

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Федеральный
исследовательский центр фундаментальной
и трансляционной медицины»
(ФИЦ ФТМ)**

ул. Тимакова 2, а/я 71 г. Новосибирск, 630060
Тел: (383) 274-95-80, факс (383) 335-97-74

E-mail: director@frcftm.ru

<http://www.frcftm.ru>

ИНН 5408157430 КПП 540801001

ОКПО 49738378 ОГРН 1025403653538

от 09.09.2025 № 01-06/780

на вх № _____ от _____

Утверждаю

Директор ФИЦ ФТМ

академик РАН, д.м.н.,



М.И. Воевода

2025г

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о научно-практической значимости диссертации Осипова Ивана Дмитриевича на тему «Онколитические свойства теломераза-специфичного аденовируса серотипа 6, усиленного геном человеческого ГМ-КСФ», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология в диссертационный совет 64.1.001.01 при ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Актуальности темы диссертационного исследования

Противоопухолевая терапия онколитическими вирусами приобретает всё большее значение как перспективный метод борьбы с онкологическими заболеваниями: активно разрабатываются новые методы и подходы комбинированного лечения, среди которых использование онколитических вирусов и векторов доставки. В виду разнообразия онколитических агентов разных семейств вирусов регулярно ведется поиск новых онколитических агентов и усовершенствование уже имеющихся рекомбинантных вирусов. Аденовирусные векторы, как онколитические вирусы, так и векторы доставки генов, являются одними из самых ранних одобренных, изученных и коммерциализированных векторов для генной терапии. До сих пор на аденовирусы приходится значительная доля клинических испытаний в исследованиях генной терапии. К существенным недостаткам аденовирусных векторов можно отнести высокую токсичность, кратковременную экспрессию генов и высокую серопревалентность.

Несмотря на то, что в последнее время увеличилось число исследований, использующих лентивирусы и аденоассоциированные вирусы в качестве объектов вирусной терапии, аденовирусы всё ещё обладают рядом преимуществ. В них легко вносить генетические модификации с помощью стандартных молекулярных методов, вирус хорошо нарабатывается *in vitro* до высоких титров. Аденовирусные векторы, используемые в исследованиях генной терапии, включая исследования в области виро-терапии, в подавляющем большинстве основаны на аденовирусе серотипа 5 (Ad5). Среди множества

известных серотипов аденовирусов вполне возможно открытие нового аденовирусного вектора, пригодного для клинического применения у человека.

В этой связи актуальной проблемой остается выбор аденовируса, обладающего низкой серопревалентностью, на основе которого можно получить рекомбинантный вирус с введенными генами, способствующими онколизису или стимулирующими иммунную систему. Исследования серотипов аденовирусов отличных от пятого демонстрируют интерес к аденовирусу серотипа 6 для построения на его основе эффективного противоопухолевого онколитического рекомбинантного агента.

Диссертационная работа Осипова И.Д. посвящена изучению онколитических свойства Ad6 в сравнении с диким типом Ad5 на опухолевых клеточных линиях и моделях опухолевого онкогенеза *in vivo*, и разработке нового эффективного способа получения рекомбинантного аденовируса на основе Ad6 с последующей оценкой активности трансгенного ГМ-КСФ, опухолевой селективности и противоопухолевой активности полученного варианта рекомбинантного вируса. Таким образом, цель диссертационной работы Осипова Д.И. – создание рекомбинантного условно-реплицирующегося варианта аденовируса серотипа 6, содержащего встройки промотора гена теломеразы человека hTERT и гена ГМ-КСФ, и оценка его противоопухолевой активности.

Принимая во внимание, что автор предлагает новый способ получения рекомбинантного вируса на основе Ad6, тема исследования рецензируемой работы является актуальной и своевременной и имеет важное значение для дальнейшего развития виротерапевтических разработок, а также может дополнить методы получения рекомбинантных векторных систем на основе аденовируса.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Основные положения рассматриваемой диссертации, выносимые на защиту, содержат новые данные, полученные с помощью методов классической вирусологии, клеточной биологии и методов молекулярной биологии.

