

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Осипова Ивана Дмитриевича
«Онколитические свойства теломеразы-специфичного аденовируса серотипа 6, усиленного
геном человеческого ГМ-КСФ»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

Актуальность темы. На сегодняшний день одним из наиболее перспективных подходов к лечению опухолей считается виротерапия – иммунотерапевтический подход, основанный на опосредованной вирусом гибели опухолевых клеток и индукции иммунного ответа организма. Множество онколитических вирусов проходит клинические испытания в качестве потенциальных агентов для терапии злокачественных новообразований, но лишь 4 противоопухолевых лекарственных препарата на их основе применяются в клинической практике.

При конструировании онколитиков для терапии вирусы модифицируют таким образом, чтобы они могли реплицироваться преимущественно в опухолевых клетках, не повреждая при этом здоровые клетки организма. Одним из способов аттенуации является встройка опухолеспецифичных промоторов, например, промотора теломеразы человека, в районы вирусного генома, контролирующие экспрессию жизненно важных вирусных генов. Также, при разработке лекарственных средств противоопухолевые свойства вирусов усиливают, встраивая в геном вируса гены онкотоксических белков или различных цитокинов, модулирующих противоопухолевый иммунный ответ. Ген гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) человека, способного усиливать врожденный иммунный ответ и стимулировать презентацию опухолевых неоантигенов, является одним из наиболее распространенных трансгенов.

Вирусы семейства *Adenoviridae* (Аденовирусы) обладают рядом преимуществ, обуславливающих их широкое применение при разработке агентов противоопухолевой терапии: жизненный цикл аденовируса исключает интеграцию его генома в геном человека; аденовирусы, как правило, слабо патогенны для человека и способны инфицировать опухолевые клетки различного тканевого происхождения; а также имеют большой геном, позволяющий встраивать различные, в том числе протяженные трансгены. Большинство аденовирусных онколитиков создано на основе аденовируса серотипа 5 (Ad5), однако широко распространенный предсуществующий иммунитет к аденовирусу этого серотипа заметно ограничивает эффективность лекарственных препаратов. При этом, аденовирус серотипа 6 (Ad6), имеющий схожие с Ad5 биологические свойства, но гораздо менее распространенный в человеческой популяции, может быть реальной альтернативой Ad5 при разработке противоопухолевых лекарственных средств.

Диссертационная работа Осипова Ивана Дмитриевича посвящена созданию на основе аденовируса серотипа 6 нового онколитического вируса, содержащего встройки промотора гена теломеразы человека hTERT и гена гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (ГМ-КСФ), и оценке его противоопухолевого потенциала, что безусловно является актуальной задачей.

Научная новизна и практическая значимость исследования не вызывают сомнений.

Научная новизна: Впервые изучена цитотоксическая активность и противоопухолевая эффективность аденовируса серотипа 6 (Ad6) на культурах клеток глиобластомы человека *in vitro* и на ксенографтах глиобластомы *in vivo*, соответственно.

На основе метода рекомбинации *in vitro* разработан новый способ получения рекомбинантных штаммов Ad6, позволяющий вносить модификации в гены E1A и E3 вируса, наиболее часто модифицируемые при конструировании онколитических аденовирусов.

Разработанным способом впервые получен рекомбинантный аденовирус Ad6-hT-GM, обладающий селективностью в отношении hTERT-положительных клеток, а также экспрессирующий ген человеческого ГМ-КСФ. Показана противоопухолевая активность нового рекомбинантного аденовируса в сравнении с природными аденовирусами Ad5 и Ad6.

Практическая значимость: Рекомбинантный штамм аденовируса серотипа 6 Ad6-hT-GM защищен патентом РФ RU2753742C1 (в формуле изобретения штамм обозначен как Ad6-hTERT-GMCSF). Лекарственный препарат на основе штамма Ad6/3-hT-GM проходит доклинические испытания в научных учреждениях ФМБА России.

На основе штамма Ad6-hT-GM сконструирован штамм Ad6/3-hT-GM, содержащий дополнительную модификацию в гене белка фибера, обеспечивающую изменение спектра опухолевых мишеней. Штамм Ad6/3-hT-GM защищен Патентом РФ № 2814581 от 01.03.2024 (в формуле изобретения штамм обозначен как Ad6/3-hTERT-GMCSF).

Структура и общая характеристика диссертационной работы

Диссертация Осипова И.Д. имеет классическую структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 241 источник. Работа изложена на 153 страницах, включает 30 рисунков, 4 таблицы и 17 приложений.

