системы.

Третий паттерн, зарегистрированный в клетках Capan-2, AsPC-1 и BxPC-3, которые по данным литературы отличаются высоким уровнем базальной активности JAK/STAT-сигналинга и ISG-экспрессии, выявил подавление апоптотической гибели клеток с усилением вирусной репликации при комбинированном воздействии. Во всех трех линиях монотерапия ВЖЛ 17D сопровождалась апоптототической гибелью клеток (22–50% к 7-м суткам), верифицированной окрашиванием Annexin V, тогда как при комбинированном воздействии с руксолитинибом цитопатический эффект не регистрировался, однако вирусные титры возрастали на 2–3 порядка. Молекулярный механизм данного феномена определяется двойственной ролью JAK/STAT-сигналинга в этих клетках: являясь одновременно противовирусным барьером и ключевым медиатором проапоптотических ISG-программ клеточной гибели (TRAIL, XAF1, CASP8-модуляторы), данный путь при его подавлении руксолитинибом утрачивает обе функции. Важно, что наблюдение паттерна усиления вирусной репликации с угнетением апоптотической гибели в клетках BxPC-3, несущих дикий тип KRAS, подтверждает, что данный фенотип не ограничивается конкретными вариантами онкогенных мутаций, а воспроизводится при любом молекулярном контексте, обеспечивающем высокую базальную активность IFN/JAK/STAT-оси.

Для оценки опухолевой селективности комбинации ВЖЛ 17D с руксолитинибом использовали условно-нормальные клетки фибробластов легкого человека Wi-38. На 7-ые сутки после инфицирования ВЖЛ 17D без руксолитиниба

цитопатический эффект составил 14%, тогда как при воздействии комбинацией ВЖЛ 17D с руксолитинибом – 23% (Таблица 2). Вместе с тем к 7-м суткам инфекционный ВЖЛ 17D не детектировался в клетках Wi-38 ни при воздействии только вирусом, ни при комбинированном воздействии, что свидетельствует о элиминации вируса из клеточной культуры. Таким образом, комбинация ВЖЛ 17D с руксолитинибом оказывала ограниченное цитопатическое действие на условно-нормальные клетки фибробластов человека Wi-38, при этом отсутствие персистенции вируса указывает на ее потенциальную селективность в отношении опухолевых клеток.

3.1.2 Определение оптимальной концентрации руксолитиниба, обеспечивающей усиление репликации штамма 17D вируса желтой лихорадки в резистентных клеточных линиях рака поджелудочной железы

Результаты, полученные в разделе 3.1.1, продемонстрировали, что в клеточных линиях Capan-2, AsPC-1 и BxPC-3 руксолитиниб в концентрации 1 мкМ устойчиво усиливает репликацию ВЖЛ 17D, снимая ISG-опосредованный противовирусный барьер. Вместе с тем для разработки оптимальной терапевтической стратегии принципиально важно установить минимально достаточную концентрацию препарата, при которой данный эффект реализуется в полной мере. С одной стороны, недостаточное ингибирование JAK1/2-киназ может препятствовать преодолению базально высокого ISG-статуса данных линий, что повлечет снижение вирусной репликации и утрату преимущества комбинированного воздействия. С другой стороны, избыточное фармакологическое подавление JAK/STAT-сигналинга может приводить к нежелательной системной токсичности для клеток [13,92].

Известно, что руксолитиниб ингибирует JAK1/2-киназы конкурентно по отношению к аденозинтрифосфату со значениями IC_{50} в биохимических тестах порядка 3,3 нМ и 2,8 нМ соответственно, однако в клеточных системах функционально значимое подавление фосфорилирования STAT1 достигается при

концентрациях на 2–3 порядка выше – в диапазоне 0,5–5 мкМ, что определяется плотностью рецепторных комплексов, уровнем цитокиновой стимуляции и доступностью внутриклеточных мишеней [15,115]. В клеточных системах с высокой базальной активностью JAK/STAT, характерной для линий Capan-2, AsPC-1 и BxPC-3, необходимая концентрация препарата для достижения значимого снижения ISG-экспрессии может существенно отличаться от таковой в системах с умеренной активностью JAK/STAT пути [21].

Для определения порогового диапазона эффективных концентраций руксолитиниба применительно к ВЖЛ 17D был проведен анализ динамики вирусной репликации в трех вышеуказанных резистентных линиях при пяти концентрациях препарата: 0; 0,1; 0,5; 1 и 5 мкМ с ежесуточным мониторингом вирусных титров с 3-х по 7-е сутки после заражения.

Для оценки концентрационной зависимости усиливающего эффекта руксолитиниба клетки Capan-2, AsPC-1 и BxPC-3 были предварительно обработаны препаратом в концентрациях 0; 0,1; 0,5; 1 и 5 мкМ в течение 3 часов, после чего инфицированы ВЖЛ 17D при MOI = 1. Пробы культуральной среды отбирали ежесуточно с 3-х по 7-е сутки включительно и анализировали методом бляшкообразования (БОЕ/мл) и количественной ПЦР с обратной транскрипцией.

Во всех трех клеточных линиях в контрольных условиях (0 мкМ руксолитиниба) вирусные титры последовательно снижались с 3-х по 7-е сутки, что отражает эффективное сдерживание вирусной репликации функционально активным IFN/JAK/STAT-сигналингом этих линий и соответствует данным раздела 3.1 (Рисунок 13). При введении руксолитиниба в концентрации 0,1 мкМ динамика вирусных титров во всех трех линиях также характеризовалась снижением к 7-м суткам и статистически не отличалась от группы без препарата, что указывает на недостаточность данной концентрации для значимого подавления ISG-экспрессии в условиях базально гиперактивного JAK/STAT-сигналинга (Рисунок 13).

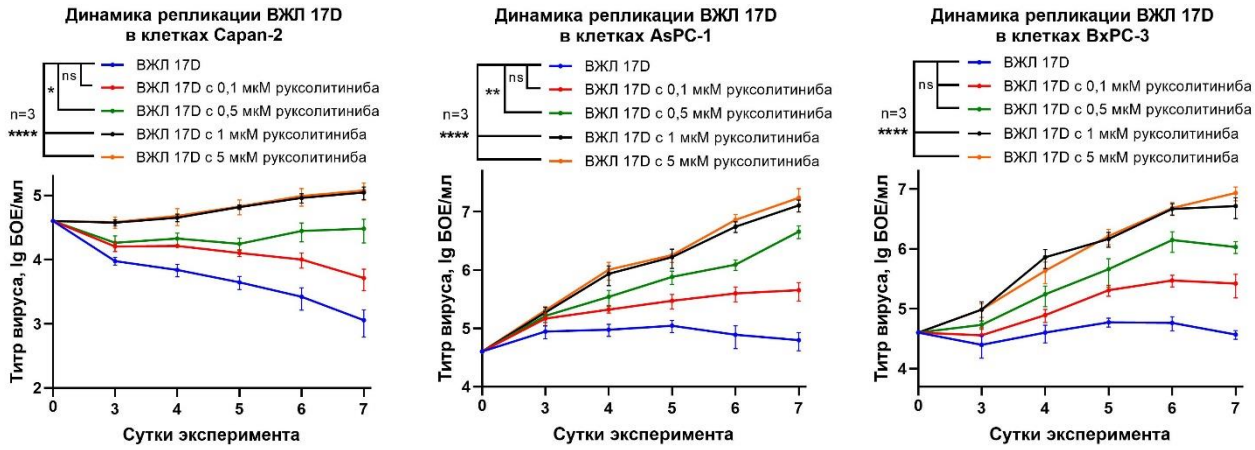


Рисунок 13 - Динамика репликации ВЖЛ 17D в клетках Capan-2, AsPC-1 и BxPC-3 при различных концентрациях руксолитиниба: 0; 0,1; 0,5; 1 и 5 мкМ (статистический анализ проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа Two-way ANOVA с поправкой Sidak на множественные сравнения; n = 3; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; ns — статистически незначимо)

При концентрации руксолитиниба 0,5 мкМ отмечалось умеренное замедление снижения вирусных титров во всех трех клеточных линиях, однако к 7-м суткам показатели оставались значимо ниже, чем при концентрациях 1 и 5 мкМ, свидетельствуя о неполном подавлении ISG-зависимого противовирусного барьера при данном уровне JAK1/2-ингибирования.

В группах с концентрациями руксолитиниба 1 мкМ и 5 мкМ наблюдался устойчивый рост вирусных титров во всех трех линиях с 3-х по 7-е сутки (Рисунок 13). Пиковые вирусные титры в этих группах к 7-м суткам превышали значения в группе без препарата на 2–3 порядка, воспроизводя паттерн, установленный в разделе 3.1 для концентрации 1 мкМ. Отсутствие статистически значимых различий между группами 1 мкМ и 5 мкМ свидетельствует о достижении насыщения ингибирующего эффекта в отношении IFN/JAK/STAT-зависимого противовирусного барьера уже при концентрации 1 мкМ и об отсутствии дополнительного преимущества при пятикратном увеличении дозы.

Результаты ПЦР-анализа проб на количество РНК ВЖЛ 17D в культуральной среде клеток аденокарциномы поджелудочной железы человека (AsPC-1, BxPC-3, Capan-2) на 3-7-е сутки эксперимента представлены на Рисунке 14, однако они являются менее репрезентативными, чем значения инфекционных титров. Мы

лишь наблюдаем достоверное повышение количества РНК (lg(копий/мл)) на один-два порядка в группах применения руксолитиниба по сравнению с группами, где применялся только вирус, при этом достоверной разницы между группами с разными концентрациями 0,1-5 мкМ или сутками отбора проб не наблюдается.

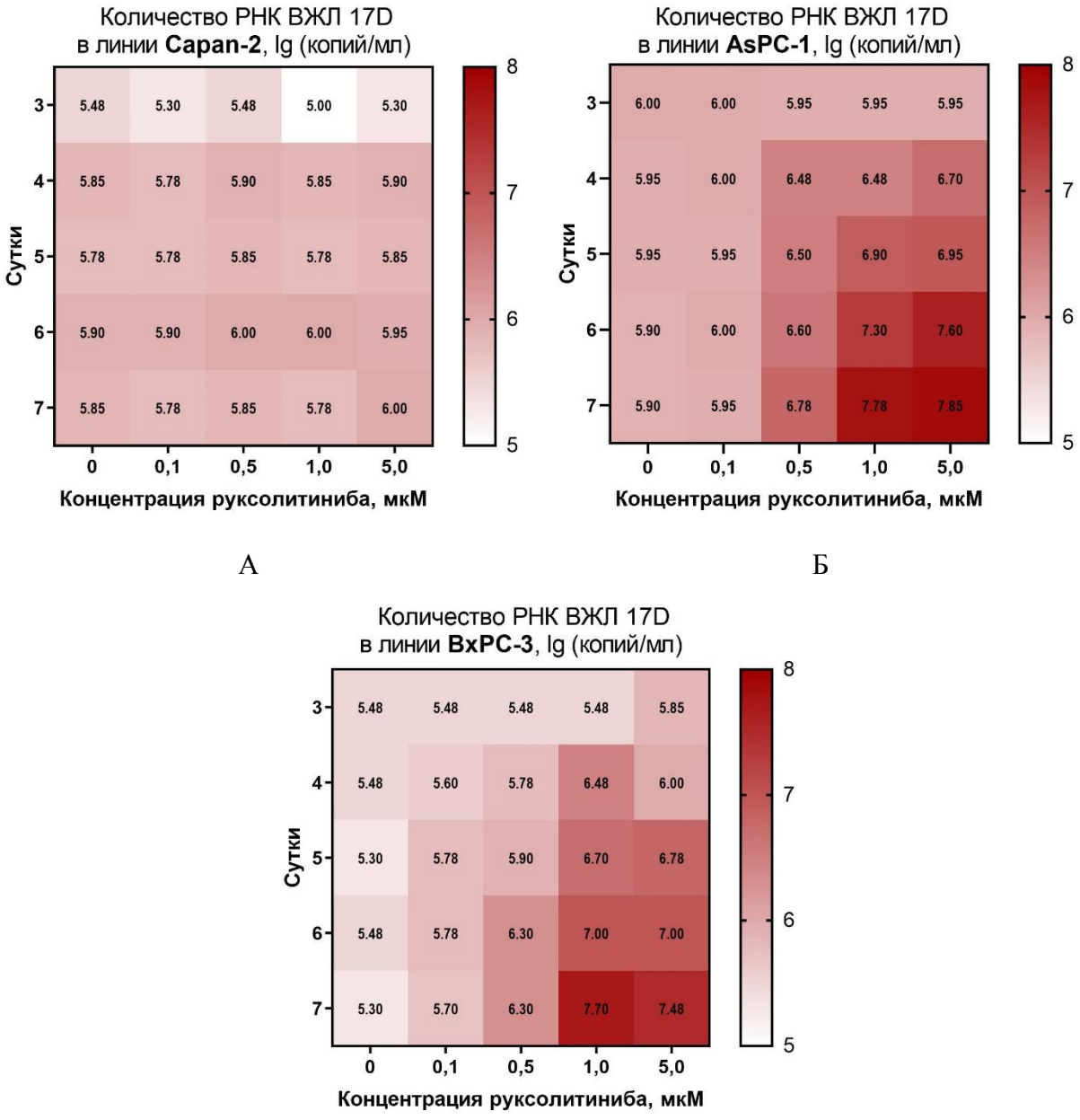


Рисунок 14 - Количество РНК ВЖЛ 17D в культуральной среде инфицированных (MOI=1,0) клеток аденокарциномы поджелудочной железы человека Capan-2 (А), AsPC-1 (Б), BxPC-3 (В), на 3-7-е сутки эксперимента, lg (копий/мл). Каждое значение представляет собой среднее из трех независимых биологических экспериментов (n=3)

Совокупность полученных данных позволяет определить концентрацию руксолитиниба 1 мкМ как оптимальную и достаточную для устойчивого усиления репликации ВЖЛ 17D в клеточных линиях РПЖ с высокой базальной активностью JAK/STAT-сигналинга. Данная концентрация обеспечивает функционально значимое подавление фосфорилирования STAT1 и STAT2, снижение ISG-экспрессии и устранение IFN-зависимого противовирусного барьера, не превышая при этом пороговых значений, при которых формируются токсические эффекты от препарата руксолитиниба [92,115].

Наблюдаемый порог эффективности между концентрациями 0,5 и 1 мкМ соответствует данным по подавлению pSTAT1 руксолитинибом в клеточных системах с высоким уровнем цитокиновой стимуляции, где полное подавление сигнала достигается в диапазоне 0,5–1 мкМ, тогда как при более низких концентрациях сохраняется остаточная STAT-активность [116]. Применительно к клеточным линиям с высоким базальным ISG-статусом, к которым относятся Capan-2, AsPC-1 и BxPC-3, функциональный порог эффективного JAK1/2-ингибирования, по всей видимости, находится вблизи 1 мкМ, что и соответствует точке насыщения наблюдаемого вирусологического эффекта.

Сходство результатов при концентрациях 1 мкМ и 5 мкМ демонстрирует нецелесообразность повышения дозы руксолитиниба выше 1 мкМ в данной экспериментальной системе, поскольку это не приводит к дополнительному усилению вирусной репликации, однако потенциально увеличивает риск нежелательных эффектов, связанных с клеточной токсичностью [15].

Полученные и представленные в разделе 3.1.2 результаты опубликованы в научном журнале [117] и согласуются с данными исследования Felt S. A. и соавторов, в котором концентрации руксолитиниба в диапазоне 1–2 мкМ обеспечивали максимальное усиление репликации ВВС в резистентных линиях РПЖ человека с насыщением эффекта при более высоких концентрациях [13]. Аналогичный концентрационный диапазон установлен в исследованиях, демонстрирующих, что концентрация руксолитиниба порядка 1–5 мкМ является достаточной для функционально значимого подавления ISG-экспрессии в

клеточных системах с гиперактивным IFN-ответом и одновременно обеспечивает усиление репликации рекомбинантного аденоассоциированного вируса в производственных системах, где блокада JAK/STAT пути является основным лимитирующим фактором вирусного выхода [118].

3.2 Оценка онколитического действия комбинации штамма 17D вируса желтой лихорадки с руксолитинибом на сингенной мышиной модели рака поджелудочной железы Pan02

Данные, полученные *in vitro* и представленные в предыдущих разделах, свидетельствуют о том, что комбинация ВЖЛ 17D с руксолитинибом в концентрации 1 мкМ обеспечивает значимое усиление вирусной репликации и цитопатического эффекта в ряде клеточных линий РПЖ. Для верификации противоопухолевой эффективности данной комбинации *in vivo* и оценки ее иммунологических механизмов был проведен эксперимент на сингенной мышиной модели РПЖ, воспроизводящей ключевые особенности иммунного микроокружения, характерного для этого заболевания у человека [119]. Сингенная модель Pan02 на мышах линии C57BL/6 широко применяется для доклинической оценки противоопухолевых иммунотерапевтических стратегий: сохраненная иммунная система хозяина обеспечивает возможность изучения как прямых онколитических механизмов, так и вклада адаптивного иммунного ответа в противоопухолевый эффект [120].

3.2.1 Оценка противоопухолевой эффективности: динамика объема опухолей и анализ выживаемости

Самкам мышей линии C57BL/6 подкожно в латеральную поверхность левого бедра вводили клетки Pan02 (не более 2×10^{6} клеток в объеме 100 мкл) (Рисунок 15). После достижения опухолью диаметра 5 мм животных рандомизировали по четырем группам: (1) контрольная группа (внутриопухолевое введение стерильного фосфатно-солевого буферного раствора); (2) контрольная группа

руксолитиниба (внутрибрюшинное введение руксолитиниба, внутриопухолевое введение стерильного фосфатно-солевого буферного раствора); (3) группа монотерапии ВЖЛ 17D (однократное внутриопухолевое введение 10^5 БОЕ в объеме 100 мкл); (4) группа комбинированной терапии (внутрибрюшинное введение 100 мкл руксолитиниба в концентрации 10 мг/мл за 24 ч и за 3 ч до введения ВЖЛ 17D, затем повторно через 24 ч и 48 ч после введения вируса, однократное внутриопухолевое введение 10^5 БОЕ в объеме 100 мкл). Объем опухоли оценивали ежедневно с помощью штангенциркуля. Гуманной конечной точкой являлось достижение объема опухоли 500 $мм^3$, либо выраженное ухудшение состояния здоровья животного. Примененная доза руксолитиниба (1 мг в 100 мкл на мышь, внутрибрюшинно) соответствует диапазону, применявшемуся в ранее опубликованных доклинических исследованиях комбинации JAK-ингибиторов с онколитическими вирусами в мышиной опухолевой модели [121].