В процессе работы автору удалось изучить особенности противоопухолевого эффекта диких вариантов аденовирусов, выявить противоопухолевый потенциал аденовируса серотипа 6. В качестве формы рака для проверки эффективности была выбрана глиобластома – наиболее агрессивная форма рака головного мозга с крайне неблагоприятным прогнозом для пациентов и частыми случаями рецидива. В работе впервые удалось установить противоопухолевую эффективность Ad6 в отношении клеточных линий глиобластомы человека U87MG и U251MG *in vitro* и *in vivo*. Дозозависимая цитотоксичность аденовирусов серотипа 5 и 6 в отношении исследуемых линий схожа и показывает хороший процент снижения жизнеспособности клеток на третьи сутки после инфицирования. В эксперименте по внутриопухолевому введению вируса на подкожно трансплантируемой глиоме U87MG мышам линии SCID противоопухолевый эффект двух серотипов аденовирусов между группами также достоверно не отличается.

После обоснования дальнейшего исследования аденовируса серотипа 6, который как минимум обладает схожей с аденовирусом серотипа 5 противоопухолевой эффективностью в отношении клеток глиобластомы, автором предложен новый способ получения рекомбинантного Ad6 на основе метода рекомбинации *in vitro* и описанным способом впервые получен рекомбинантный вирус Ad6-hT-GM, экспрессирующий ген человеческого

ГМ-КСФ. В экспериментах по изучению противоопухолевых вирусных векторов ГМ-КСФ оказался наиболее мощным из ряда цитокинов, молекул адгезии и других иммуностимулирующих молекул для индукции специфического и длительного противоопухолевого иммунитета, что обуславливает выбор встройки гена ГМ-КСФ.

Успех конструирования рекомбинантного аденовируса подтвержден оценкой репликативной активности в различных клеточных линиях человека, экспрессии генов и уровня биологической активности ГМ-КСФ, проверенного на клетках TF-1.

Сравнительная оценка противоопухолевой эффективности рекомбинантного аденовируса на панели опухолевых клеточных линий человека демонстрирует избирательность вируса для реализации своего противоопухолевого потенциала в отношении конкретных опухолевых линий или различную чувствительность линий разного генеза и этиологии к действию рекомбинантного вируса. Результаты по оценке цитотоксической активности являются предметом дальнейшего более детального исследования противоопухолевой активности полученного варианта аденовируса серотипа 6.

Автор указал на безопасность полученного рекомбинантного вируса для здоровых клеток человека за счет опухолевой селективности.

Дана характеристика биораспределения вируса при внутриопухолевом введении вирусных инъекций.

Таким образом, автор представил новые сведения о противоопухолевой эффективности нового полученного аденовируса на панели опухолевых клеточных культур и о безопасности вирусного вектора и безопасности для нормальных клеток человека.

Научная новизна исследования подтверждается и полученным автором патентом РФ на изобретение «Рекомбинантный штамм Ad6-hTERT-GMCSF, содержащий вставку промотора теломеразы человека hTERT, а также гена гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека, обладающий избирательной цитолитической активностью против теломераз-положительных опухолевых клеток и экспрессирующий активный человеческий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор» (№2020134158).

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Диссертация выполнена на высоком научно-методическом уровне с применением вирусологических, молекулярно-генетических и статистических методов анализа. Статистическая обработка результатов проведена

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

В ходе выполнения диссертационной работы впервые получены данные о противоопухолевой активности Ad6 в отношении клеток человеческой глиобластомы на моделях *in vitro* и *in vivo*. Автором показано, что Ad6 можно рассматривать в качестве альтернативной основы для создания рекомбинантного противоопухолевого агента, так как Ad6 не уступает в онколитической эффективности Ad5.

Также автором разработан новый способ получения рекомбинантного аденовируса 6 для эффективных и успешных модификаций. На основе этого способа получен впервые рекомбинантный штамм Ad6-hT-GM, селективный в отношении hTERT-позитивных клеток и с экспрессией активного ГМ-КСФ.

Таким образом, в результате выполнения диссертационного исследования была разработана новая методика получения рекомбинантного вируса и на ее основе получен жизнеспособный противоопухолевый и безопасный для нормальных клеток в первых тестах рекомбинантный Ad6.

Практическая значимость работы подтверждена получением патента на изобретение 2753742 C1, 24.08.2021 (заявка №2020134158 от 16.10.2020).

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

Диссертационная работа Осипова И.Д. является завершенной научно-квалификационной работой и посвящена созданию рекомбинантного варианта аденовируса серотипа 6, содержащего встройки промотора гена hTERT и ген ГМ-КСФ, и оценке его онколитических свойств.