Во введении автор обосновал актуальность проводимого исследования, поставил цель исследования, изложил необходимые к выполнению задачи и положения, выносимые на защиту, отразил научную новизну полученных результатов и степень их внедрения в практику, а также привел информацию об апробации результатов работы.

Обзор литературы включает анализ литературных источников, относящихся к исследуемой проблеме, в том числе, значительное количество самых современных публикаций по теме работы.

В Обзоре подробно описана биология аденовирусов: их классификация, строение и жизненный цикл, а также функции белков, кодируемых ключевыми вирусными генами. Рассмотрены вопросы использования аденовирусных векторов в виротерапии, способы аттенуации вирусов и усиления их противоопухолевой эффективности, а также результаты клинических исследований противоопухолевых препаратов на основе, в основном, аденовируса серотипа 5. Отдельная глава Обзора посвящена аденовирусу серотипа 6, его структурным особенностям, особенностям биораспределения и лекарственным средствам, разрабатываемым на его основе. Способы получения рекомбинантных аденовирусов описаны в обзоре достаточно кратко. Обзор дает исчерпывающую информацию об объекте исследования и перспективах его использования.

Глава «Материалы и методы» содержит описание используемых в работе реактивов, материалов и методов и позволяет воспроизвести проведенные эксперименты. При проведении исследований диссертантом применены разнообразные молекулярно-биологические и генно-

инженерные методы, а также методы работы с культурами клеток и лабораторными животными, что подтверждает высокий научно-методический уровень проведенных работ.

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из трех больших разделов, последовательно описывающих этапы исследования. Раздел 3.1 посвящен сравнительному анализу онколитического потенциала Ad6 и Ad5 дикого типа в экспериментах на культурах клеток глиом человека *in vitro* и на модели подкожно трансплантированной глиомы U87 *in vivo*. Автор показал, что *in vitro* Ad6, как и Ad5, обладает высокой цитотоксической активностью в отношении клеток глиобластомы человека. Противоопухолевая эффективность Ad6 в отношении глиобластомы U87MG, подкожно трансплантированной иммунодефицитным мышам, также схожа с таковой для Ad5 и, соответственно, Ad6 является перспективным серотипом для создания на его основе противоопухолевых препаратов для лечение злокачественных глиом.

В Разделе 3.2 подробно описано конструирование рекомбинантного аденовируса Ad6/3-hT-GM, включая последовательное получение всех промежуточных плазмидных конструкций, в том числе полногеномной плазмиды pAd6-hTERT-GMCSF, а также «оживление» вируса в клетках Ad293. Структуры всех полученных плазмид подтверждали рестрикционным анализом и секвенированием участков встройки. В результате с использованием плазмиды pAd6-hTERT-GMCSF получен рекомбинантный вирус Ad6-hT-GM, в геноме которого в район 360-559 п.н. встроена последовательность промотора теломеразы человека, а в район 28566-29269 п.н. - последовательность гена человеческого ГМ-КСФ. Конструирование рекомбинантного аденовируса, основываясь только на рекомбинации *in vitro*, без использования методов рекомбинации *in vivo*, проведено автором работы впервые.

Раздел 3.3. посвящен изучению свойств рекомбинантного вируса Ad6-hT-GM. Установлено, что репликативная активность рекомбинанта зависит от уровня активности промотора гена hTERT в клетках, вирус активно реплицируется в опухолевых клетках, в то время как его репликация в здоровых клетках заметно снижена. Показано, что экспрессия трансгена ГМ-КСФ зависит от активности нативного промотора E3 и не нарушает экспрессию гена ADP, играющего важную роль в лизисе клеток, что говорит в пользу сохранения литической активности Ad6-hT-GM в отношении опухолевых клеток. Рекомбинантный вирус производит биологически активный ГМ-КСФ в инфицированных клетках.

Изучение цитотоксической активности Ad6-hT-GM и природных вариантов Ad5 и Ad6 на панели опухолевых клеток человека показало схожие результаты для всех трех вирусов. При сравнении цитотоксической активности Ad6-hT-GM и Ad6 на панели здоровых клеток человека и опухолевых клеток с низким уровнем экспрессии гена hTERT показана сниженная цитотоксичность Ad6-hT-GM, что указывает на повышение опухолевой специфичности рекомбинанта при встройке промотора теломеразы человека в геном вируса.

Показано, что при внутриопухолевом введении вирусных препаратов мышам-опухоленосителям Ad6 и Ad6-hT-GM распределяются по всем органам и тканям, но при этом количество вирусной ДНК в опухоли на 2 – 3 порядка выше, чем в других исследуемых органах.