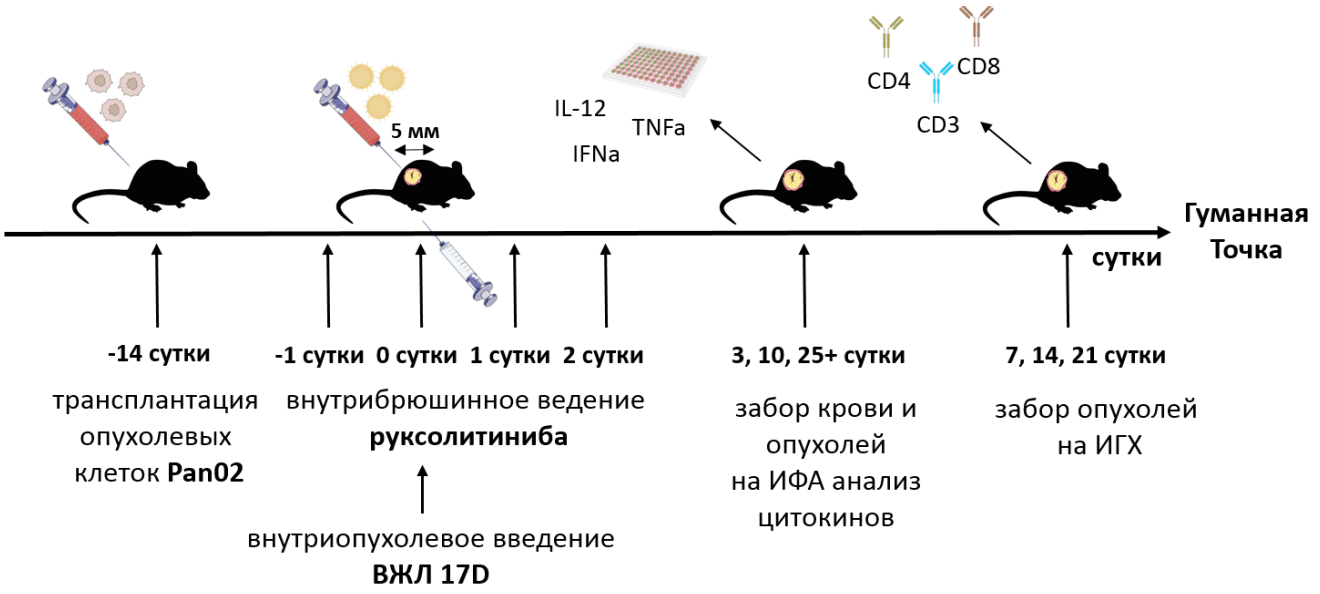


Рисунок 15 - Схема эксперимента по оценке онколитического действия комбинации ВЖЛ 17D с руксолитинибом на сингенной мышиной модели РПЖ Pan02

Анализ кривых роста опухолей показал, что в контрольной группе (1) опухоли характеризовались стабильным прогрессивным ростом, а инвазия в подлежащие мышечные ткани наблюдалась при вскрытии у большинства животных уже на 14–21-е сутки после инокуляции (Рисунок 16А). Стоит отметить, что графики роста опухолей в контрольной группе терапии только руксолитинибом

(2) были схожи с графиками роста контрольной группы без терапии (1) (Рисунок 16Б). В группе монотерапии ВЖЛ 17D (3) однократное внутриопухолевое введение вируса приводило лишь к умеренной задержке опухолевого роста без явной регрессии, что соответствует данным, ранее полученным при изучении монотерапии ВЖЛ 17D в этой модели (Рисунок 16В).

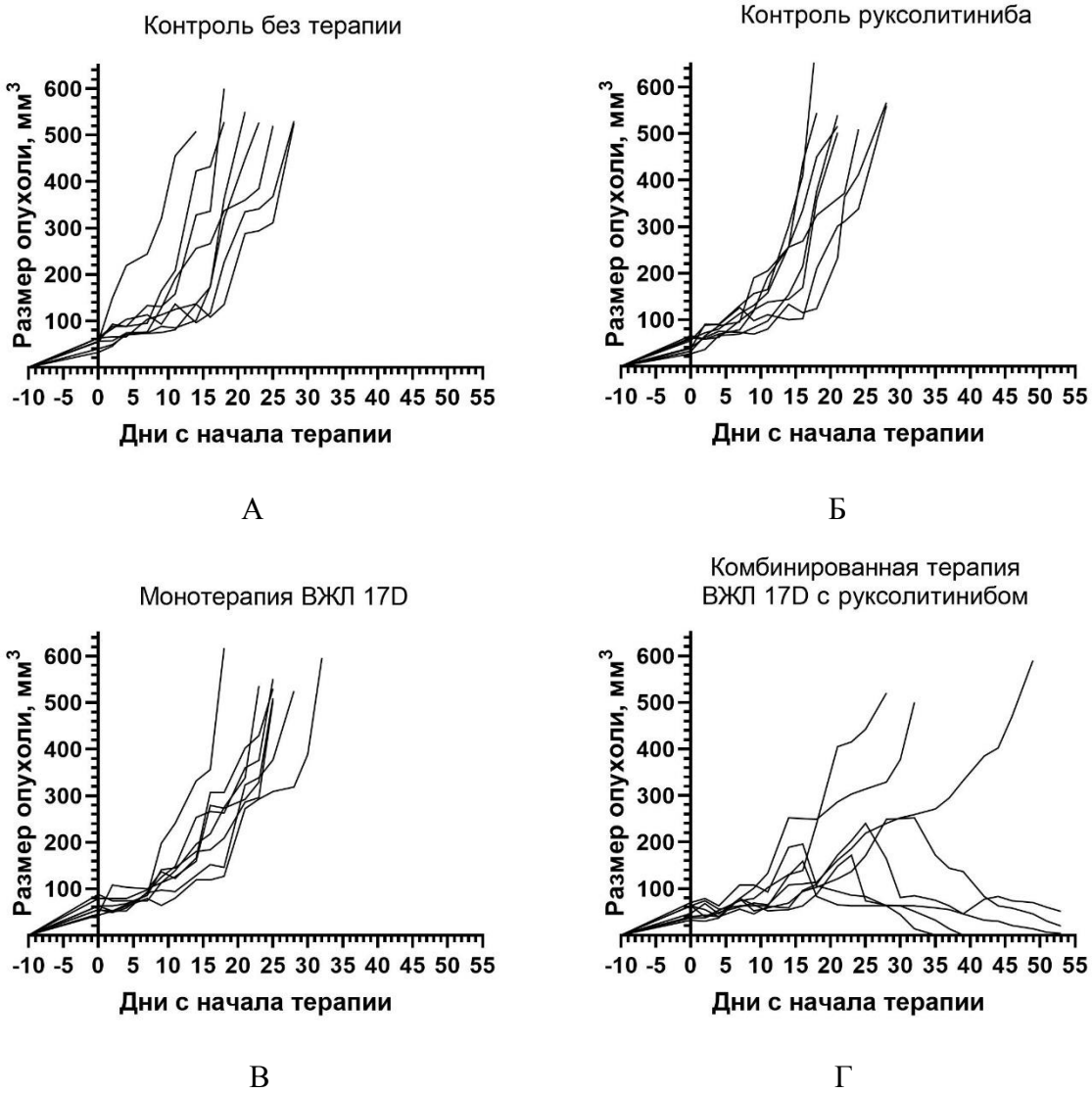


Рисунок 16 - Графики динамики роста опухолей в группах: контроля без терапии (А), контроля руксолитиниба (Б), монотерапии ВЖЛ 17D (В) и комбинированной терапии ВЖЛ 17D с руксолитинибом (Г)

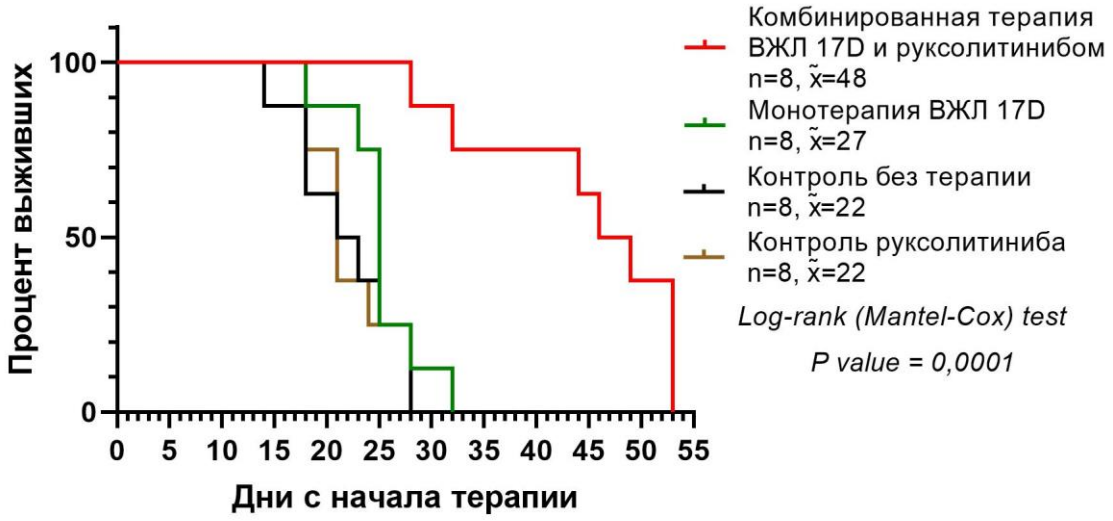
В группе комбинированной терапии (4) у 5 из 8 животных (62,5%; 95% ДИ: 29,0–96,1%) наблюдался частичный или полный лизис опухоли (Рисунок 16Г). Характерной особенностью ответа являлась его цикличность: первоначальный рост опухоли сменялся регрессией, после чего у части животных отмечался повторный

рост с последующим повторным лизисом, что свидетельствует о формировании устойчивого адаптивного противоопухолевого иммунного ответа. В группе комбинированной терапии (4) инвазия опухоли в окружающие ткани у животных, у которых был зарегистрирован лизис, не наблюдалась.

Анализ выживаемости методом Каплана–Мейера продемонстрировал статистически значимые межгрупповые различия (лог-ранговый тест Мантела–Кокса, p=0,0001). Медиана времени дожития до общей гуманной точки, включавшей выведение животных по любому из предмусмотренных критериев, в группе комбинированной терапии (4) составила 48 дней (Рисунок 17А), тогда как в группе монотерапии ВЖЛ 17D (3) – 27 дней, в контрольной группе без терапии (1) – 22 дня, в контрольной группе терапии руксолитинибом (2) – 22 дня. Таким образом, комбинированная терапия обеспечивала увеличение медианы времени дожития до общей гуманной точки более чем в 2 раза по сравнению с контрольной группой (1) и в 1,8 раза по сравнению с группой монотерапии ВЖЛ 17D (3). Монотерапия ВЖЛ 17D увеличивала медиану времени дожития до общей гуманной точки в 1,2 раза по сравнению с контрольной группой (1).

Стоит отметить, что при анализе времени дожития до опухоль-ассоциированной гуманной точки событием считали достижение установленного предельного размера опухоли (500 мм^3). В то же время животных, выведенных по другим гуманным критериям, цензурировали на дату выведения. Поскольку при анализе выживаемости методом Каплана–Мейера в этом случае кривые не снижались до уровня 50%, медиана времени дожития до опухоль-ассоциированной гуманной точки не была достигнута в пределах срока наблюдения (Рисунок 17Б).

А



Б

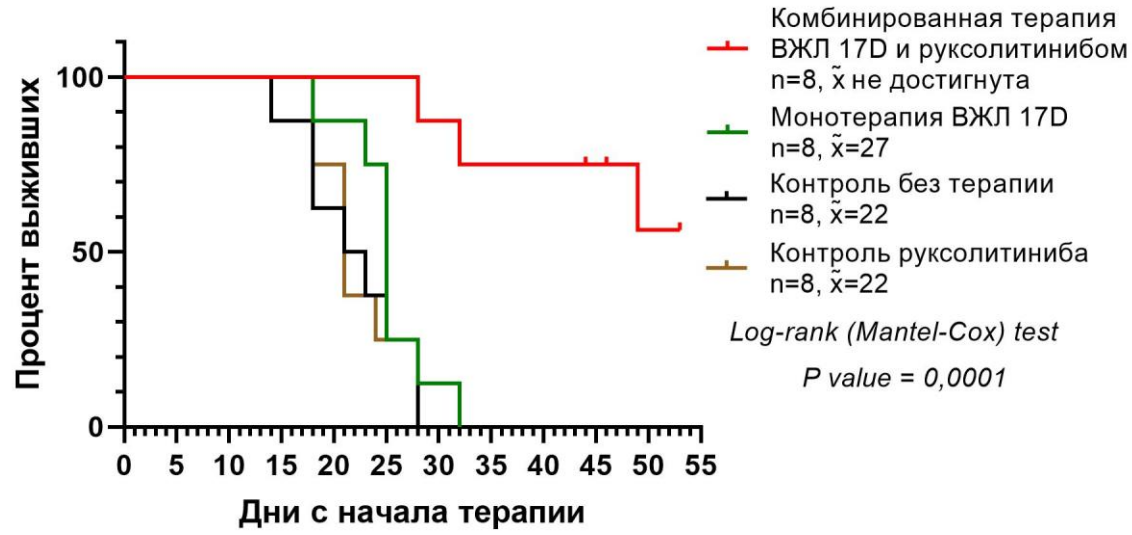


Рисунок 17 – (А) Анализ общей выживаемости методом Каплана-Мейера мышей с комбинированной терапией ВЖЛ 17D и руксолитинибом (Лог-ранговый тест (критерий Мантеля — Кокса), n = 8, p = 0,0001); (Б) Анализ времени дожития до опухоль-ассоциированной гуманной точки методом Каплана-Мейера мышей с комбинированной терапией ВЖЛ 17D и руксолитинибом (Лог-ранговый тест (критерий Мантеля — Кокса), n = 8, p = 0,0001)

ПЦР-анализ и исследование инфекционного титра методом бляшкообразования в образцах гомогенатов опухолевой ткани, отобранных на 3-и и 5-е сутки после введения ВЖЛ 17D, не выявил статистически значимых различий во внутриопухолевой концентрации вирусной РНК и инфекционного титра между группами монотерапии ВЖЛ 17D (3) и комбинированной терапии (4) (Таблица 3).

Таблица 3 - Количество РНК и инфекционный титр ВЖЛ 17D в опухолевом гомогенате мышей группы комбинированной терапией и группы монотерапии ВЖЛ 17D на 3 и 5 сутки после терапии (статистически значимых межгрупповых отличий не выявлено)

Группа	**РНК** ВЖЛ 17D на **3 сутки** после терапии, lg (копий/мл)			**РНК** ВЖЛ 17D на **5 сутки** после терапии, lg (копий/мл)		
Комбинированная терапия	2	3	2	2	2	1
Монотерапия ВЖЛ 17D	3	1	2	0	1	2
Группа	**Инфекционный титр** ВЖЛ 17D на **3 сутки** после терапии, lg (БОЕ/мл)			**Инфекционный титр** ВЖЛ 17D на **5 сутки** после терапии, lg (БОЕ/мл)		
Комбинированная терапия	1	2	1	1	1	0
Монотерапия ВЖЛ 17D	1	0	1	0	0	1

Данный результат свидетельствует о том, что в исследованные временные точки подавление JAK/STAT-сигналинга руксолитинибом при примененной схеме его введения не является достаточным для значимого усиления репликации ВЖЛ 17D непосредственно в опухолевой ткани *in vivo*. Это указывает на то, что наблюдаемый выраженный противоопухолевый эффект комбинированной терапии реализуется преимущественно не через усиление прямого вирусного онколиза, а через активацию адаптивного звена противоопухолевого иммунного ответа. Такой иммунно-опосредованный механизм *in vivo* преимущественно отличается от механизма прямого цитопатического действия, наблюдавшегося *in vitro*, и является более предпочтительным с клинической точки зрения, поскольку позволяет элиминировать опухолевые клетки при помощи механизмов иммуногенной клеточной гибели, а не прямым вирусным онколизом, который часто сопровождается системным токсическим эффектом.

3.2.2 Результаты иммуноферментного анализа цитокинового профиля (IFN-α, TNF-α, IL-12)

Для оценки локального воспаления в опухолевом микроокружении концентрации IFN-α, TNF-α и IL-12 были определены в гомогенатах опухолевой ткани, полученных у животных контрольной группы без терапии (1), групп монотерапии ВЖЛ 17D (3) и комбинированной терапии (4) на 3-и, 10-е сутки и в гуманной точке (25-е и более сутки) от начала терапии (n = 4 в каждой группе в каждой временной точке). Следует отметить, что попытка определения цитокинов в образцах периферической крови не дала результатов, пригодных для анализа: концентрации всех трех аналитов в сыворотке крови у животных всех групп были ниже порогов чувствительности используемых наборов для ИФА (<5,7 пг/мл). Это свидетельствует об отсутствии значимого системного цитокинового выброса и о локальном внутриопухолевом характере иммунологических изменений, индуцированных комбинированной терапией.

3.2.2.1 Уровень IFN-α в опухолевом гомогенате

На 3-и сутки от начала терапии, то есть в ранней фазе, приходящейся на период первичной вирусной репликации, в группе монотерапии ВЖЛ 17D (3) зафиксирован выраженный пик концентрации IFN-α в опухолевом гомогенате (~0,97 пкг/мг), превышающий показатели контрольной группы без терапии (1) (~0,45 пкг/мг) приблизительно в 2 раза (Рисунок 18). В группе комбинированной терапии (4) в тот же временной момент уровень IFN-α был заметно ниже (~0,35 пкг/мг) и сопоставим или даже несколько ниже показателей контрольной группы без терапии (1). На 10-е и 25-е и более сутки концентрация IFN-α во всех трех группах выравнивалась и была в диапазоне 0,4–0,55 пкг/мг без межгрупповых различий.