Апробация результатов достаточная. Результаты диссертационной работы были опубликованы автором в трех печатных работах в высокорейтинговых англоязычных журналах, в том числе в качестве первого автора, а также материалах российских и зарубежных конференций. Опубликованные данные полностью соответствуют представленным в диссертационной работе результатам. Кроме того у автора есть патент, отражающий результаты проделанной автором работы. Личный вклад автора прослеживается в экспериментальной и аналитической части работ над диссертацией.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Научные положения, полученные результаты, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертационной работе Осипова И.Д., могут быть использованы для дальнейшей оптимизации конструирования рекомбинантных аденовирусов для поиска новых вариантов противоопухолевых препаратов. Применение новых рекомбинантных вирусов, направленных в том числе на противоопухолевую борьбу с агрессивными формами опухолей, таких как глиобластомы, может служить весомым вкладом в развитие противоопухолевых исследований, протоколов и расширения вариантов онколитических агентов для достижения оптимальных и эффективных результатов в онкотерапии.

Общая характеристика содержания диссертационной работы

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, трех подглав результатов собственных исследований с обсуждениями, заключения, выводов, списка литературы, включающего 241 англоязычный источник, и приложения. Работа изложена на 153 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 30 рисунками и 4 таблицами.

В введении изложена актуальность проблемы, указана цель и задачи исследования, научная новизна и основные положения, выносимые на защиту. Диссертант вынес на защиту четыре основных положения, которые обстоятельно обоснованы в тексте работы.

Работа представляет цельное многогранное исследование, с четкой логической структурой. Обзор литературы содержит анализ научных публикаций с 1949 года по 2025 год и демонстрирует осведомленность автора в исследуемой проблеме. В литературном

обзоре Осипов И.Д. подробно изложил специфику структуры аденовируса, морфологию и особенности репродукции вируса в зависимости от серотипа, способа попадания в организм и клетки и тропизма. Также подробно описаны варианты противоопухолевых препаратов на основе аденовирусов, стадии их разработки, клинических испытаний и внедрения в клиническую практику. Литературный обзор достаточно иллюстрирован схемами и рисунками. Обзор литературы написан со ссылками на современные источники, в том числе и текущего года.

Глава «Материалы и методы» содержит обширный перечень использованных автором экспериментальных и аналитических методов исследования, включая статистический анализ.

Многообразие использованных Иваном Дмитриевичем методов характеризует его как крайне квалифицированного научного сотрудника, а выполненную им научную работу — как объемное, логичное и многогранное исследование, выполненное на высоком методическом уровне с использованием современных методов и подходов.

Для решения поставленных задач автор использовал в своей работе актуальные методы генной инженерии. В настоящее время основой для создания онколитических вирусов является аденовирус типа 5 (Ad5). Однако популяционный иммунитет к Ad5 существенно ограничивает эффективность таких препаратов. Кроме того, для Ad5 характерна выраженная гепатотоксичность. В этом контексте Ad6 (аденовирус типа 6) является перспективной альтернативой: он схож с Ad5 по биологическим свойствам, но распространённость антител к нему в популяции значительно ниже. В ряде публикаций последних лет подчёркивается целесообразность создания онколитических вирусов на основе Ad6, однако до сих пор методы его конструирования были слабо разработаны. Представленная Иваном Дмитриевичем работа восполняет этот пробел. Модификации Ad6, внесенные автором, обеспечили опухолевую селективность, а также экспрессию иммуностимулирующего цитокина, что было подтверждено экспериментально.

Автор разработал и успешно применил метод сборки полногеномной плазмиды pAd6-hTERT-GMCSF *in vitro* с использованием In-Fusion HD Cloning Kit, что позволило избежать нестабильности, связанной с RecA-зависимой рекомбинацией в *E. coli*. Кроме того, Ивану Дмитриевичу удалось добиться крайне высокой эффективности этого подхода, показав, что метод позволяет эффективно работать с фрагментами ДНК размером >27 т.п.н., что существенно превышает заявленные производителем ограничения (до 15 т.п.н.). Отдельно стоит отметить, что при «оживлении» вируса с использованием культуры клеток Ad293 автор учел риск рекомбинации, в результате которой может быть потерян E1 с промотором гена hTERT. Чтобы избежать этого автор использовал клонирование в культуре клеток A549 с последующим секвенированием методом Сэнгера для проверки наличия модификации.