При исследовании противоопухолевой эффективности Ad6 и Ad6-hT-GM на животных моделях опухолей человека (аденокарцинома молочной железы и глиобластома) установлено, что при внутриопухолевых инъекциях оба вируса приводят к уменьшению объемов опухолей и увеличению выживаемости мышей-опухоленосителей по сравнению с контрольной группой.

В Заключение к диссертации автор указывает, что на основании полученных в работе результатов можно утверждать, что активность Ad6 в отношении опухолевых клеток человека

in vitro, а также ксенографтов глиобластомы человека, не уступает активности Ad5, и Ad6 является перспективной основой для конструирования онколитических рекомбинантов.

В рамках диссертационной работы предложен новый способ конструирования рекомбинантных Ad6, основанный на рекомбинации *in vitro*, и получен рекомбинантный аденовирус, содержащий встройки опухолеспецифического промотора гена теломеразы человека hTERT и гена человеческого ГМ-КСФ.

Полученный в работе рекомбинантный штамм Ad6-hT-GM, как и природный вирус, поражает опухолевые клетки, но при этом обладает сниженной цитотоксичностью в отношении здоровых клеток, а также опухолевых клеток с низкой активностью теломеразы. Ad6-hT-GM тормозит рост подкожных ксенографтов опухолей человека (аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 и глиобластомы U87MG) и увеличивает выживаемость мышей-опухоленосителей.

Выводы диссертации обоснованы и отражают полученные в работе результаты, которые, в свою очередь, отражены в 3х публикациях в зарубежных журналах и патенте. Автореферат соответствует содержанию диссертационной работы и отражает все основные результаты исследования.

В целом диссертационная работа выполнена на высоком методическом и научном уровне. В диссертации и автореферате имеются некоторые неточности орфографического и технического характера, которые в целом не портят общего впечатления о работе и не влияют на окончательную оценку.

Замечания и вопросы для дискуссии:

1. Рисунок 12 диссертации (рис. 2 автореферата)

Согласно данным рисунка при исследовании противоопухолевой эффективности Ad5 и Ad6 на мышцах с **большими** опухолями, в эксперимент включали животных с объемами опухолей гораздо меньшими заявленных в тексте 400 мм³, что может повлиять на результат исследования, поскольку динамика роста опухолей малого и большого объема значительно различается.

2. В Автореферате весьма кратко описано конструирование и получение рекомбинантного вируса, в то время как эта часть работы является очень существенной в плане научной значимости и новизны.

3. Рисунок 24 диссертации (рис.4 автореферата), Рисунок 28 диссертации (рис. 5 автореферата)

Поясните, пожалуйста, из каких соображений выбирали множественность инфицирования клеток (MOI) в этих экспериментах? Для разных линий клеток MOI отличается на порядки.

4. **Рисунок 29А и Б диссертации (рис. 8 А и Б автореферата)** В подписи к рисунку дни введения препаратов обозначены как 0, 2 и 4, при этом, на рисунке - 1, 3, 5.

5. **Рисунок 29Е диссертации (рис. 8Е автореферата)** Согласно данным рисунка достоверность отличий между группами Контроль - Ad6 больше, чем между группами Контроль - Ad6-hT-GM, на рисунке видимо опечатка, поскольку указано обратное.

Заключение

Диссертационная работа Осипова Ивана Дмитриевича на тему «Онколитические свойства теломераз-специфичного аденовируса серотипа 6, усиленного геном человеческого ГМ-КСФ», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология, по своей актуальности, новизне, уровню

проведенных исследований и практической значимости полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о порядке присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (с изменениями в ред. Постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016; № 1024 от 28.08.2017; № 1168 от 01.10.2018; № 426 от 20.03.2021; № 1786 от 26.10.2023; № 62 от 25.01.2024), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Осипов Иван Дмитриевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник лаборатории
биотехнологии ФГБУ Институт химической
биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии
наук (ФГБУН ИХБФМ СО РАН), кандидат
биологических наук (03.00.04 – биохимия)

Кулигина Елена Владимировна



630090, г. Новосибирск,
Пр.Ак. Лаврентьева, 8
Тел. 8 (383) 363-51-90

Подпись к.б.н. Кулигиной Е.В. заверяю

Ученый секретарь ФГБУН ИХБФМ СО РАН

к.б.н.

Тел: 8 (383) 363-51-55

e-mail: secretary@lbio.ru

дата отзыва: 05 сентября 2025 г.

Порощенко Евгения Борисовна