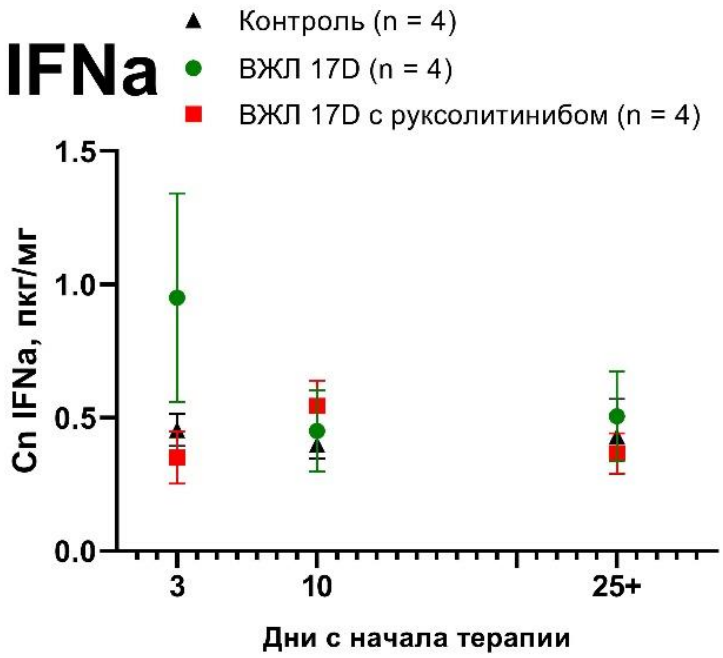


Рисунок 18 - Уровень IFN-α в опухолевом гомогенате у мышей группы комбинированной терапии, монотерапии ВЖЛ 17D и контрольной группы без терапии ($\bar{x}$ ± SD; n = 4)

Подавление раннего IFN-α-ответа в группе комбинированной терапии (4) является ожидаемым следствием ингибирования JAK1/2-зависимого сигналинга руксолитинибом: блокада фосфорилирования STAT1/STAT2 снижает экспрессию ISG и тем самым ограничивает экспрессию IFN-1 как в опухолевых клетках, так и в инфильтрирующих их иммунных клетках [92]. Следует отметить, что данное подавление носит временный и локальный характер: его нет в крови и оно не сохраняется в поздние сроки наблюдения, что согласуется с кратковременным режимом введения руксолитиниба, примененным в данном эксперименте.

3.2.2.2 Уровень TNF-α в опухолевом гомогенате

Концентрации TNF-α во всех трех группах на 3-и сутки были сопоставимы (~25–29 пкг/мг) (Рисунок 19). На 10-е сутки отмечалась тенденция к повышению TNF-α по сравнению с 3 сутками в группе монотерапии ВЖЛ 17D (3) (~33 пкг/мг) при одновременном снижении в группе комбинированной терапии (4) (~22 пкг/мг); показатель контрольной группы оставался на уровне ~30 пкг/мг. Наиболее выраженные различия были зафиксированы на 25-е и более сутки: в группе

комбинированной терапии (4) концентрация TNF-α резко снижалась до ~6 пкг/мг, тогда как в группе монотерапии ВЖЛ 17D (3) она оставалась на уровне ~25 пкг/мг, а в контрольной группе без терапии (1) составляла ~18 пкг/мг (Рисунок 19).

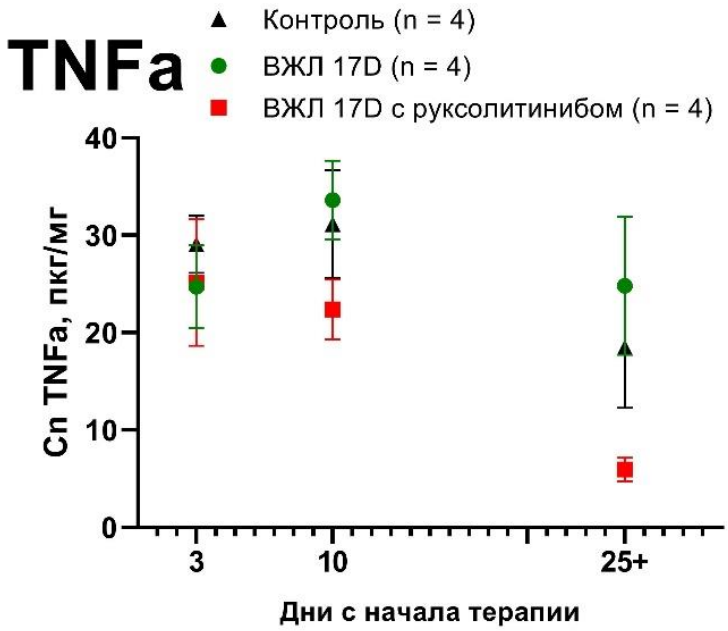


Рисунок 19 - Уровень TNFα в опухолевом гомогенате у мышей группы комбинированной терапии, монотерапии ВЖЛ 17D и контрольной группы без терапии ($\bar{x}$ ± SD; n = 4)

Предполагается, что прогрессивное снижение TNF-α в опухолевых гомогенатах группы комбинированной терапии (4) к поздним срокам наблюдения может быть следствием снижения опухолевой массы на фоне эффективного противоопухолевого ответа (регрессия опухоли, наблюдавшаяся у 5 из 8 животных данной группы). Регрессия опухоли часто сопровождается уменьшением опухоль-ассоциированного воспаления и, соответственно, снижением TNF-α-продукции в остаточной опухолевой ткани.

3.2.2.3 Уровень IL-12 в опухолевом гомогенате

Динамика изменения количества IL-12 в опухолевых гомогенатах демонстрировала различия между группами комбинированной терапии (4) и другими группами. На 3-и сутки концентрации IL-12 во всех группах были низкими и сопоставимыми (~0,4–0,65 пкг/мг), при этом в группе комбинированной терапии

(4) отмечалась тенденция к снижению (~0,4 пкг/мг), что вероятно связано с иммуносупрессивным действием руксолитиниба (Рисунок 20). На 10-е сутки концентрация IL-12 в группе комбинированной терапии (4) демонстрировала наиболее выраженный рост (~1,45 пкг/мг) по сравнению с группами монотерапии ВЖЛ 17D (3) (~1,0 пкг/мг) и контрольной группой без терапии (1) (~0,85 пкг/мг). На 25-е и более сутки наблюдались изменения: в группе комбинированной терапии (4) концентрация IL-12 снижалась до ~0,7 пкг/мг, тогда как в группе монотерапии ВЖЛ 17D (3) средний показатель вырос до ~1,45 пкг/мг (однако наблюдался большой разброс данных), а в контрольной группе без терапии (1) средний показатель составлял ~1,0 пкг/мг (Рисунок 20).

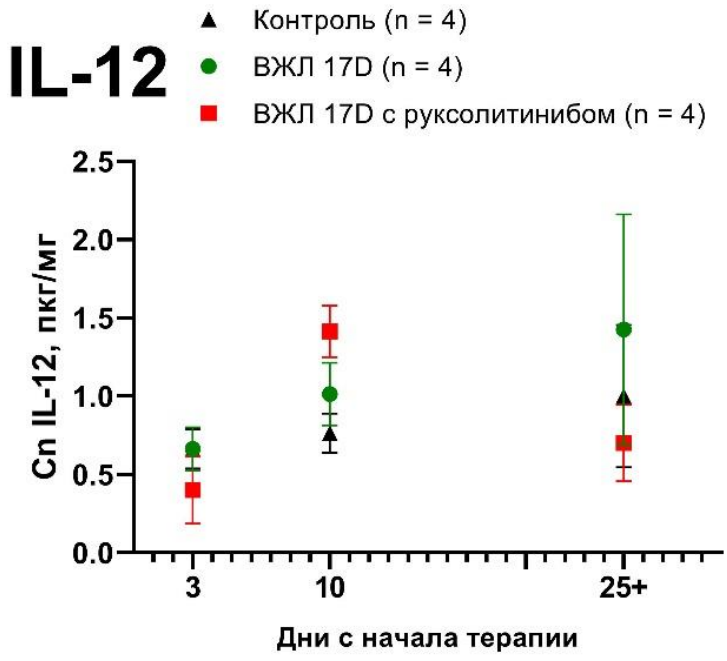


Рисунок 20 - Уровень IL-12 в опухолевом гомогенате у мышей группы комбинированной терапии, монотерапии ВЖЛ 17D и контрольной группы без терапии ($\bar{x} \pm SD$; n = 4)

Характерный рост концентрации IL-12 на 10-е сутки, специфичный для группы комбинированной терапии (4), свидетельствует об активации продуцирующих IL-12 клеток – ДК и макрофагов М1-типа в ранней фазе иммунного ответа на вирус [122,123]. IL-12 является ключевым цитокином, определяющим Th1-поляризацию и праймирование цитотоксического CD8+ Т-клеточного ответа, его ранний внутриопухолевый пик на фоне комбинированной

терапии создает иммунологически благоприятные условия для формирования адаптивного противоопухолевого ответа [124]. Последующее снижение IL-12 к 25-м и более суткам в группе комбинированной терапии, вероятнее всего, отражает разрешение острой воспалительной фазы вирусной инфекции по мере элиминации вируса и трансформации ответа из врожденного в адаптивный с переходом от IL-12-зависимого праймирования к фазе эффекторной активности CD8+ Т-клеток [125].

3.2.2.4 Интерпретация ИФА-данных цитокинового профиля

Совокупность данных концентраций провоспалительных цитокинов, полученных из гомогенатов опухолевой ткани, позволяет предположить последовательность иммунологических событий при комбинированной терапии. На раннем этапе (0-3 сутки) руксолитиниб подавляет IFN-α-опосредованный противовирусный барьер, создавая условия для вирусной репликации в опухолевых клетках. Однако исходя из данных анализа количества РНК и инфекционного титра ВЖЛ 17D в опухолевом гомогенате на 3 и 5 сутки после терапии, этот эффект носит ограниченный характер. В промежуточной фазе (10 сутки) запускается адаптивный иммунный ответ, маркером которого служит характерный рост IL-12 при одновременном снижении TNF-α, что вероятно отражает сдвиг от неспецифического воспаления к специфическому цитотоксическому ответу. В поздней фазе (25-е и более сутки) наблюдается разрешение провоспалительного микроокружения в сочетании с регрессией опухоли, что сопровождается нормализацией цитокинового профиля. Отсутствие детектируемых концентраций цитокинов в крови при наличии изменений в опухолевых гомогенатах подтверждает локальный характер цитокиновой активности и отсутствие признаков системного воспаления, что является важной характеристикой с точки зрения безопасности разработанного подхода.

3.2.3 Оценка безопасности комбинированной схемы терапии

ПЦР-анализ гомогенатов тканей головного мозга и селезенки всех животных, получавших ВЖЛ 17D в комбинации с руксолитинибом, не выявил вирусной РНК (Таблица 4). Исследование на культуре клеток Vero не обнаружило инфекционных вирусных частиц в указанных тканях. Совокупность этих результатов свидетельствует об отсутствии нейродиссеминации и системной диссеминации ВЖЛ 17D при внутриопухолевом введении на фоне руксолитиниба, что подтверждает благоприятный профиль безопасности разработанной комбинированной схемы.

Таблица 4 - Количество РНК и инфекционных частиц ВЖЛ 17D в мозге и селезенке мышей с комбинированной терапией

Группа	№ мыши	Сутки после терапии	Количество **РНК** ВЖЛ, копий/мл	**Инфекционный титр** ВЖЛ, БОЕ/мл
ВЖЛ 17D с руксолитинибом в **мозге**	1	53	0	0
	3	49	0	0
	4	53	0	0
	5	28	0	0
	6	32	0	0
	7	44	0	0
	8	53	0	0
ВЖЛ 17D с руксолитинибом в **селезенке**	1	53	0	0
	3	49	0	0
	4	53	0	0
	5	28	0	0
	6	32	0	0
	7	44	0	0
	8	53	0	0

Полученные данные согласуются с известными характеристиками вакцинного штамма ВЖЛ 17D, утратившего нейровирулентность в результате

аттенуации, и свидетельствуют о том, что системное ингибирование JAK/STAT-сигналинга руксолитинибом в примененных дозах и по примененной схеме не приводит к репликации ВЖЛ 17D в нецелевых органах [66,67].

У животных, получавших комбинированную терапию, при вскрытии отмечалась выраженная спленомегалия – увеличение размера селезенки в 2–3 раза по сравнению с контрольной группой без терапии. Данный феномен интерпретируется как проявление системной иммунной активации и экспансии иммунокомпетентных клеточных популяций (прежде всего лимфоцитов и NK-клеток) в ответ на внутриопухолевое введение ВЖЛ 17D на фоне частичной иммунной блокады, обусловленной руксолитинибом [126]. Спленомегалия при отсутствии признаков дистресса у животных рассматривается как косвенное свидетельство нормального (нетоксического) иммунологического ответа на терапию.

3.2.4 Оценка количества нейтрализующих антител к вирусу желтой лихорадки в крови мышей

С целью оценки гуморального противовирусного ответа у животных после внутриопухолевого введения ВЖЛ 17D было проведено определение количества нейтрализующих антител в сыворотке крови мышей, получавших комбинированную терапию ВЖЛ 17D с руксолитинибом, а также монотерапию ВЖЛ 17D. Нейтрализующие антитела являются одним из ключевых показателей формирования специфического адаптивного иммунного ответа к вирусу желтой лихорадки, а защитный порог в реакциях нейтрализации для ВЖЛ в литературе обычно соотносят с титром порядка 1:10 в зависимости от используемой тест-системы и конечной точки анализа [127,128].

По результатам реакции нейтрализации в обеих исследуемых группах были выявлены нейтрализующие антитела к ВЖЛ 17D (Рисунок 21). При этом у всех животных значения титров антител находились на уровне или выше условного

порога защитного титра нейтрализующих антител, что свидетельствует о формировании специфического гуморального ответа на введение вируса.

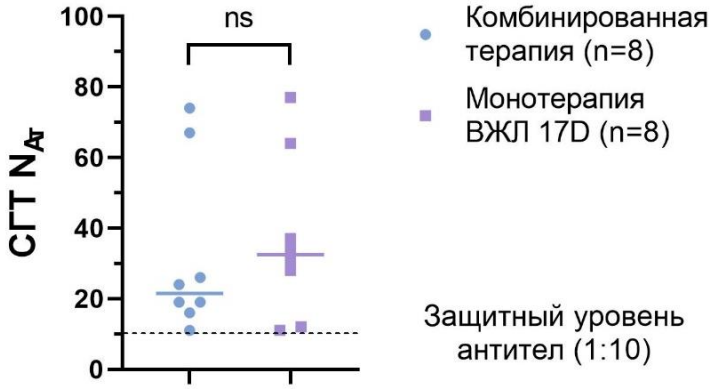


Рисунок 21 – Средний геометрический титр нейтрализующих антител в крови мышей после внутриопухолевого введения вируса в группах комбинированной и монотерапии ВЖЛ 17D (n = 8, ns – статистически незначимо)

В группе комбинированной терапии (4) наблюдалась индивидуальная вариабельность титров нейтрализующих антител: у части животных регистрировались относительно низкие значения, близкие к пороговому уровню, тогда как у других мышей определялись более высокие титры (Рисунок 21). Сходная неоднородность гуморального ответа отмечалась и в группе монотерапии ВЖЛ 17D, где также выявлялись как низкие, так и высокие значения нейтрализующей активности сывороток. Сравнительный анализ показал отсутствие статистически значимых различий между группой комбинированной терапии (4) и группой монотерапии ВЖЛ 17D (3) по уровню нейтрализующих антител. Это указывает на то, что включение руксолитиниба в схему терапии не приводило к подавлению формирования специфического гуморального ответа к ВЖЛ 17D. Такое наблюдение представляется важным, поскольку ингибирование сигнального пути JAK/STAT может блокировать ранний интерфероновый ответ и влиять на кинетику развития противовирусного и противоопухолевого иммунного ответа.

Таким образом, полученные результаты количественной оценки нейтрализующих антител подтверждают иммуногенность ВЖЛ 17D в используемой модели и предложенных режимах терапии. Оценка динамики

нейтрализующих антител имеет значение не только для характеристики противовирусного иммунитета как такового, но и для интерпретации противоопухолевого эффекта терапии в целом. Показано, что онколитические вирусы способны индуцировать иммуногенную гибель опухолевых клеток с высвобождением опухолеассоциированных антигенов, а В-клеточное звено адаптивного иммунитета вносит вклад в формирование не только противовирусного, но и опухолеспецифического гуморального ответа [129]. В связи с этим сохранная выработка нейтрализующих антител к вирусу в рамках комбинированной терапии может рассматриваться как индикатор функциональной целостности гуморального звена адаптивного иммунитета в целом, что создает предпосылки для потенциальной выработки антител против опухолевых антигенов, высвобождаемых в результате онколиза. С другой стороны, отсутствие снижения уровня нейтрализующих антител в группе комбинированной терапии свидетельствует об отсутствии влияния руксолитиниба на развитие гуморального иммунного ответа.

3.2.5 Морфологическая оценка опухолевой ткани

С целью оценки структурных изменений опухолевой ткани на фоне проводимой терапии было выполнено гистологическое исследование опухолей Pan02, окрашенных гематоксилином и эозином, на 7, 14 и 21 сутки после начала терапии. Анализ проводили в контрольной группе без терапии (1), группе монотерапии ВЖЛ 17D (3) и группе комбинированной терапии (4) ВЖЛ 17D с руксолитинибом. Морфологическую оценку осуществляли с учетом общей гистоархитектоники опухоли, степени клеточной плотности, выраженности митотической активности, наличия апоптотических и некротических изменений, а также воспалительно-клеточной инфильтрации. Гистологическое исследование опухолей во всех группах подтвердило их принадлежность к протоковой аденокарциноме поджелудочной железы. Вместе с тем архитектоника опухолевой ткани и выраженность деструктивных изменений существенно различались в

зависимости от проводимого лечения и сроков наблюдения. В контрольной группе без терапии (1) опухолевая ткань сохраняла признаки прогрессирующего роста на всех сроках наблюдения (Рисунок 22В). Опухоли были представлены железистоподобными опухолевыми структурами, сформированными атипичными эпителиоподобными клетками с высокой клеточной плотностью. Отмечались множественные митотические фигуры, соответствующие сохраняющейся пролиферативной активности опухоли. Несмотря на преобладание признаков активного опухолевого роста, в отдельных участках выявлялись единичные клетки с апоптотическими изменениями. Однако данные изменения носили очаговый и слабо выраженный характер и не сопровождались существенным нарушением общей структуры опухолевой ткани. Признаки массивной деструкции, обширного некроза или выраженной лимфоидной инфильтрации в контрольной группе без терапии (1) не наблюдались.