Несомненным достоинством работы является комплексный набор методов верификации (рестрикционный анализ, секвенирование, количественная ПЦР, ОТ-ПЦР, ИФА), что обеспечивает достоверность полученных данных.

Результаты исследований представлены логично и проиллюстрированы рисунками и таблицами. Работу можно условно разделить на несколько частей. Первая часть посвящена обоснованию целесообразности использования аденовируса Ad6 в качестве основы для разработки рекомбинантного штамма и конструирования рекомбинантного вируса Ad6-hT-GM разработанным способом, основанным на сборке *in vitro*. Автор демонстрирует на примере инфицирования клеток глиобластомы, что онколитическая активность Ad6 не

уступает таковой Ad5. Поэтому на основе аденовируса серотипа 6 автор предлагает новый рекомбинантный штамм Ad6-hT-GM со встройками промотора теломеразы человека и гена человеческого ГМ-КСФ. Вторая часть посвящена оценке жизнеспособности полученного рекомбинантного вируса и биологической активности ГМ-КСФ. Далее автор переходит к проверке и демонстрации противоопухолевого потенциала *in vitro* и *in vivo* и безопасности полученного вируса для нормальных клеток человека.

Обсуждая результаты, автор оценивает полученные в работе данные с имеющимися литературными данными.

В завершении работы автор приводит пять выводов, подтвержденных полученными результатами.

Аннотация диссертации отражает ее основные положения.

Замечания

Принципиальных замечаний по структуре и оформлению диссертации нет.

Из недочетов работы:

1) в тексте главы «Обзор литературы» следует отметить единично встречаемые грамматические и орфографические ошибки;

2) в описании используемых вирусов в «Материалах и методах» стоило указать, на каких конкретно аденовирусах серотипов 5 и 6 проводится работа - название штамма, депонированы ли предоставленные вирусы (в таком случае указывается номер и место депонирования, номер GenBank) (стр. 50);

3) несколько путанно описаны значения дозы вирусных инъекций Ad5 и Ad6, вводимые мышам с привитыми опухолевыми ксенографтами U87MG (стр. 51). Имеет место некорректное обозначение единиц. Изначально речь идет о дозе из расчета на 1 мл – 10^9 ТЦПД50/мл, но далее описывается, как разводили вирус до концентрации 5×10^{10} ТЦПД50/мл и брали для однократной внутриопухолевой инъекции 20 мкл на мышь, то есть конечную дозу нужно указывать 10^9 ТЦПД50 на 20 мкл, а не на 1 мл (10^9 ТЦПД50/0,02мл), или же с учетом трехкратного введения - 3×10^9 ТЦПД50/60 мкл на мышь. Аналогично для доз в эксперименте для изучения противоопухолевой активности Ad5 и Ad6 на опухолях большого размера;

4) было бы удобнее использовать единые единицы измерения вирусных доз – для разных экспериментальных работ. Если для клеточных работ понятен выбор единиц МОИ, то в работах с опухолями *in vivo* фигурируют и ТЦПД50 и количество вирусных частиц (вч/мл). Также в тексте встречается не совсем корректное использование термина множественности инфицирования МОИ (стр. 55 и 57) – «...инфицировали очищенными вирусами ... с МОИ равной 100 ТЦПД50 на клетку», «... с МОИ равной 100 ТЦПД50...». В научной литературе принято всё же, что МОИ и ТЦПД50 это разные единицы измерения вирусного титра;

5) уместно было бы пояснить, чем обусловлены временные рамки для экспериментальных работ с животными. Если эксперимент до момента выведения животных ограничен биоэтическими нормами, связанными с достижением опухоли определенных пограничных размеров, то их нужно указать или указать ссылку на документ;

6) термин «грубый вирусный лизат» несколько спорный;

7) в материалах и методах и далее по тексту диссертации не указано количество животных, участвующих в экспериментах *in vivo*;

8) в главе «Результаты» при описании Рисунка 10 (стр. 64) в легенде есть буквенные обозначения гистограмм А и Б для разных опухолевых линий, но на самом рисунке буквенные обозначения не проставлены;

9) допущена опечатка в ссылке на Приложение с результатами анализа реакции Сэнгера (стр. 70) – вместо приложения 3,4 нужна ссылка на приложение 2,3;

Примечание, не являющееся ошибкой автора, – классификация семейства *Adenoviridae* претерпела изменения, один из шести родов сменил название (*Atadenovirus* стал именоваться *Barthadenovirus*). Публикация данного изменения в открытом доступе произошла несколько недель назад и, вероятно, уже вскоре после завершения оформления диссертационной работы.