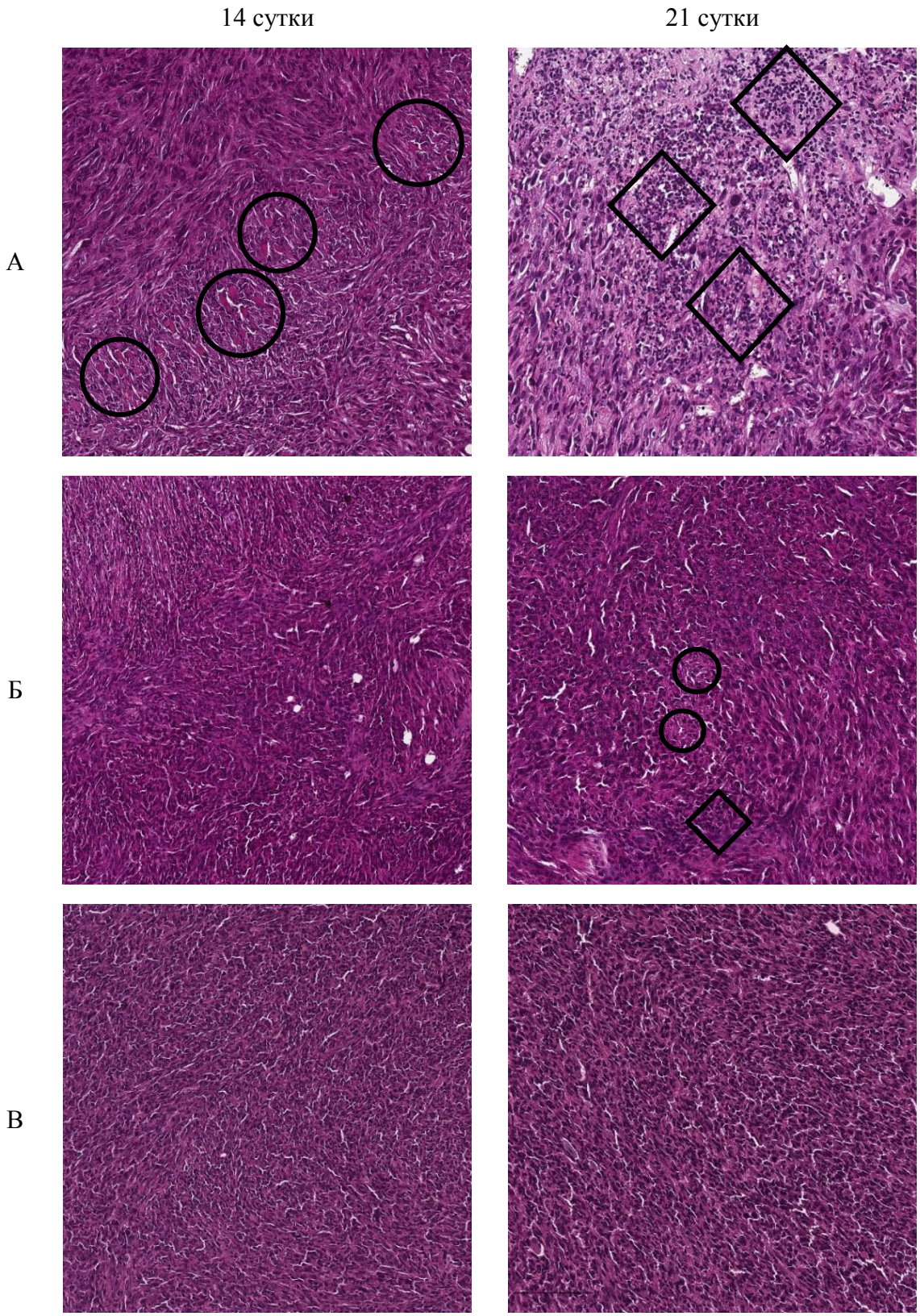


Рисунок 22 – Микрофотографии препаратов опухолей в группе комбинированной терапии (А), группе монотерапии ВЖЛ 17D (Б) и контрольной группе без терапии (В) с изменением гистологической морфологии с течением времени (окрашивание гематоксилином и эозином на 14 и 21 сутки после терапии; увеличение х40). Очаги опухолевой деструкции выделены черными кругами, скопления иммунных клеток выделены черными ромбами

В группе монотерапии ВЖЛ 17D (3) морфологическая картина отличалась от контрольной группы без терапии (1) умеренной выраженностью деструктивных изменений. По сравнению с опухолями без терапии в ткани увеличивалось количество погибающих клеток (Рисунок 22Б). Наряду с этим выявлялись очаги некроза и небольшое число диффузно рассеянных лимфоцитов. Указанные изменения свидетельствуют о наличии локального повреждающего действия вирусной терапии на опухолевую ткань. Однако степень этих изменений оставалась ограниченной: несмотря на появление очагов некроза и увеличение числа погибающих клеток, выраженной утраты тканевой плотности и глубокой дезорганизации опухолевой структуры, сопоставимой с группой комбинированной терапии (4), не наблюдалось.

Наиболее выраженные морфологические изменения были зарегистрированы в группе комбинированной терапии (4) ВЖЛ 17D с руксолитинибом. Именно в этой группе выявлялись наиболее отчетливые признаки регрессии и деструкции опухолевой ткани, включая апоптоз, некроз и лимфоидную инфильтрацию (Рисунок 22А). Гистологический анализ показал снижение клеточной плотности опухоли и выраженные нарушения ее структурной организации. По сравнению с контрольной группой без терапии (1) и группой монотерапии (3) в опухолях животных, получавших комбинацию вируса с руксолитинибом, наблюдалась более выраженная утрата типичной опухолевой архитектоники. Опухолевая ткань становилась менее компактной, в ней определялись участки дезорганизации, соответствующие развитию деструктивных процессов. Наличие апоптотических и некротических изменений в сочетании с лимфоидной инфильтрацией указывает на комплексный характер противоопухолевого эффекта, включающий как непосредственное повреждение опухолевых клеток, так и участие клеточного иммунного компонента.

Важно отметить, что именно в группе комбинированной терапии (4) выраженность морфологических признаков регресса была наибольшей на протяжении наблюдения. Это согласуется с общей динамикой противоопухолевого ответа, описанной в основном исследовании, включая увеличение выживаемости

животных, наличие эпизодов лизиса опухоли и усиление Т-клеточной инфильтрации по данным иммуногистохимического анализа.

3.2.6 Оценка иммунного ответа методом иммуногистохимического анализа

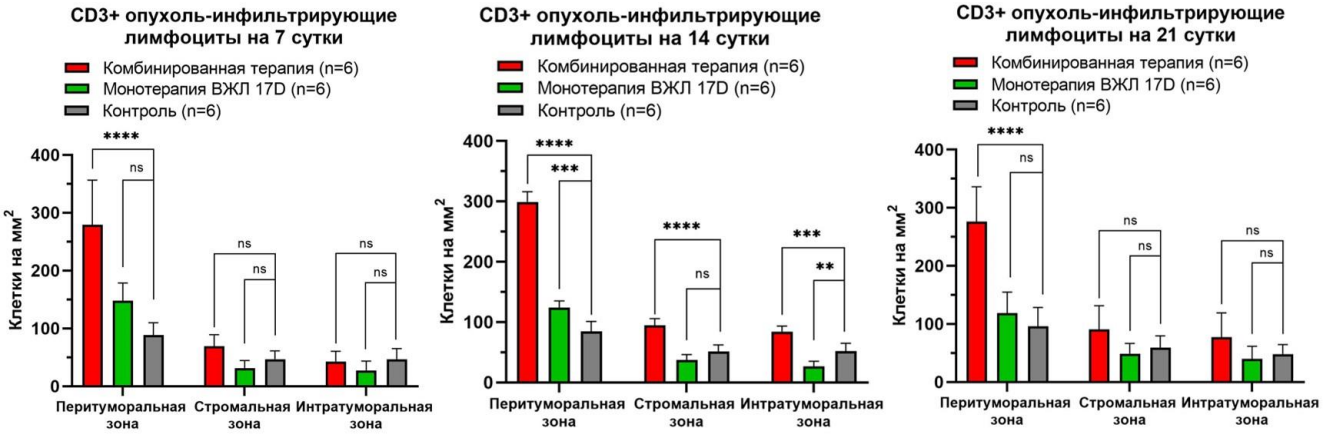
С целью оценки вклада адаптивного иммунного ответа в реализацию противоопухолевого эффекта исследуемых режимов терапии был проведен иммуногистохимический анализ опухолевой ткани Pan02 с определением плотности CD3+, CD4+ и CD8+ клеток. Исследованные образцы опухолей забирали на 7, 14 и 21 сутки после начала терапии. Количественную оценку проводили в перитуморальной зоне, строме и паренхиме опухоли, результаты выражали как число положительно окрашенных клеток на 1 мм² ткани.

Применение указанных маркеров позволило охарактеризовать как общую степень Т-клеточной инфильтрации опухоли, так и соотношение ее регуляторного и цитотоксического компонентов. Учитывая, что CD3 является общим маркером Т-лимфоцитов, CD4 отражает преимущественно популяцию Т-хелперных клеток, а CD8 – цитотоксическое звено клеточного иммунитета, совокупный анализ этих показателей дает возможность оценить направленность иммунных изменений в опухолевом микроокружении под влиянием терапии.

3.2.6.1 Количественная оценка CD3+ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов

CD3 является Т-клеточным маркером и отражает суммарную вовлеченность Т-лимфоцитарного звена в противоопухолевый ответ. Во всех исследованных образцах выявлялись CD3-позитивные клетки, однако их плотность, пространственное распределение и временная динамика зависили от режима терапии. В контрольной группе без терапии (1) CD3+ клетки определялись в небольшом количестве на всех сроках наблюдения и формировали малоплотную инфильтрацию, локализованную преимущественно в строме и лишь частично в

паренхиме опухоли, при этом заметного нарастания показателя с течением времени не происходило (Рисунок 23).



А Б В

Рисунок 23 - Количество CD3+ опухоль-инфильтрирующих клеток в контрольной группе без терапии, группе монотерапии ВЖЛ 17D и группе комбинированной терапии ВЖЛ 17D с руксолитинибом (А) на 7 сутки после терапии; (Б) на 14 сутки после терапии; (В) на 21 сутки после терапии (статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа one-way ANOVA с поправкой Dunnett's на множественные сравнения; n = 6; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001; ns — статистически незначимо)

В группе монотерапии ВЖЛ 17D (3) Т-клеточная инфильтрация также оставалась ограниченной – на 7, 14 и 21 сутки число CD3+ клеток в опухоли было примерно в 1,5 раза выше, чем в контрольной группе без терапии (1), а сами клетки локализовались, главным образом, в перитуморальной зоне с относительно равномерным распределением между стромой и паренхимой (Рисунок 23, Рисунок 24Б). Такая картина позволяет предположить, что изолированное введение вируса само по себе индуцирует иммунное распознавание опухоли, однако этого воздействия недостаточно для формирования выраженной и устойчивой Т-клеточной инфильтрации в пределах опухолевого узла.

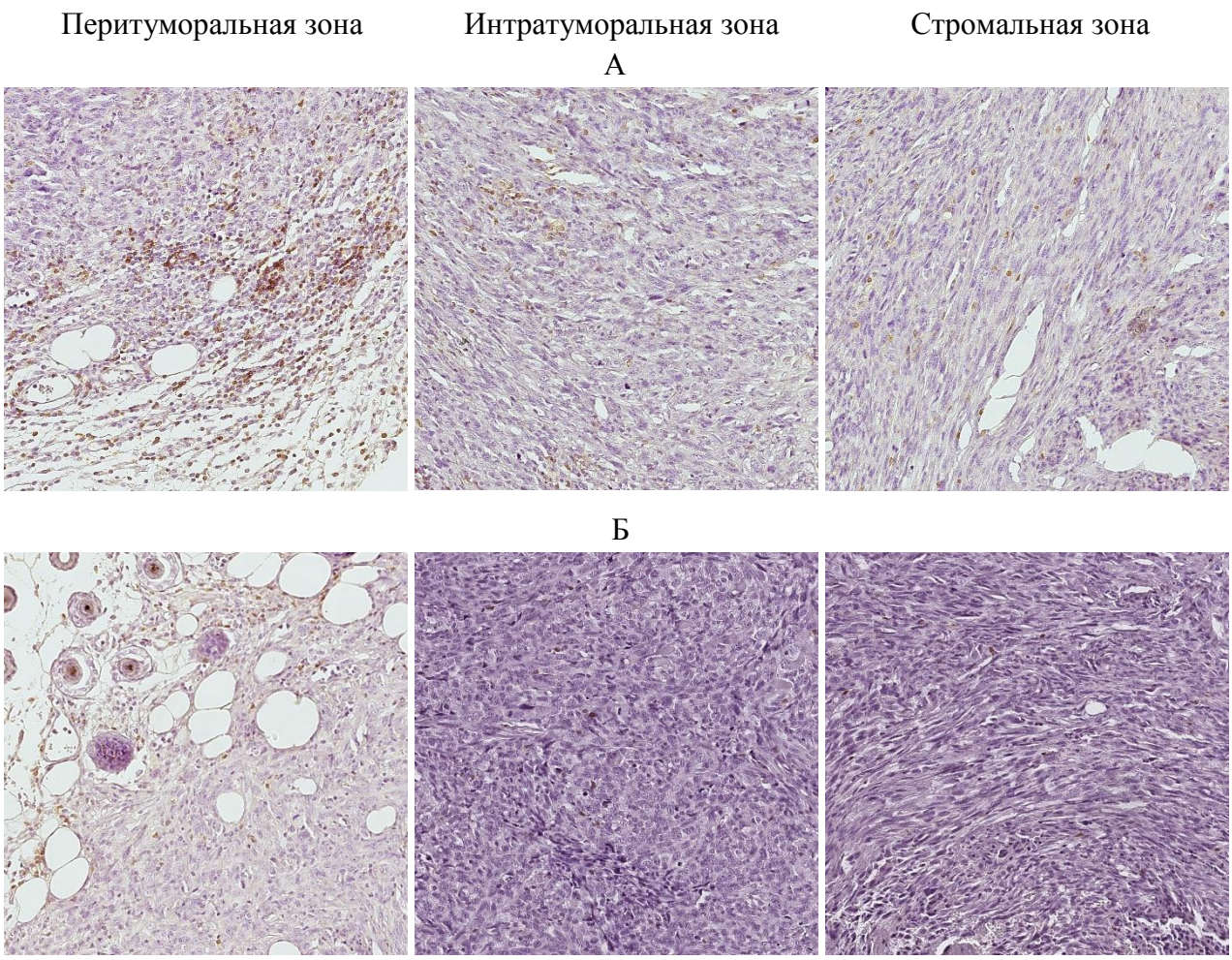


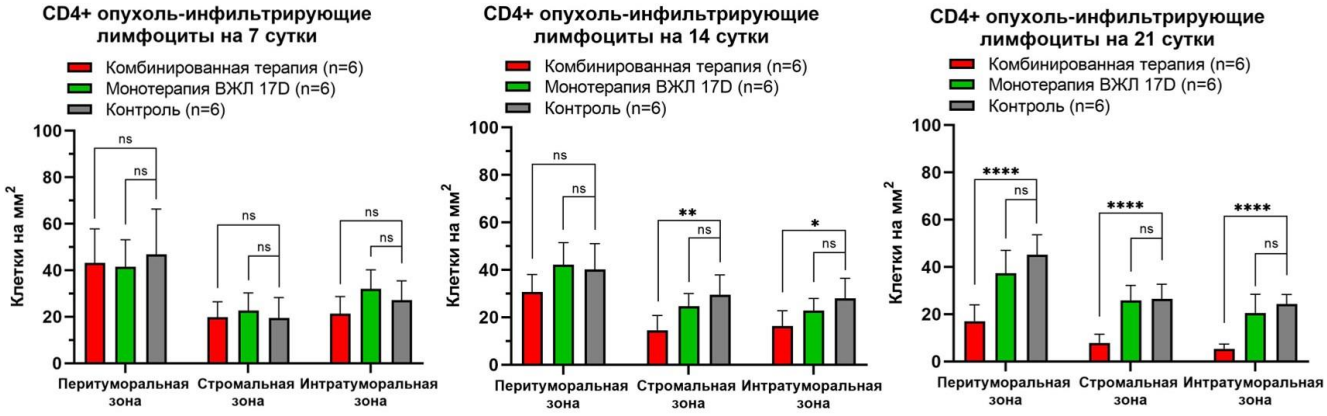
Рисунок 24 - Репрезентативные ИГХ-микрофотографии CD3+ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов в группе комбинированной терапии ВЖЛ 17D с руксолитинибом (А) и в группе монотерапии ВЖЛ 17D (Б) на 14 сутки после терапии (увеличение х40)

Наиболее выраженные изменения наблюдались в группе комбинированной терапии (4). Уже на 7-е сутки количество CD3+ лимфоцитов возрастало в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой без терапии (1) (Рисунок 23А), причем на раннем этапе клетки локализовались преимущественно по периферии опухоли, формируя выраженную перитуморальную инфильтрацию. В дальнейшем общая плотность CD3+ клеток продолжала увеличиваться (Рисунок 24А), и к 21-м суткам достигала максимума, примерно в 3 раза, превышая контрольные значения (Рисунок 23В). Примечательно, что по мере развития иммунного ответа CD3+ клетки не ограничивались периферией опухоли, а постепенно мигрировали в строму и паренхиму, что можно рассматривать как морфологический признак развивающейся активации адаптивного Т-клеточного ответа в результате

комбинированной терапии. Рост общей популяции CD3+ клеток в сочетании с их перераспределением от перитуморальной зоны к более глубоким зонам опухоли указывает на усиление иммунологической вовлеченности опухолевого микроокружения.

3.2.6.2 Количественная оценка CD4+ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов

CD4 является маркером Т-хелперных клеток и при анализе опухолевого микроокружения этот показатель может включать как клетки, способствующие координации иммунного ответа, так и потенциально иммуносупрессивные субпопуляции, включая Treg клетки. CD4+ клетки определялись во всех исследованных группах и на всех сроках наблюдения. Максимальная плотность CD4+ инфильтрации выявлялась в контрольной группе без терапии (1), где клетки формировали относительно плотные скопления в строме и паренхиме опухоли. На протяжении всего срока наблюдения именно в контрольной группе без терапии (1) сохранялось наибольшее количество CD4+ клеток (Рисунок 25).



А Б В

Рисунок 25 - Количество CD4+ опухоль-инфильтрирующих клеток в контрольной группе без терапии, группе монотерапии ВЖЛ 17D и группе комбинированной терапии ВЖЛ 17D с руксолитинибом (А) на 7 сутки после терапии; (Б) на 14 сутки после терапии; (В) на 21 сутки после терапии (статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа one-way ANOVA с поправкой Dunnett’s на множественные сравнения; n = 6; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$; ns — статистически незначимо)

На 7-е сутки после начала терапии количество CD4+ клеток во всех группах было сопоставимым независимо от их локализации (Рисунок 25А). В группе монотерапии ВЖЛ 17D (3) существенной динамики данного показателя в дальнейшем не отмечалось: на 14-е и 21-е сутки плотность CD4+ инфильтрации оставалась примерно на исходном уровне (Рисунок 25Б и 25В, Рисунок 26Б). Таким образом, изолированное применение вируса не сопровождалось значимым изменением плотности CD4+ клеток в опухолевом микроокружении.

Наименьшее количество CD4+ клеток было зарегистрировано в группе комбинированной терапии (4). Уже на 7-е сутки их число в паренхиме опухоли было несколько ниже, чем в контрольной группе без терапии (1) и группе монотерапии ВЖЛ 17D (3) (Рисунок 25А). В дальнейшем отмечалась тенденция к снижению плотности CD4+ инфильтрата, и к 21-м суткам количество CD4+ клеток достигало минимальных значений – приблизительно в 4 раза ниже по сравнению с контрольной группой без терапии (1) (Рисунок 25В, Рисунок 26А). В отдельных образцах CD4+ клетки практически отсутствовали и были представлены лишь единичными диффузно расположенными элементами в строме.

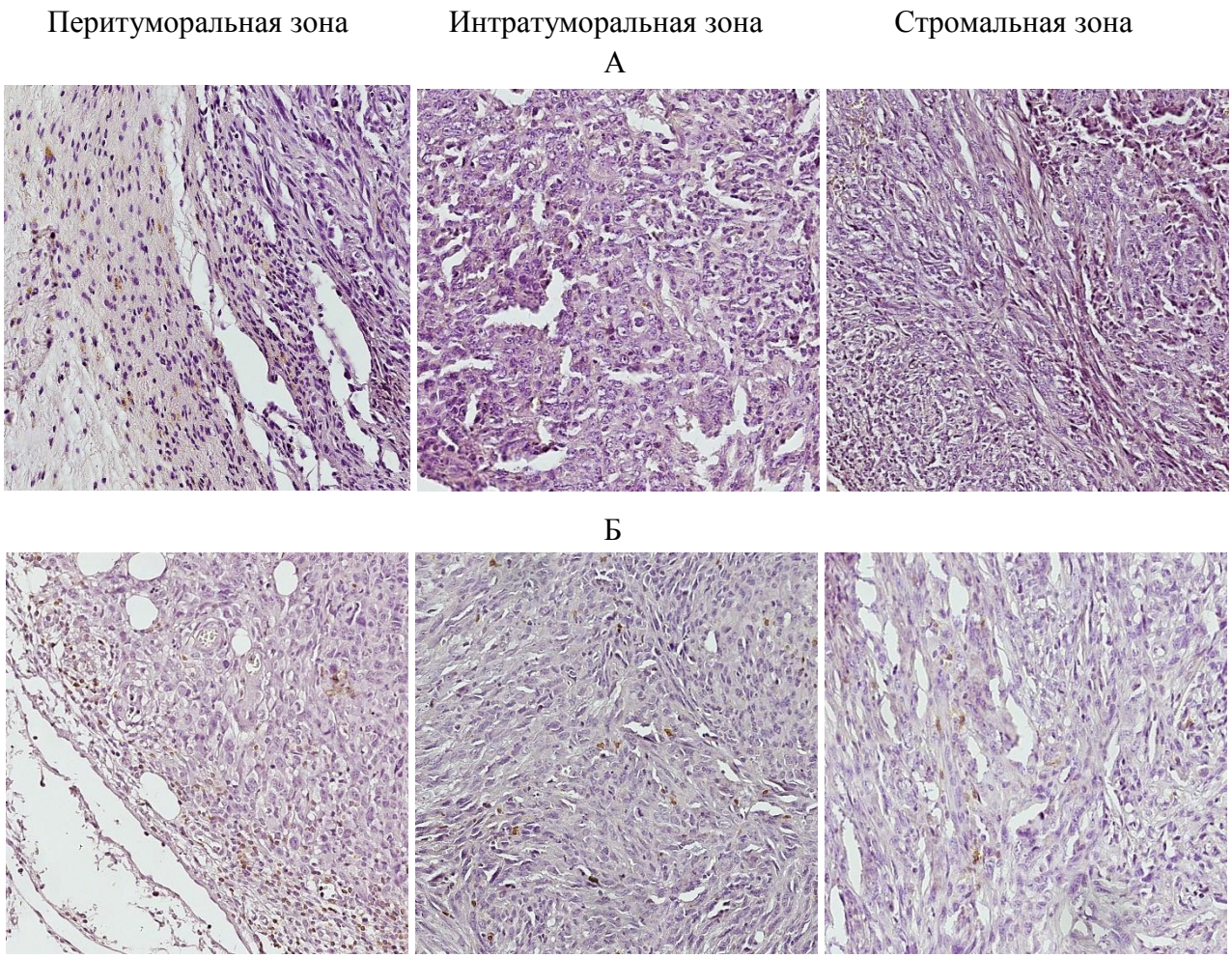


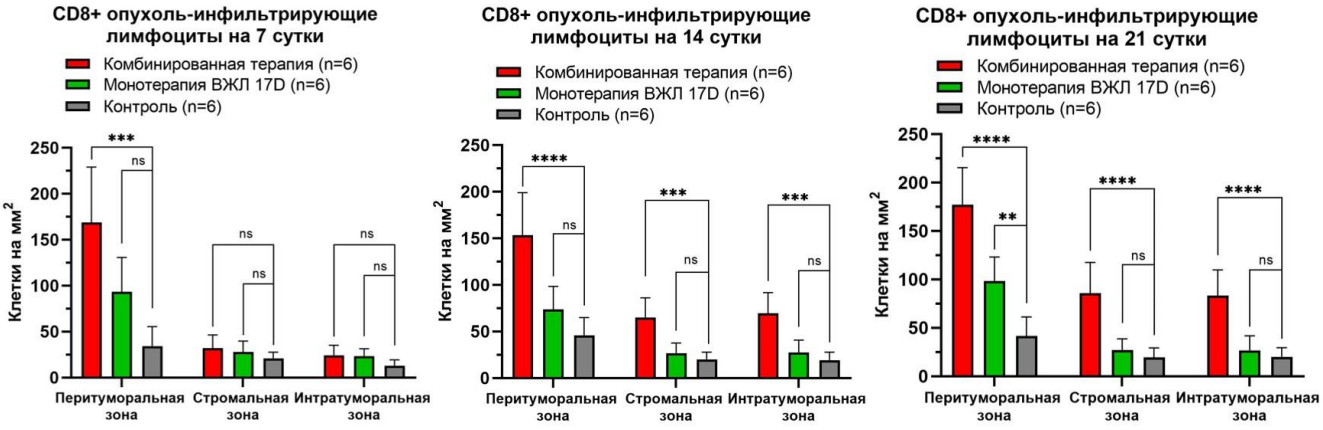
Рисунок 26 - Репрезентативные ИГХ-микрофотографии CD4+ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов в группе комбинированной терапии ВЖЛ 17D с руксолитинибом (А) и в группе монотерапии ВЖЛ 17D (Б) на 21 сутки после терапии (увеличение х40)

Выявленная динамика позволяет заключить, что комбинированная терапия сопровождалась уменьшением содержания CD4+ клеток в опухолевой ткани. Следует отметить, что маркер CD4 не позволяет дифференцировать отдельные функциональные субпопуляции, в том числе Т-хелперы и Treg клетки. Вместе с тем снижение плотности CD4+ инфильтрата на фоне одновременного увеличения CD8+ клеток может рассматриваться, как признак изменения иммунного баланса в опухолевом микроокружении в сторону более выраженного цитотоксического ответа.

3.2.6.3 Количественная оценка CD8+ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов

CD8 является маркером цитотоксических Т-лимфоцитов и, следовательно, наиболее точно отражает интенсивность эффекторного противоопухолевого иммунного ответа. CD8+ клетки выявлялись во всех исследованных группах, локализуясь как в строме, так и в паренхиме опухоли. В отличие от CD4+ клеток, содержание CD8+ лимфоцитов в значительной степени зависело как от режима терапии, так и от временных точек исследования.

В контрольной группе без терапии (1) CD8+ клетки определялись в небольшом количестве на всех сроках наблюдения (Рисунок 27). Они формировали низкоплотную инфильтрацию, локализованную преимущественно в перитуморальной зоне и в меньшей степени в строме и паренхиме опухоли. Существенного изменения данного показателя во времени не отмечалось. Это указывает на слабую выраженность спонтанного цитотоксического иммунного ответа в опухоли Pan02 без терапии.



А Б В

Рисунок 27 - Количество CD8+ опухоль-инфильтрирующих клеток в контрольной группе без терапии, группе монотерапии ВЖЛ 17D и группе комбинированной терапии ВЖЛ 17D с руксолитинибом (А) на 7 сутки после терапии; (Б) на 14 сутки после терапии; (В) на 21 сутки после терапии (статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа one-way ANOVA с поправкой Dunnett’s на множественные сравнения; n = 6; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001; ns — статистически незначимо)

В группе монотерапии ВЖЛ 17D (3) уже на 7-е сутки общее количество CD8+ клеток увеличивалось примерно в 2 раза по сравнению с контрольной группой без терапии (1) (Рисунок 27А). При этом клетки распределялись диффузно в строме, располагались вблизи опухолевых клеток и формировали инфильтрацию

перитуморальной зоны. На 14-е (Рисунок 27Б, Рисунок 28Б) и 21-е сутки (Рисунок 27В) плотность CD8+ инфильтрата оставалась без существенных изменений. Таким образом, монотерапия ВЖЛ 17D вызывала увеличение содержания цитотоксических Т-лимфоцитов, однако данный эффект носил ограниченный характер и не нарастал с течением времени.

Наиболее выраженная CD8+ инфильтрация была выявлена в группе комбинированной терапии (4). Уже к 14-м суткам (Рисунок 27Б, Рисунок 28А) количество CD8+ клеток возрастало примерно в 3 раза по сравнению с контрольной группой без терапии (1). Клетки определялись в строме, перитуморальной зоне и паренхиме опухоли. К 21-м суткам (Рисунок 27В) их число достигало максимальных значений и приблизительно в 4 раза превышало контрольный уровень. По мере увеличения срока наблюдения отмечалось не только нарастание общей плотности CD8+ инфильтрата, но и его более глубокое распространение в опухолевую паренхиму.

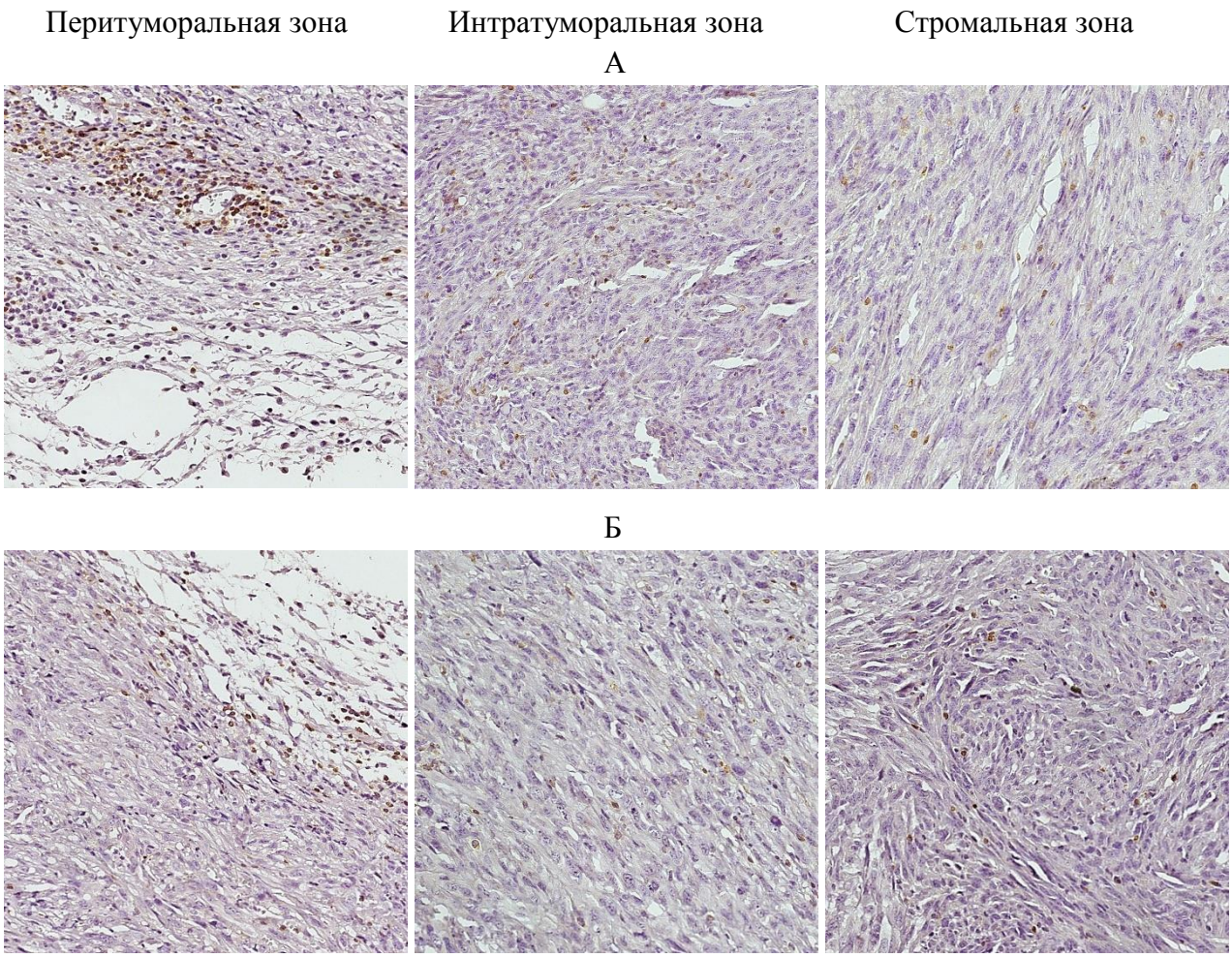


Рисунок 28 - Репрезентативные ИГХ-микрофотографии CD8+ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов в группе комбинированной терапии ВЖЛ 17D с руксолитинибом (А) и в группе монотерапии ВЖЛ 17D (Б) на 14 сутки после терапии (увеличение х40)

Указанные изменения позволяют рассматривать CD8+ популяцию как основной клеточный компонент, ассоциированный с реализацией противоопухолевого эффекта комбинированной терапии. Увеличение количества CD8+ клеток, их сохранение на поздних сроках и проникновение в паренхиму опухоли свидетельствуют о развитии выраженного цитотоксического клеточного ответа в данной группе животных.

3.2.6.4 Интерпретация данных иммуногистохимического анализа

Результаты иммуногистохимического анализа свидетельствуют о том, что исследуемые режимы терапии по-разному влияют на состояние Т-клеточного звена опухолевого микроокружения. Для опухолей контрольной группы без терапии (1)

характерно относительно высокое содержание CD4+ клеток при низкой плотности CD8+ инфильтрации, что соответствует иммунологически неблагоприятному типу микроокружения. Монотерапия ВЖЛ 17D (3) сопровождается умеренным увеличением содержания CD8+ клеток без выраженного нарастания общей CD3+ инфильтрации и без существенного снижения CD4+ компонента. Наиболее выраженные изменения выявлены в группе комбинированной терапии (4) ВЖЛ 17D и руксолитиниба. Данный режим терапии сопровождался увеличением общей Т-клеточной инфильтрации по маркеру CD3, снижением содержания CD4+ клеток и выраженным нарастанием CD8+ цитотоксического инфильтрата с его распространением в опухолевую паренхиму. Полученные данные позволяют заключить, что комбинированная терапия способствует активации адаптивного клеточного иммунного ответа и вносит существенный вклад в развитие регрессии опухолевой ткани, выявленной при морфологическом исследовании [130].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы в первую очередь была проведена комплексная оценка онколитического потенциала вакцинного штамма ВЖЛ 17D в комбинации с ингибитором JAK1/2-киназ руксолитинибом *in vitro* на панели клеточных линий РПЖ различного молекулярно-генетического профиля. Было показано, что исследованные клеточные линии РПЖ существенно различаются по чувствительности к ВЖЛ 17D и по характеру ответа на комбинированное воздействие с руксолитинибом. На основании полученных данных были выделены три основных паттерна ответа: синергичное усиление репликативной активности и цитопатического действия вируса в клетках Pan02 и PANC-1, отсутствие дополнительного усиливающего эффекта руксолитиниба в клетках MiaPaCa-2 и усиление репликации ВЖЛ 17D с отсутствием цитопатического эффекта в клетках Capan-2, AsPC-1 и BxPC-3. Таким образом, было установлено, что руксолитиниб повышает репликативную активность ВЖЛ 17D во всех изученных клеточных линиях, однако усиление цитопатического действия реализуется лишь в части клеточных линий и определяется особенностями молекулярного профиля опухолевых клеток.

Проведенный анализ показал, что выявленные различия в ответе клеточных линий определяются в большей степени не наличием отдельных мутаций в генах KRAS и TP53, а функциональным состоянием интерферон-зависимого противовирусного барьера и базальной активностью JAK/STAT-сигналинга. В клетках Pan02 и PANC-1 ингибирование JAK1/2-киназ руксолитинибом приводило к снятию противовирусного барьера, росту титров вируса и усилению гибели клеток. В клетках MiaPaCa-2, характеризующихся низкой базальной активностью JAK/STAT-оси, ВЖЛ 17D уже сам по себе обеспечивал максимально выраженный онколитический эффект, вследствие чего дополнительное введение руксолитиниба не сопровождалось дальнейшим усилением действия вируса. В резистентных линиях Capan-2, AsPC-1 и BxPC-3 подавление JAK/STAT-сигналинга сопровождалось ростом вирусной репликации, но одновременно ослабляло

интерферон-зависимые проапоптотические механизмы, вследствие чего выраженный цитопатический эффект отсутствовал. Эти результаты представляют особый интерес, поскольку демонстрируют двойственную роль JAK/STAT-оси в опухолевой клетке: с одной стороны, как ключевого звена противовирусного барьера, а с другой как ключевого компонента реализации апоптотической программы гибели клеток при вирусной инфекции.

На следующем этапе работы был определен диапазон концентраций руксолитиниба, обеспечивающих усиление репликации ВЖЛ 17D в резистентных клеточных линиях РПЖ. Было установлено, что руксолитиниб в диапазоне 0,1–5 мкМ дозозависимо усиливает репликацию ВЖЛ 17D в клетках Capan-2, AsPC-1 и BxPC-3. При этом концентрация руксолитиниба 1 мкМ оказалась оптимальной с точки зрения устойчивого усиления вирусной репродукции в резистентных клеточных линиях, тогда как концентрация руксолитиниба 5 мкМ была избыточной и не приводила к дополнительному росту эффекта. Полученные данные имеют важное практическое значение, поскольку впервые для моделей РПЖ был обоснован рабочий диапазон концентраций ингибитора JAK1/2-киназ руксолитиниба, который обеспечивает устойчивое усиление репликации ВЖЛ 17D и может быть использован при дальнейшей разработке комбинированных схем терапии онколитическими вирусами.