Перечисленные замечания не снижают научной и практической ценности диссертационной работы, а касаются оформительских моментов и не влияют на общую положительную оценку полученных результатов.

В ходе анализа работы возникли следующие **вопросы, вынесенные для обсуждения:**

1. в качестве дискуссионного вопроса в «3.3.4 Цитотоксическая активность...» логично возникает вопрос о трактовке природы различия чувствительности опухолевых клеток разного генеза при проверке цитотоксичности к аденовирусам. Также к вопросу о чувствительности клеток к противоопухолевому цитотоксическому действию встает вопрос – был ли исследован опухолевый материал, полученный в экспериментах *in vivo*. Решение этих вопросов может являться предметом дальнейших исследований по теме диссертации;

2. из каких соображений проводился выбор тестируемых клеточных линий для определения цитотоксического эффекта вируса? По каким критериям были выбраны опухолевые линии? По результатам оценки онколитических свойств диких аденовирусов 5 и 6 серотипов, а также по экспериментальным работам *in vivo* на подкожных опухолях U87MG складывается впечатление, что вирус планируется рассматривать как потенциальный противоопухолевый агент для терапии опухолей головы, глиобластом. Однако далее в проверке противоопухолевого цитотоксического потенциала появляется панель клеточных линий. Более выраженный цитотоксический эффект при этом прослеживается на линии немелкоклеточного рака легкого A549 и гепатоцеллюлярной карциноме HepG2. Тем не менее для проверки онколитического эффекта *in vivo* опухолевые модели этих линий не рассматривались. Также напрашивается необходимость заключить вывод о перспективе использования рекомбинантного аденовируса на конкретных типах опухолей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

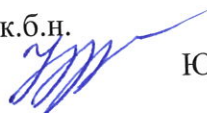
Диссертационная работа Осипова Ивана Дмитриевича на тему «Онколитические свойства теломераза-специфичного аденовируса серотипа 6, усиленного геном человеческого ГМ-КСФ», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология, представляет собой самостоятельно выполненную, логически структурированную и законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение актуальной научно-практической задачи по поиску новых противоопухолевых онколитических препаратов на основе рекомбинантного аденовируса, что имеет существенное значение в области молекулярной биологии, вирусологии и онкотерапии.

Актуальность темы, объем и уровень выполненных работ в рамках исследований, методический уровень, научная новизна и практическая значимость полученных результатов диссертационной работы полностью отвечают требованиям п. 9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Осипов Иван Дмитриевич, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Отзыв обсужден и одобрен на расширенном заседании научного семинара Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, с участием специалистов из лаборатории экспериментальной онкологии и испытания фармакологических средств ФИЦ ФТМ, а также лаборатории геномики и эволюции вирусов ФИЦ ФТМ, протокол № 15 от «02» сентября 2025 года.

Отзыв подготовили:

Заведующая лабораторией экспериментальной онкологии и испытания фармакологических средств ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», к.б.н.



Юрченко Ксения Сергеевна

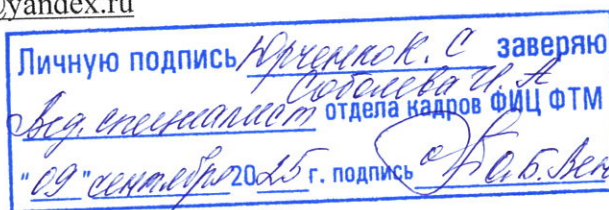
Новосибирск, 630060, ул. Тимакова, д.2
e-mail: xenia7yurchenko@gmail.com

Заведующий лаборатории геномики и эволюции вирусов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» к.б.н.



Соболев Иван Андреевич

Новосибирск, 630060, ул. Тимакова, д.2
e-mail: sobolev.riov@yandex.ru



Сведения о ведущей организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Сибирского Отделения Российской Академии Наук

630060, г. Новосибирск, улица Тимакова, 2

тел.: +7 (800)222-60-86, адрес официального сайта: frcftm.ru, email: 2749494@frcftm.ru