Далее в работе была проведена оценка противоопухолевой эффективности комбинации вакцинного штамма ВЖЛ 17D с руксолитинибом на сингенной мышиной модели рака поджелудочной железы Pan02. Было показано, что комбинация внутриопухолевого введения ВЖЛ 17D с внутрибрюшинным введением руксолитиниба приводит к выраженному ингибированию роста опухолей, а в ряде случаев и к их полной деструкции, а также к увеличению выживаемости животных по сравнению с контрольными группами более чем в 2 раза. Тем самым было подтверждено, что комбинированный подход обладает преимуществом не только на клеточных моделях, но и в условиях иммунокомпетентного организма.

Помимо прямой оценки противоопухолевого действия, в работе был изучен иммунный компонент эффекта комбинированной терапии. Было показано, что эффективность комбинации ВЖЛ 17D с руксолитинибом на сингенной модели РПЖ реализуется преимущественно за счет активации адаптивного иммунного ответа, а не прямого литического действия вируса. Цитокиновый анализ опухолевой ткани показал увеличение количества IL-12 на 10 сутки после комбинированной терапии, что косвенно может свидетельствовать об активации продуцирующих IL-12 ДК и макрофагов М1-типа. Иммуногистохимические данные подтвердили увеличение инфильтрации опухоли CD3+/CD8+ лимфоцитами и снижение CD4+ популяции в группе комбинированной терапии, что соответствует преодолению иммуносупрессивного состояния опухоли и формированию цитотоксического Т-клеточного ответа. При этом формирование нейтрализующих антител к ВЖЛ 17D и отсутствие вирусной РНК в мозге и селезенке животных, получавших комбинированную терапию, свидетельствует о сохранности гуморального звена иммунитета и отсутствии системной диссеминации вируса, что подтверждает благоприятный профиль безопасности разработанной схемы комбинированной терапии.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что использование ингибитора JAK1/2-киназ руксолитиниба *in vitro* приводит к усилению цитопатического действия вируса желтой лихорадки (штамм 17D) в клеточных линиях рака поджелудочной железы Pan02, PANC-1, а также к увеличению его репликативной активности в клеточных линиях рака поджелудочной железы Pan02, PANC-1, Capan-2, AsPC-1, BxPC-3.

2. Установлено, что руксолитиниб в диапазоне концентраций 0,1–5 мкМ дозозависимо усиливает репликацию вируса желтой лихорадки (штамм 17D) в резистентных клеточных линиях рака поджелудочной железы Capan-2, AsPC-1, BxPC-3, при этом оптимальная эффективная концентрация руксолитиниба 1 мкМ.

3. Установлено, что комбинация внутриопухолевого введения вируса желтой лихорадки (штамм 17D) с внутрибрюшинным введением руксолитиниба на сингенной модели рака поджелудочной железы Pan02 приводит к выраженному ингибированию роста опухолей, а в ряде случаев к их полной деструкции, а также к увеличению выживаемости животных по сравнению с контрольными группами и группой монотерапии вирусом.

4. Показано, что комбинация внутриопухолевого введения вируса желтой лихорадки (штамм 17D) с внутрибрюшинным введением руксолитиниба на сингенной модели рака поджелудочной железы Pan02 при использованной схеме терапии не приводит к накоплению вируса в мозге и селезенке животных.

5. Установлено, что противоопухолевая эффективность комбинации вируса желтой лихорадки (штамм 17D) с руксолитинибом в иммунокомпетентной модели Pan02 реализуется преимущественно за счет активации адаптивного иммунного ответа: комбинированная терапия усиливает инфильтрацию опухоли CD3+ и CD8+-лимфоцитами на фоне увеличения уровня IL-12.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Проведенный скрининг онколитической активности ВЖЛ 17D в комбинации с руксолитинибом на панели клеточных линий рака поджелудочной железы с различным мутационным профилем и обнаруженные паттерны ответа на комбинированное воздействие могут быть использованы для дальнейшего изучения механизмов вирусного онколиза и внедрения в клиническую практику для персонификации пациентов.

2. Установлено, что концентрация руксолитиниба 1 мкМ является оптимальной для усиления репликации ВЖЛ 17D в резистентных клеточных линиях рака поджелудочной железы, что позволяет рекомендовать ее в качестве ориентировочной рабочей концентрации при изучении других онколитических вирусов на опухолевых моделях различных типах рака.

3. В доклинических исследованиях комбинированной терапии рака поджелудочной железы рекомендуется использовать изученную схему внутриопухолевого введения онколитического вируса в сочетании с внутрибрюшинным введением руксолитиниба, показавшую оптимальный противоопухолевый эффект (ингибирование роста опухолей и увеличение выживаемости животных) при отсутствии нейроинвазии и системной диссеминации вируса.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективным направлением дальнейших исследований является детальное изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе выявленных паттернов ответа различных клеточных линий рака поджелудочной железы на комбинацию ВЖЛ 17D с ингибитором JAK1/2-киназ руксолитинибом *in vitro*. Особый интерес представляет комплексная характеристика JAK/STAT-сигналинга, ISG-профиля и экспрессии рецепторов интерферона в чувствительных и резистентных клеточных линиях, что позволит уточнить набор молекулярных и клеточных маркеров прогнозируемой чувствительности к комбинированной онколитической терапии.

Следующим этапом развития темы является проведение углубленных доклинических исследований предложенной комбинации ВЖЛ 17D с руксолитинибом на дополнительных иммунокомпетентных моделях рака поджелудочной железы и других типов злокачественных новообразований, включая опухоли с различным иммунным и молекулярным профилем. Тестирование данной комбинации на моделях рака толстой кишки, молочной железы и легкого позволит оценить универсальность подхода и уточнить спектр показаний для его потенциального клинического применения. Особое внимание в этих исследованиях должно быть уделено оптимизации режимов дозирования и последовательности введения компонентов терапии, а также оценке возможности сочетания предложенной комбинации с другими видами противоопухолевой терапии (ингибиторы контрольных точек, таргетные препараты, химиотерапия).

Отдельным приоритетным направлением является более глубокое исследование безопасности и токсичности разработанной схемы терапии, включающее расширенную оценку профиля распределения и элиминации вируса, анализ потенциальных побочных эффектов внутриопухолевого введения ВЖЛ 17D на фоне JAK/STAT-ингибирования. Проведение таких исследований на разных видах животных, с использованием расширенного набора клинико-лабораторных и морфологических показателей, необходимо для обоснования перехода к ранним фазам клинических испытаний.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БОЕ — бляшкообразующая единица

ВЖЛ — вирус желтой лихорадки

ВПГ — вирус простого герпеса

ВВС — вирус везикулярного стоматита

ДИ — доверительный интервал

ДК — дендритные клетки

ИГХ — иммуногистохимия

ИКТ — ингибиторы контрольных точек

ИФА — иммуноферментный анализ

ОВ — онколитический вирус

ПЦР — полимеразная цепная реакция

РПЖ — рак поджелудочной железы

СГТ — средний геометрический титр

ЦПД — цитопатическое действие

BRCA1/2 — breast cancer gene 1/2, ген рака молочной железы 1/2

BCL-2/BCL-XL— B-cell lymphoma 2 / extra large, В-клеточная лимфома 2 / экстра-большая

BAX — BCL-2-associated X protein, BCL-2-ассоциированный проапоптотический белок

CAF — cancer-associated fibroblasts, ассоциированные с опухолью фибробласты

CAR-T — chimeric antigen receptor T-cells, Т-клетки с химерным антигенным рецептором

CASP8 — caspase 8 gene, ген каспазы-8

CCL5 — C-C motif chemokine ligand 5, C-C подобный хемокин лиганд 5 типа

CD3/CD4/CD8 — cluster of differentiation 3/4/8, кластер дифференцировки Т-лимфоцитов 3/4/8

CDK4/6 — cyclin-dependent kinase 4/6, циклинзависимые киназы 4/6

CDKN2A — cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, ингибитор циклинзависимой киназы 2A

CTLA-4 — cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, белок 4, связанный с цитотоксическими Т-лимфоцитами

CXCL11, CXCL12 — C-X-C motif chemokine ligand 11/12, C-X-C подобные хемокины 11/12

DAMP — damage-associated molecular patterns, молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением клетки

DMEM — Dulbecco's modified Eagle's medium, модифицированная среда Игла по Дульбекко

EPSTI1 — epithelial stromal interaction protein 1, белок 1, взаимодействующий с эпителием и стромой

FBS — fetal bovine serum, фетальная бычья сыворотка

FDA — food and drug administration, управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (США)

FITC — fluorescein isothiocyanate, флуоресцеин изотиоцианат

FOLFIRINOX — комбинированная химиотерапевтическая схема 5-фторурацил, лейковорин, иринотекан, оксалиплатин

GAF — gamma activated factor, гамма-активируемый фактор

GAS — gamma activation site, сайт активации интерфероном-гамма

GBP1 — guanylate binding protein 1, гуанилат-связывающий белок 1

Gem/nab-P — Gemcitabine/nab-paclitaxel, Гемцитабин/альбумин-связанный паклитаксел

GOF — gain-of-function, мутации с приобретением функции

H-1PV — human parvovirus H-1, парвовирус H-1 человека

HMGB1 — high-mobility group box 1, ядерный белок высокой мобильной группы 1

hSTAT2 — human STAT2, STAT2 человека

IFITM3 — interferon-induced transmembrane protein 3, интерферон-индуцированный трансмембранный белок 3

IFN-α/IFN-β/IFN-γ – interferon-alfa/ interferon-beta / interferon-gamma, интерфероны альфа, бета, гамма

IFNAR1/IFNAR2c — interferon alpha/beta receptor 1/2c, интерфероновый рецептор альфа/бета 1/2c

IFNGR — interferon-gamma receptor, рецептор интерферона гамма

IL-1β/IL-2/IL-6/IL-10/IL-12/IL-21/IL-35 — interleukins, интерлейкины 1β, 2, 6, 10, 12, 21, 35

IRF9 — interferon regulatory factor 9, интерферон-регуляторный фактор 9

ISG — interferon-stimulated genes, интерферон-стимулируемые гены

ISGF3 — interferon-stimulated gene factor 3, стимулируемый генами интерферона фактор 3

ISRE — interferon-stimulated response element, интерферон-стимулируемый элемент ответа

JAK1/JAK2 — Janus kinase 1/2, янус-киназа 1/2 типа

KRAS — онкоген Kirsten RAS, белок крысиной саркомы Кирстен

LOAd703 — Lokon oncolytic adenovirus 703, онколитический аденовирус 703

MAPK — mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа

MCL-1 — myeloid cell leukemia 1 protein, белок миелоидного лейкоза клеток 1 типа

MDSC — myeloid-derived suppressor cells, миелоидные супрессорные клетки

MEK — mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа

MHC-I/MHC-II — major histocompatibility complex class I/II, главный комплекс гистосовместимости 1/2

MOI — multiplicity of infection, множественность заражения

MPNST — malignant peripheral nerve sheath tumor, злокачественная опухоль оболочек периферических нервов

mSTAT2 — mouse STAT2, STAT2 мыши

MX1— myxovirus resistance protein 1, миксовирус-резистентный белок 1

MYC — myelocytomatosis oncogene cellular homolog, клеточный гомолог онкогена миелоцитоматоза

NK — natural killer cells, естественные клетки-киллеры

NOXA — pro-apoptotic BH3-only protein, проапоптотический BH3 белок

OAS1/2/3 — oligoadenylate synthetase 1/2/3, 2'-5'-олигоаденилатсинтетаза 1/2/3

PAMP — pathogen-associated molecular patterns, молекулярные паттерны, ассоциированные с патогеном

PARP — poly(ADP-ribose) polymerase, поли(АДФ-рибоза)-полимераза

PBS — phosphate-buffered saline, фосфатно-солевой раствор

PD-1 — programmed cell death protein 1, рецептор программируемой клеточной смерти

PD-L1 — programmed death-ligand 1, лиганд рецептора программируемой клеточной смерти

PIAS — protein inhibitor of activated STAT, белковый ингибитор активированного STAT

PI3K-AKT-mTOR — phosphoinositide 3-kinase – protein kinase B – mechanistic target of rapamycin, фосфоинозитид-3-киназа – протеинкиназа B – механистическая мишень рапамицина

PKR — protein kinase R, протеинкиназа R

PUMA — p53-upregulated modulator of apoptosis, проапоптотический белок регулятор p53

RAS — rat sarcoma protein, белок саркомы крысы

RAF — rapidly accelerated fibrosarcoma protein, белок быстро прогрессирующей фибросаркомы

RLRs — RIG-I-like receptors, RIG-I-подобные рецепторы

RTCA — real-time cell analysis, анализ клеток в реальном времени

SD — standard deviation, стандартное отклонение

SHP1, SHP2 — Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1/2, тирозиновые фосфатазы 1/2 типа

SMAD4 — SMAD family member 4, белок 4 типа семейства SMAD

SOCS1/SOCS3 — suppressor of cytokine signaling 1/3, супрессоры цитокиновой сигнализации 1/3 типа

STAT1/STAT2/STAT3 — signal transducer and activator of transcription 1/2/3, белок передатчик сигнала и активатор транскрипции 1/2/3 типа

STR — short tandem repeat, короткий тандемный повтор

TAP1/2 — transporter associated with antigen processing 1/2, транспортерный комплекс, связанный с обработкой антигенов 1/2

TGF-β — transforming growth factor beta, трансформирующий фактор роста бета

TIL — tumor-infiltrating lymphocytes, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты

TLR2/TLR7/TLR8/TLR9 — toll-like receptor 2/7/8/9, толл-подобные рецепторы 2/7/8/9 типа

TNF-α — tumor necrosis factor alpha, фактор некроза опухоли альфа

TP53 — tumor protein p53, белок-супрессор опухолей p53

TRAIL — TNF-related apoptosis-inducing ligand, TNF-апоптоз-индуцирующий лиганд

Treg — regulatory T cells, регуляторные Т-клетки

TYK2 — tyrosine kinase 2, тирозин киназа 2 типа

VEGF — vascular endothelial growth factor, сосудисто-эндотелиальный фактор роста

WT — Wild type, дикий тип

XAF1 — XIAP-associated factor 1, проапоптотический фактор XIAP 1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li, X. Global, regional and national burden of pancreatic cancer and its attributable risk factors from 2019 to 2021, with projection to 2044 / X. Li, Y. Zhang, Z. Yan [et al.]. // Frontiers in Oncology. – 2024. – Vol. 14. – P. 1521788. DOI: 10.3389/fonc.2024.1521788.

2. Huang, K. Global trends and future predictions of pancreatic cancer incidence and mortality from 1990 to 2030: A comparative analysis of China, Korea, Japan, and the USA / K. Huang, X. Lan, Z. Chen [et al.]. // PLOS ONE. – 2025. – Vol. 20. – N. 12. – P. e0337181. DOI: 10.1371/journal.pone.0337181.

3. Tonini, V. Pancreatic cancer in 2025: Have we found a solution? / V. Tonini, M. Zanni // World Journal of Gastroenterology. – 2025. – Vol. 31. – N. 43. – P. 111433. DOI: 10.3748/wjg.v31.i43.111433.

4. Ju, Y. Barriers and opportunities in pancreatic cancer immunotherapy / Y. Ju, D. Xu, M.M. Liao [et al.]. // npj Precision Oncology. – 2024. – Vol. 8. – N. 1. – P. 199. DOI: 10.1038/s41698-024-00681-z.

5. Мерабишвили, В.М. Состояние онкологической помощи в России: рак поджелудочной железы (С25). Диагностика, распространённость, качество учёта, погодичная летальность. Часть 1. (клинико-популяционное исследование) / В.М. Мерабишвили, С.С. Багненко, П.В. Балахнин [и др.]. // Формулы фармации. – 2024. – Т. 6. – N. 3. – С. 18–35. DOI: 10.17816/phf636928.

6. Zharikov, Y.O. Pancreatic cancer: statistics and treatment in the Russian Federation / Y.O. Zharikov, S.S. Zemlyakova, Y.V. Kiseleva [et al.]. // Russian Open Medical Journal. – 2020. – Vol. 9. – N. 4. – P. e0415. DOI: 10.15275/rusomj.2020.0415.

7. Мерабишвили, В.М. Состояние онкологической помощи в России: рак поджелудочной железы (С25). Выживаемость больных, с учетом стадии, локализационной и гистологической структурой. Часть 2. (клинико-популяционное исследование) / В.М. Мерабишвили, С.С. Багненко, П.В. Балахнин

[и др.]. // Формулы фармации. – 2024. – Т. 6. – N. 3. – С. 36–46. DOI: 10.17816/phf637168.

8. Biniyazova, A. The incidence, mortality, and survival trends of pancreatic cancer in Kazakhstan: Data from the National Electronic Registry of Oncological Patients (2014–2023) / A. Biniyazova, R. Akhmedullin, A. Ablayeva [et al.]. // Cancers. – 2025. – Vol. 17. – N. 14. – P. 2277. DOI: 10.3390/cancers17142277.

9. Esteves, M. Oncolytic viruses: A novel therapeutic approach for pancreatic cancer / M. Esteves, A.M. Matos, M.T. Cruz // Molecular Therapy Oncology. – 2025. – Vol. 33. – N. 4. – P. 201069. DOI: 10.1016/j.omton.2025.201069.

10. Achim, E. Design and efficacy of oncolytic viruses and antitumor vaccines: A dead end in the immunotherapy of pancreatic cancer? / E. Achim, E. Pîrlici, C. Cristea, M. Tertis // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Vol. 26. – N. 19. – P. 9640. DOI: 10.3390/ijms26199640.

11. Barba-Spaeth, G. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes / G. Barba-Spaeth, R.S. Longman, M.L. Albert, C.M. Rice // The Journal of Experimental Medicine. – 2005. – Vol. 202. – N. 9. – P. 1179–1184. DOI: 10.1084/jem.20051352.

12. Aznar, M.A. Repurposing the yellow fever vaccine for intratumoral immunotherapy / M.A. Aznar, C. Molina, A. Teijeira [et al.]. // EMBO Molecular Medicine. – 2020. – Vol. 12. – N. 1. – P. e10375. DOI: 10.15252/emmm.201910375.

13. Felt, S.A. Ruxolitinib and polycation combination treatment overcomes multiple mechanisms of resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus / S.A. Felt, G.N. Droby, V.Z. Grdzelishvili // Journal of Virology. – 2017. – Vol. 91. – N. 16. – P. e00461-17. DOI: 10.1128/JVI.00461-17.

14. Laurent-Rolle, M. The role of NS5 protein in determination of host cell range for yellow fever virus / M. Laurent-Rolle, J. Morrison // DNA and Cell Biology. – 2019. – Vol. 38. – N. 12. – P. 1414–1417. DOI: 10.1089/dna.2019.5115.

15. Ostojic, A. Ruxolitinib: A new JAK1/2 inhibitor that offers promising options for treatment of myelofibrosis / A. Ostojic, R. Vrhovac, S. Verstovsek // Future Oncology. – 2011. – Vol. 7. – N. 9. – P. 1035–1043. DOI: 10.2217/fon.11.81.

16. Dhital, R. Ruxolitinib and oHSV combination therapy increases CD4 T cell activity and germinal center B cell populations in murine sarcoma / R. Dhital, Y. Kim, D. Kim [et al.]. // Molecular Therapy Oncology. – 2025. – Vol. 33. – N. 1. – P. 200929. DOI: 10.1016/j.omton.2024.200929.

17. Li, Y. Targeting tumor immunosuppressive microenvironment for pancreatic cancer immunotherapy: Current research and future perspective / Y. Li, S. Xiang, W. Pan [et al.]. // Frontiers in Oncology. – 2023. – Vol. 13. – P. 1166860. DOI: 10.3389/fonc.2023.1166860.

18. Guo, J. An integrated overview of the immunosuppression features in the tumor microenvironment of pancreatic cancer / J. Guo, S. Wang, Q. Gao // Frontiers in Immunology. – 2023. – Vol. 14. – P. 1258538. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1258538.

19. Nazarenko, A.S. Immunotherapeutic potential of the yellow fever virus vaccine strain 17D for intratumoral therapy in a murine model of pancreatic cancer / A.S. Nazarenko, Y.K. Biryukova, K.N. Trachuk [et al.]. // Vaccines. – 2025. – Vol. 13. – N. 1. – P. 40. DOI: 10.3390/vaccines13010040.

20. Luo, W. Win or loss? Combination therapy does improve the oncolytic virus therapy to pancreatic cancer / W. Luo, Y. Wang, T. Zhang // Cancer Cell International. – 2022. – Vol. 22. – N. 1. – P. 160. DOI: 10.1186/s12935-022-02583-1.

21. Moerdyk-Schauwecker, M. Resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus: Role of type I interferon signaling / M. Moerdyk-Schauwecker, N.R. Shah, A.M. Murphy [et al.]. // Virology. – 2013. – Vol. 436. – N. 1. – P. 221–234. DOI: 10.1016/j.virol.2012.11.014.

22. Afghani, E. Pancreatic adenocarcinoma / E. Afghani, A.P. Klein // Hematology/Oncology Clinics of North America. – 2022. – Vol. 36. – N. 5. – P. 879–895. DOI: 10.1016/j.hoc.2022.07.002.

23. Siegel, R.L. Cancer statistics, 2026 / R.L. Siegel, T.B. Kratzer, N.S. Wagle [et al.]. // CA: A Cancer Journal for Clinicians. – 2026. – Vol. 76. – N. 1. – P. e70043. DOI: 10.3322/caac.70043.

24. Luo, W. Current epidemiology of pancreatic cancer: Challenges and opportunities / W. Luo, J. Tao, L. Zheng, T. Zhang // Chinese Journal of Cancer Research. – 2020. – Vol. 32. – N. 6. – P. 705–719. DOI: 10.21147/j.issn.1000-9604.2020.06.04.

25. Gharibi, A. Cellular and molecular aspects of pancreatic cancer / A. Gharibi, Y. Adamian, J.A. Kelber // Acta Histochemica. – 2016. – Vol. 118. – N. 3. – P. 305–316. DOI: 10.1016/j.acthis.2016.01.009.

26. Stefanoudakis, D. Significance of TP53, CDKN2A, SMAD4 and KRAS in pancreatic cancer / D. Stefanoudakis, M. Frountzas, D. Schizas [et al.]. // Current Issues in Molecular Biology. – 2024. – Vol. 46. – N. 4. – P. 2827–2844. DOI: 10.3390/cimb46040177.

27. Drizyte-Miller, K. KRAS: the Achilles' heel of pancreas cancer biology / K. Drizyte-Miller, T. Talabi, A. Somasundaram [et al.]. // Journal of Clinical Investigation. – 2025. – Vol. 135. – N. 16. – P. e191939. DOI: 10.1172/JCI191939.

28. Kim, M.K. Prognostic value of the TP53 mutation in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma receiving FOLFIRINOX / M.K. Kim, I.R. Cho, Y. Kim [et al.]. // Therapeutic Advances in Medical Oncology. – 2024. – Vol. 16. – P. 17588359241290482. DOI: 10.1177/17588359241290482.

29. Yokose, T. Combination of KRAS and SMAD4 mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissues as a biomarker for pancreatic cancer / T. Yokose, M. Kitago, S. Matsuda [et al.]. // Cancer Science. – 2020. – Vol. 111. – N. 6. – P. 2174–2182. DOI: 10.1111/cas.14425.

30. Ullman, N.A. Immunologic strategies in pancreatic cancer: Making cold tumors hot / N.A. Ullman, P.R. Burchard, R.F. Dunne, D.C. Linehan // Journal of Clinical Oncology. – 2022. – Vol. 40. – N. 24. – P. 2789–2805. DOI: 10.1200/JCO.21.02616.

31. Olaoba, O.T. Targeted therapy for highly desmoplastic and immunosuppressive tumor microenvironment of pancreatic ductal adenocarcinoma / O.T. Olaoba, M.Yang, T.I.

Adelusi [et al.]. // Cancers. – 2024. – Vol. 16. – N. 8. – P. 1470. DOI: 10.3390/cancers16081470.

32. Li, Z.Y. Immunosuppressive tumor microenvironment shape pancreatic cancer unresponsive to current immunotherapies / Z.Y. Li, S.Y. Peng, F.L. Li, H.Q. Cai // World Journal of Clinical Oncology. – 2026. – Vol. 17. – N. 2. – P. 114423. DOI: 10.5306/wjco.v17.i2.114423.

33. Pan, D. Immunosuppressive tumor microenvironment in pancreatic cancer: mechanisms and therapeutic targets / D. Pan, X. Li, X. Qiao, Q. Wang // Frontiers in Immunology. – 2025. – Vol. 16. – P. 1582305. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1582305.

34. Poyia, F. The role of tumor microenvironment in pancreatic cancer immunotherapy: Current status and future perspectives / F. Poyia, C.M. Neophytou, M.I. Christodoulou, P. Papageorgis // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25. – N. 17. – P. 9555. DOI: 10.3390/ijms25179555.

35. Bugazia, D. Pancreatic ductal adenocarcinoma: the latest on diagnosis, molecular profiling, and systemic treatments / D. Bugazia, E. Al-Najjar, A. Esmail [et al.]. // Frontiers in Oncology. – 2024. – Vol. 14. – P. 1386699. DOI: 10.3389/fonc.2024.1386699.

36. Merza, N. FOLFIRINOX vs. gemcitabine plus nab-paclitaxel as the first-line treatment for pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis / N. Merza, S.K. Farooqui, S.H. Dar [et al.]. // World Journal of Oncology. – 2023. – Vol. 14. – N. 5. – P. 325–339. DOI: 10.14740/wjon1604.

37. Di Costanzo, F. Optimizing first-line chemotherapy in metastatic pancreatic cancer: Efficacy of FOLFIRINOX versus nab-paclitaxel plus gemcitabine / F. Di Costanzo, L. Antonuzzo, E. Mazza [et al.]. // Cancers. – 2023. – Vol. 15. – N. 2. – P. 416. DOI: 10.3390/cancers15020416.

38. Попова, А.С. Комбинированные режимы химиотерапии при раке поджелудочной железы / А.С. Попова, И.А. Покатаев, С.А. Тюляндин // Медицинский совет. – 2017. – N. 6. – С. 62–70. DOI: 10.21518/2079-701X-2017-6-62-70.

39. Цеймах, А.Э. Паллиативное лечение рака поджелудочной железы / А.Э. Цеймах, А.Ф. Лазарев, Я.Н. Шоэхт // Российский онкологический журнал. – 2022. – Т. 27. – N. 3. – С. 117–126. DOI: 10.17816/onco115222.

40. Жукова, Л.Г. Как достигается значимое увеличение выживаемости при раке поджелудочной железы. Роль нутритивного статуса и сопроводительной терапии / Л.Г. Жукова, Д.С. Бордин, Е.А. Дубцова [и др.]. // Современная онкология. – 2023. – Т. 25. – N. 4. – С. 472–483. DOI: 10.26442/18151434.2023.4.202541.

41. Orlandi, E. State of the art of immune checkpoint inhibitors in unresectable pancreatic cancer: A comprehensive systematic review / E. Orlandi, M. Guasconi, A. Romboli [et al.]. // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Vol. 26. – N. 6. – P. 2620. DOI: 10.3390/ijms26062620.

42. Mizuno, K. FOLFIRINOX vs. gemcitabine/nab-paclitaxel for pancreatic cancer by BRCA2 and TMB status: A Japanese C-CAT database study / K. Mizuno, T. Ishikawa, T. Ito [et al.]. // Cancer Science. – 2026. – Vol. 117. – N. 5. – P. 1422–1433. DOI: 10.1111/cas.70351.

43. Bhandari, K. Protein arginine methyltransferases in pancreatic ductal adenocarcinoma: New molecular targets for therapy / K. Bhandari, W.Q. Ding // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – Vol. 25. – N. 7. – P. 3958. DOI: 10.3390/ijms25073958.

44. Wolpin, B. M. Daraxonrasib in previously treated advanced RAS-mutated pancreatic cancer / B.M. Wolpin, W. Park, I. Garrido-Laguna [et al.]. // The New England Journal of Medicine. – 2026. – Vol. 394. – N. 18. – P. 1790–1802. DOI: 10.1056/NEJMoa2505783.

45. O’Reilly, E.M. Daraxonrasib, a RAS(ON) multi-selective inhibitor vs chemotherapy in previously treated metastatic pancreatic adenocarcinoma (mPDAC): Primary and final analysis from the phase 3 RASolute 302 study / E.M. O’Reilly, Z.A. Wainberg, A.E. Hendifar [et al.]. // Journal of Clinical Oncology. – 2026. – Vol. 44. – N. 18. – P. LBA5. DOI: 10.1200/JCO.2026.44.18_suppl.LBA5.

46. Rivera-Orellana, S. Oncolytic virotherapy and tumor microenvironment modulation / S. Rivera-Orellana, J. Bautista, D. Palacios-Zavala [et al.]. // Clinical and Experimental Medicine. – 2025. – Vol. 25. – N. 1. – P. 256. DOI: 10.1007/s10238-025-01691-2.

47. Ibrahim, A.M. Viro-immune therapy: A new strategy for treatment of pancreatic cancer / A.M. Ibrahim, Y.H. Wang // World Journal of Gastroenterology. – 2016. – Vol. 22. – N. 2. – P. 748–763. DOI: 10.3748/wjg.v22.i2.748.

48. Taylor, I.P. Oncolytic adenoviruses and the treatment of pancreatic cancer: a review of clinical trials / I.P. Taylor, J.A. Lopez // Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. – 2023. – Vol. 149. – N. 10. – P. 8117–8129. DOI: 10.1007/s00432-023-04735-w.

49. Li, Q. The gamble between oncolytic virus therapy and IFN / Q. Li, F. Tan, Y. Wang [et al.]. // Frontiers in Immunology. – 2022. – Vol. 13. – P. 971674. DOI: 10.3389/fimmu.2022.971674.

50. Wirth, T.C. Live vaccines – a short-cut to cancer viro-immunotherapy / T.C. Wirth, J. Niemann, F. Kühnel // EMBO Molecular Medicine. – 2020. – Vol. 12. – N. 1. – P. e11496. DOI: 10.15252/emmm.201911496.

51. Wennier, S. Oncolytic virotherapy for pancreatic cancer / S. Wennier, S. Li, G. McFadden // Expert Reviews in Molecular Medicine. – 2011. – Vol. 13. – P. e18. DOI: 10.1017/S1462399411001876.

52. Nisar, M. An extensive review on preclinical and clinical trials of oncolytic viruses therapy for pancreatic cancer / M. Nisar, R.Z. Paracha, S. Adil [et al.]. // Frontiers in Oncology. – 2022. – Vol. 12. – P. 875188. DOI: 10.3389/fonc.2022.875188.

53. Musher, B. L. LOAd703, an oncolytic virus-based immunostimulatory gene therapy, combined with chemotherapy for unresectable or metastatic pancreatic cancer (LOKON001): results from arm 1 of a non-randomised, single-centre, phase 1/2 study / B.L. Musher, E.K. Rowinsky, B.G. Smaglo [et al.]. // The Lancet Oncology. – 2024. – Vol. 25. – N. 4. – P. 488–500. DOI: 10.1016/S1470-2045(24)00079-2.

54. Zhao, X. Strategic combinations: The future of oncolytic virotherapy with reovirus / X. Zhao, C. Chester, N. Rajasekaran [et al.]. // Molecular Cancer Therapeutics. – 2016. – Vol. 15. – N. 5. – P. 767–773. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0695.

55. Collienne, M. GOBLET: a phase I/II study of pelareorep and atezolizumab +/- chemo in advanced or metastatic gastrointestinal cancers / M. Collienne, H. Loghmani, T.C. Heineman, D. Arnold // Future Oncology. – 2022. – Vol. 18. – N. 26. – P. 2871-2878. DOI: 10.2217/fon-2022-0453.

56. Mirbahari, S.N. Recent progress in combination therapy of oncolytic vaccinia virus / S.N. Mirbahari, M. Da Silva, A.I.M. Zúñiga [et al.]. // Frontiers in Immunology. – 2024. – Vol. 15. – P. 1272351. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1272351.

57. Трачук, К.Н. Влияние врожденного иммунного ответа на эффективность действия онколитических вирусов / К.Н. Трачук, Н.Б. Пестов, Ю.К. Бирюкова, Н.М. Колясникова // Вопросы вирусологии. – 2024. – Т. 69. – N. 6. – С. 479–488. DOI: 10.36233/0507-4088-275.

58. Barton, K.N. Phase I trial of oncolytic adenovirus-mediated cytotoxic and interleukin-12 gene therapy for the treatment of metastatic pancreatic cancer / K.N. Barton, F. Siddiqui, R. Pompa [et al.]. // Molecular Therapy – Oncolytics. – 2021. – Vol. 20. – P. 94–104. DOI: 10.1016/j.omto.2020.11.006.

59. Mato-Berciano, A. A NOTCH-sensitive uPAR-regulated oncolytic adenovirus effectively suppresses pancreatic tumor growth and triggers synergistic anticancer effects with gemcitabine and nab-paclitaxel / A. Mato-Berciano, G. Raimondi, M.V. Maliandi [et al.]. // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8. – N. 14. – P. 22700–22715. DOI: 10.18632/oncotarget.15169.

60. Mirbahari, S.N. Oncolytic viruses reshape PD-1/PD-L1 signaling: Mechanisms and clinical synergy with immune checkpoint blockade / S.N. Mirbahari [et al.]. // Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. – 2025. – Vol. 2025. – N. 1. – P. 6036890. DOI: 10.1155/jcpt/6036890.

61. Fu, R. Combination therapy with oncolytic virus and T cells or mRNA vaccine amplifies antitumor effects / R. Fu, R. Qi, H. Xiong [et al.]. // Signal Transduction and

Targeted Therapy. – 2024. – Vol. 9. – N. 1. – P. 118. DOI: 10.1038/s41392-024-01824-1.

62. Bonaldo, M.C. The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines / M.C. Bonaldo, P.C. Sequeira, R. Galler // Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2014. – Vol. 10. – N. 5. – P. 1256–1265. DOI: 10.4161/hv.28117.

63. Beck, A.S. Current status and future prospects of yellow fever vaccines / A.S. Beck, A.D. Barrett // Expert Review of Vaccines. – 2015. – Vol. 14. – N. 11. – P. 1479–1492. DOI: 10.1586/14760584.2015.1083430.

64. Zhang, J. Amino acid changes in two viral proteins drive attenuation of the yellow fever 17D vaccine / J. Zhang, E.C. Chavez, M. Winkler [et al.]. // Nature Microbiology. – 2025. – Vol. 10. – N. 8. – P. 1902–1917. DOI: 10.1038/s41564-025-02047-y.

65. Davis, E.H. Attenuation of live-attenuated yellow fever 17D vaccine virus is localized to a high-fidelity replication complex / E.H. Davis, A.S. Beck, A.E. Strother [et al.]. // mBio. – 2019. – Vol. 10. – N. 5. – P. e02294-19. DOI: 10.1128/mBio.02294-19.

66. Silva, M.L. Clinical and immunological insights on severe, adverse neurotropic and viscerotropic disease following 17D yellow fever vaccination / M.L. Silva, L.R. Espírito-Santo, M.A. Martins [et al.]. // Clinical and Vaccine Immunology. – 2010. – Vol. 17. – N. 1. – P. 118–126. DOI: 10.1128/CVI.00369-09.

67. Thomas, R.E. The safety of yellow fever vaccine 17D or 17DD in children, pregnant women, HIV+ individuals, and older persons: Systematic review / R.E. Thomas, D.L. Lorenzetti, W. Spragins [et al.]. // The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 2012. – Vol. 86. – N. 2. – P. 359–372. DOI: 10.4269/ajtmh.2012.11-0525.

68. Querec, T. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity / T. Querec, S. Bennouna, S. Alkan [et al.]. // The Journal of Experimental Medicine. – 2006. – Vol. 203. – N. 2. – P. 413–424. DOI: 10.1084/jem.20051720.

69. Nazarenko, A.S. Flaviviruses in anti-tumor therapy / A.S. Nazarenko, M.F. Vorovitch, Y.K. Biryukova [et al.]. // Viruses. – 2023. – Vol. 15. – N. 10. – P. 1973. DOI: 10.3390/v15101973.

70. Miorin, L. Host-specific NS5 ubiquitination determines yellow fever virus tropism / L. Miorin, M. Laurent-Rolle, G. Pisanelli [et al.]. // Journal of Virology. – 2019. – Vol. 93. – N. 14. – P. e00151-19. DOI: 10.1128/JVI.00151-19.

71. Goad, D.W. Acquired chemoresistance can lead to increased resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus / D.W. Goad, C. Bressy, M.C. Holbrook, V.Z. Grdzelishvili // Molecular Therapy – Oncolytics. – 2022. – Vol. 24. – P. 59–76. DOI: 10.1016/j.omto.2021.11.019.

72. Hu, X. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic / X. Hu, J. Li, M. Fu, X. Zhao, W. Wang // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2021. – Vol. 6. – N. 1. – P. 402. DOI: 10.1038/s41392-021-00791-1.

73. Raftery, N. Advances in anti-viral immune defence: revealing the importance of the IFN JAK/STAT pathway / N. Raftery, N.J. Stevenson // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2017. – Vol. 74. – N. 14. – P. 2525–2535. DOI: 10.1007/s00018-017-2520-2.

74. Wen, C. Interferon signaling pathways in health and disease / C. Wen, Q. Lan, Y. Wang [et al.]. // Molecular Biomedicine. – 2025. – Vol. 6. – N. 1. – P. 135. DOI: 10.1186/s43556-025-00381-5.

75. Schoggins, J.W. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions / J.W. Schoggins, C.M. Rice // Current Opinion in Virology. – 2011. – Vol. 1. – N. 6. – P. 519–525. DOI: 10.1016/j.coviro.2011.10.008.

76. Au-Yeung, N. Transcriptional and chromatin regulation in interferon and innate antiviral gene expression / N. Au-Yeung, C.M. Horvath // Cytokine & Growth Factor Reviews. – 2018. – Vol. 44. – P. 11–17. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2018.10.003.

77. Hamel, Z. Role of STAT3 in pancreatic cancer / Z. Hamel, S. Sanchez, D. Standing, S. Anant // Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy. – 2024. – Vol. 5. – N. 1. – P. 20–34. DOI: 10.37349/etat.2024.00202.

78. Corcoran, R.B. STAT3 plays a critical role in KRAS-induced pancreatic tumorigenesis / R.B. Corcoran, G. Contino, V. Deshpande [et al.]. // Cancer Research. – 2011. – Vol. 71. – N. 14. – P. 5020–5029. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0908.

79. Schindler, C. Interferons pen the JAK–STAT pathway / C. Schindler, C. Plumlee // Seminars in Cell & Developmental Biology. – 2008. – Vol. 19. – N. 4. – P. 311–318. DOI: 10.1016/j.semcdb.2008.08.010.

80. Jiang, Y. Molecular characterization and prognostic implications of KRAS mutations in pancreatic cancer patients: insights from multi-cohort analysis / Y. Jiang, G. Mai, X. Zhao [et al.]. // npj Precision Oncology. – 2025. – Vol. 9. – N. 1. – P. 299. DOI: 10.1038/s41698-025-01087-1.

81. Hobbs, G.A. Atypical KRASG12R mutant is impaired in PI3K signaling and macropinocytosis in pancreatic cancer / G.A. Hobbs, N.M. Baker, A.M. Miermont [et al.]. // Cancer Discovery. – 2020. – Vol. 10. – N. 1. – P. 104–123. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-19-1006.

82. Park, J.T. Differential in vivo tumorigenicity of diverse KRAS mutations in vertebrate pancreas: A comprehensive survey / J.T. Park, N. Johnson, S. Liu [et al.]. // Oncogene. – 2015. – Vol. 34. – N. 21. – P. 2801–2806. DOI: 10.1038/onc.2014.223.

83. Inoue, K. IFNAR pathway drives the more aggressive phenotype of KRASG12D-mutant pancreatic ductal adenocarcinomas via IFNAR1/STAT3 activation / K. Inoue, D.H. Schanne, A. Matsui [et al.]. // bioRxiv. – 2022. – Preprint. DOI: 10.1101/2022.06.29.497540.

84. Muñoz-Fontela, C. Transcriptional role of p53 in interferon-mediated antiviral immunity / C. Muñoz-Fontela, S. Macip, L. Martínez-Sobrido [et al.]. // The Journal of Experimental Medicine. – 2008. – Vol. 205. – N. 8. – P. 1929–1938. DOI: 10.1084/jem.20080383.

85. Rivas, C. Dual role of p53 in innate antiviral immunity / C. Rivas, S.A. Aaronson, C. Munoz-Fontela // Viruses. – 2010. – Vol. 2. – N. 1. – P. 298–313. DOI: 10.3390/v2010298.

86. Chen, X. Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation / X. Chen, T. Zhang, W. Su [et al.]. // Cell Death & Disease. – 2022. – Vol. 13. – N. 11. – P. 974. DOI: 10.1038/s41419-022-05408-1.

87. Zhang, C. Gain-of-function mutant p53 in cancer progression and therapy / C. Zhang, J. Liu, D. Xu [et al.]. // Journal of Molecular Cell Biology. – 2020. – Vol. 12. – N. 9. – P. 674–687. DOI: 10.1093/jmcb/mjaa040.

88. Grard, M. Homozygous co-deletion of type I interferons and CDKN2A genes in thoracic cancers: Potential consequences for therapy / M. Grard, C. Chatelain, T. Delaunay [et al.]. // Frontiers in Oncology. – 2021. – Vol. 11. – P. 695770. DOI: 10.3389/fonc.2021.695770.

89. Kimura, H. The role of inherited pathogenic CDKN2A variants in susceptibility to pancreatic cancer / H. Kimura, A.P. Klein, R.H. Hruban, N.J. Roberts // Pancreas. – 2021. – Vol. 50. – N. 8. – P. 1123–1130. DOI: 10.1097/MPA.0000000000001888.

90. Mabry, A. Elevated type I interferon signaling defines the proliferative advantage of ARF and p53 mutant tumor cells / A. Mabry, C.E. Kuzmicki, A. O'Brien [et al.]. // Molecular and Cellular Biology. – 2025. – Vol. 45. – N. 6. – P. 246–261. DOI: 10.1080/10985549.2025.2497817.

91. Dempe, S. SMAD4: a predictive marker of PDAC cell permissiveness for oncolytic infection with parvovirus H-1PV / S. Dempe, A.Y. Stroh-Dege, E. Schwarz [et al.]. // International Journal of Cancer. – 2010. – Vol. 126. – N. 12. – P. 2914–2927. DOI: 10.1002/ijc.24992.

92. Elli, E.M. Mechanisms underlying the anti-inflammatory and immunosuppressive activity of ruxolitinib / E.M. Elli, C. Baratè, F. Mendicino [et al.]. // Frontiers in Oncology. – 2019. – Vol. 9. – P. 1186. DOI: 10.3389/fonc.2019.01186.

93. Hurwitz, H.I. Randomized, double-blind, phase II study of ruxolitinib or placebo in combination with capecitabine in patients with metastatic pancreatic cancer for whom therapy with gemcitabine has failed / H.I. Hurwitz, N. Uppal, S.A. Wagner [et al.]. // Journal of Clinical Oncology. – 2015. – Vol. 33. – N. 34. – P. 4039–4047. DOI: 10.1200/JCO.2015.61.4578.

94. Ghonime, M.G. Combination therapy using ruxolitinib and oncolytic HSV renders resistant MPNSTs susceptible to virotherapy / M.G. Ghonime, K.A. Cassady // Cancer

Immunology Research. – 2018. – Vol. 6. – N. 12. – P. 1499–1510. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0014.

95. Hastie, E. Novel biomarkers of resistance of pancreatic cancer cells to oncolytic vesicular stomatitis virus / E. Hastie, M. Cataldi, M.J. Moerdyk-Schauwecker [et al.]. // Oncotarget. – 2016. – Vol. 7. – N. 38. – P. 61601–61618. DOI: 10.18632/oncotarget.11202.

96. Patel, M.R. JAK/STAT inhibition with ruxolitinib enhances oncolytic virotherapy in non-small cell lung cancer models / M.R. Patel, A. Dash, B.A. Jacobson [et al.]. // Cancer Gene Therapy. – 2019. – Vol. 26. – N. 11–12. – P. 411–418. DOI: 10.1038/s41417-018-0074-6.

97. Islam, S. Targeting JAK/STAT signaling antagonizes resistance to oncolytic reovirus therapy driven by prior infection with HTLV-1 in models of T-cell lymphoma / S. Islam, C.M. Espitia, D.O. Persky [et al.]. // Viruses. – 2021. – Vol. 13. – N. 7. – P. 1406. DOI: 10.3390/v13071406.

98. Назаренко, А.С. Исследование онколитического потенциала вакцинных штаммов вирусов желтой лихорадки и клещевого энцефалита в отношении клеточных линий глиобластом и карцином поджелудочной железы / А.С. Назаренко, Ю.К. Бирюкова, Е.А. Орлова [и др.]. // Вопросы вирусологии. – 2023. – Т. 68. – В. 6. – С. 536–548. DOI: 10.36233/0507-4088-204.

99. Pham, T.N.D. Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma and their utility in immunotherapy studies / T.N.D. Pham, M.A. Shields, C. Spaulding [et al.]. // Cancers. – 2021. – Vol. 13. – N. 3. – P. 440. DOI: 10.3390/cancers13030440.

100. Zorde Khvalevsky, E. Mutant KRAS is a druggable target for pancreatic cancer / E. Zorde Khvalevsky, R. Gabai, I.H. Rachmut [et al.]. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2013. – Vol. 110. – N. 51. – P. 20723–20728. DOI: 10.1073/pnas.1314307110.

101. Gradiz, R. MIA PaCa-2 and PANC-1 – pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors / R. Gradiz, H.C. Silva,

L. Carvalho [et al.]. // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – P. 21648. DOI: 10.1038/srep21648.

102. Vitale, G. Type I interferons in the treatment of pancreatic cancer: Mechanisms of action and role of related receptors / G. Vitale, C.H. van Eijck, P.M. van Koetsveld [et al.]. // Annals of Surgery. – 2007. – Vol. 246. – N. 2. – P. 259–268. DOI: 10.1097/01.sla.0000261460.07110.f2.

103. Booy, S. Influence of type-I interferon receptor expression level on the response to type-I interferons in human pancreatic cancer cells / S. Booy, L.J. Hofland, C.H. van Eijck [et al.]. // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2014. – Vol. 18. – N. 3. – P. 492–502. DOI: 10.1111/jcmm.12200.

104. McCubrey, J.A. Wild type and gain of function mutant TP53 can regulate the sensitivity of pancreatic cancer cells to chemotherapeutic drugs, EGFR/Ras/Raf/MEK, and PI3K/mTORC1/GSK-3 pathway inhibitors, nutraceuticals and alter metabolic properties / J.A. McCubrey, K. Lertpiriyapong, L.S. Steelman [et al.]. // Aging. – 2022. – Vol. 14. – N. 8. – P. 3365–3386. DOI: 10.18632/aging.204038.

105. Xu, D. Inhibition of mutant Kras and p53-driven pancreatic carcinogenesis by atorvastatin: Mainly via targeting of the farnesylated DNAJA1 in chaperoning mutant p53 / D. Xu, J. Hu, J.T. DeSano [et al.]. // Molecular Carcinogenesis. – 2019. – Vol. 58. – N. 11. – P. 2052–2064. DOI: 10.1002/mc.23097.

106. Deer, E.L. Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines / E.L. Deer, J. González-Hernández, J.D. Coursen [et al.]. // Pancreas. – 2010. – Vol. 39. – N. 4. – P. 425–435. DOI: 10.1097/MPA.0b013e3181c15963.

107. Legendre, O. BxPC3 pancreatic cancer cells express a truncated Smad4 protein upon PI3K and mTOR inhibition / O. Legendre, A. Sookdeo, D.A. Foster // Oncology Letters. – 2014. – Vol. 7. – N. 4. – P. 1165–1168. DOI: 10.3892/ol.2014.1833.

108. Friedman, H.M. Comparison of WI-38, MRC-5, and IMR-90 cell strains for isolation of viruses from clinical specimens / H.M. Friedman, C. Koropchak // Journal of Clinical Microbiology. – 1978. – Vol. 7. – N. 4. – P. 368–371. DOI: 10.1128/JCM.7.4.368-371.1978.

109. Soifer, L. Fully phased sequence of a diploid human genome determined de novo from the DNA of a single individual / L. Soifer, N.L. Fong, N. Yi [et al.]. // G3: Genes, Genomes, Genetics. – 2020. – Vol. 10. – N. 9. – P. 2911–2925. DOI: 10.1534/g3.119.400995.

110. Zhou, R. Tumor-intrinsic interferon signaling drives pancreatic cancer resistance to tumor mucin1-targeted CAR T cell therapy / R. Zhou, R. Mayberry, T. Firmin [et al.]. // Frontiers in Immunology. – 2025. – Vol. 16. – P. 1618415. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1618415.

111. Padavano, J. Mutant K-RAS promotes invasion and metastasis in pancreatic cancer through GTPase signaling pathways / J. Padavano, R.S. Henkhaus, H. Chen [et al.]. // Cancer Growth and Metastasis. – 2015. – Vol. 8. – Suppl. 1. – P. 95–113. DOI: 10.4137/CGM.S29407.

112. Wu, Y.Y. Oncolytic viruses-modulated immunogenic cell death, apoptosis and autophagy linking to virotherapy and cancer immune response / Y.Y. Wu, T.K. Sun, M.S. Chen [et al.]. // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2023. – Vol. 13. – P. 1142172. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1142172.

113. Nan, Y. Interferon independent non-canonical STAT activation and virus induced inflammation / Y. Nan, C. Wu, Y.J. Zhang // Viruses. – 2018. – Vol. 10. – N. 4. – P. 196. DOI: 10.3390/v10040196.

114. Komar, H.M. Inhibition of Jak/STAT signaling reduces the activation of pancreatic stellate cells in vitro and limits caerulein-induced chronic pancreatitis in vivo / H.M. Komar, G. Serpa, C. Kerscher [et al.]. // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – N. 1. – P. 1787. DOI: 10.1038/s41598-017-01973-0.

115. Gurevic, I. JAK inhibitor withdrawal causes a transient pro-inflammatory cascade: A potential mechanism for major adverse cardiac events / I. Gurevic, L. Meudec, X. Mariette [et al.]. // PLOS ONE. – 2025. – Vol. 20. – N. 6. – P. e0311706. DOI: 10.1371/journal.pone.0311706.

116. Qureshy, Z. Targeting the JAK/STAT pathway in solid tumors / Z. Qureshy, D.E. Johnson, J.R. Grandis // Journal of Cancer Metastasis and Treatment. – 2020. – Vol. 6. – P. 27. DOI: 10.20517/2394-4722.2020.58.

117. Трачук, К.Н. Усиление репликации онколитических флави- и альфавирусов в резистентных клеточных линиях аденокарциномы поджелудочной железы человека с использованием руксолитиниба / К.Н. Трачук, Ю.К. Бирюкова, В.А. Капранов [и др.]. // Вопросы вирусологии. – 2026. – Т. 71. – N. 4. – С. 380–390. DOI: 10.36233/0507-4088-409.

118. Kahlig, C. Enhancement of rAAV titers via inhibition of the interferon signaling cascade in transfected HEK293 suspension cultures / C. Kahlig, S. Moser, L. Micutkova [et al.]. // Biotechnology Journal. – 2024. – Vol. 19. – N. 5. – P. e2300672. DOI: 10.1002/biot.202300672.

119. Partecke, L.I. A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines / L.I. Partecke, A. Kaeding, M. Sendler [et al.]. // European Surgical Research. – 2011. – Vol. 47. – N. 2. – P. 98–107. DOI: 10.1159/000329413.

120. Акопов, С.Б. Модели опухоли поджелудочной железы Pan02, несущей маркер GFP, на мышах / С.Б. Акопов, Е.В. Снежков, М.В. Коновалова [и др.]. // Медицинская иммунология. – 2024. – Т. 26. – N. 5. – С. 1099–1106. DOI: 10.15789/1563-0625-PPT-16858.

121. Dold, C. Application of interferon modulators to overcome partial resistance of human ovarian cancers to VSV-GP oncolytic viral therapy / C. Dold, C.R. Urbiola, G. Wollmann [et al.]. // Molecular Therapy – Oncolytics. – 2016. – Vol. 3. – P. 16021. DOI: 10.1038/mto.2016.21.

122. Min, J. Ruxolitinib attenuates microglial inflammatory response by inhibiting NF-κB/MAPK signaling pathway / J. Min, H. Zheng, H. Xia [et al.]. // European Journal of Pharmacology. – 2024. – Vol. 968. – P. 176403. DOI: 10.1016/j.ejphar.2024.176403.

123. Nguyen, H.M. Oncolytic virus encoding a master pro-inflammatory cytokine interleukin 12 in cancer immunotherapy / H.M. Nguyen, K. Guz-Montgomery, D. Saha // Cells. – 2020. – Vol. 9. – N. 2. – P. 400. DOI: 10.3390/cells9020400.

124. Hatami, J. Interleukin-12 encoded by the oncolytic virus VSV-GP enhances therapeutic antitumor efficacy by inducing CD8+ T-cell responses with a long-lived effector cell phenotype / J. Hatami, K. Das, L. Wolf [et al.]. // Journal for ImmunoTherapy of Cancer. – 2025. – Vol. 13. – N. 8. – P. e010675. DOI: 10.1136/jitc-2024-010675.

125. Evgin, L. Oncolytic virus-derived type I interferon restricts CAR T cell therapy / L. Evgin, A.L. Huff, P. Wongthida [et al.]. // Nature Communications. – 2020. – Vol. 11. – N. 1. – P. 3187. DOI: 10.1038/s41467-020-17011-z.

126. Schönberg, K. The JAK1/JAK2 inhibitor ruxolitinib substantially affects NK cell biology / K. Schönberg, J. Rudolph, M. Vonnahme [et al.]. // Blood. – 2013. – Vol. 122. – N. 21. – P. 16. DOI: 10.1182/blood.V122.21.16.16.

127. Casey, R.M. Immunogenicity of fractional-dose vaccine during a yellow fever outbreak – final report / R.M. Casey, J.B. Harris, S. Ahuka-Mundeke [et al.]. // The New England Journal of Medicine. – 2019. – Vol. 381. – N. 5. – P. 444–454. DOI: 10.1056/NEJMoa1710430.

128. Julander, J.G. Immune correlates of protection against yellow fever determined by passive immunization and challenge in the hamster model / J.G. Julander, D.W. Trent, T.P. Monath // Vaccine. – 2011. – Vol. 29. – N. 35. – P. 6008–6016. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.06.034.

129. Luo, Y. Tumor-targeting oncolytic virus elicits potent immunotherapeutic vaccine responses to tumor antigens / Y. Luo, C. Lin, Y. Zou [et al.]. // OncoImmunology. – 2020. – Vol. 9. – N. 1. – P. 1726168. DOI: 10.1080/2162402X.2020.1726168.

130. Trachuk, K.N. From oncolysis to adaptive immunity: Yellow fever virus 17D and ruxolitinib activate antitumor immune responses in pancreatic cancer models / K.N. Trachuk, Y.K. Biryukova, V.A. Kapranov [et al.]. // Biomedicines. – 2026. – Vol. 14. – N. 8. – P. 1763. DOI: 10.3390/biomedicines14081763.