

ОТЗЫВ

официального оппонента

академика РАН, доктора биологических наук, профессора, заведующего
Лабораторией бионанотехнологии, микробиологии и вирусологии
Федерального государственного автономного образовательного учреждения
высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет» Нетёсова Сергея Викторовича
. на диссертационную работу Васильевой Натальи Сергеевны на тему
**«Разработка подходов к терапии глиом с помощью онколитического
вируса VV-GMCSF-Lact»,**
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

Актуальность темы диссертационного исследования

Диссертационная работа Н.С.Васильевой посвящена проработке подходов к терапии крайне труднолечимых опухолей типа глиом с помощью рекомбинантного вируса осповакцины, экспрессирующего ген человеческого гранулоцит-макрофагального колониестимулирующего фактора и ген человеческого белка лактапина. Полученные результаты открывают дорогу к проведению 1 фазы клинических испытаний по лечению данного типа онкозаболеваний разработанным препаратом.

В качестве преамбулы стоит отметить, что онколитические вирусы в последнее десятилетие начинают вполне обоснованно входить в арсенал методов лечения онкозаболеваний наряду с хирургическими, химиотерапевтическими, радиологическими и иммунологическими методами. Их отличительным свойством является способность избирательно поражать раковые клетки как путем направленного апоптоза, так и за счет стимуляции иммунитета организма-хозяина, направленного на неоантигены. Изучаемый препарат содержит четыре основных отличия по сравнению с исходным штаммом вируса осповакцины, а именно:

1. Аттенуирующую делецию вирусного гена тимидин-киназы;
2. Аттенуирующую делецию гена вирусного фактора роста;
3. Вставку гена иммуностимулирующего человеческого белка ГМ-КСФ;
4. Вставку гена белка, вызывающего апоптоз – лактапина.

Ранее данный вирусный препарат был изучен в рамках доклинических исследований для вероятного применения при лечении рака молочной железы в том числе с трижды негативным фенотипом. И в 2023 году были

начаты клинические испытания I фазы в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова в Санкт-Петербурге по лечению данного типа рака.

Научная новизна

Автором было проведено большое и системно построенное исследование, подавляющая часть результатов которого была получена впервые. Здесь приведены наиболее новые из них, по мнению оппонента:

1. В частности, впервые продемонстрирована способность штамма VV-GMCSF-Lact проникать через гематоэнцефалический барьер. При этом доказано, что VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью *in vitro* (на культурах клеток глиом) и противоопухолевой эффективностью *in vivo* в отношении клеток глиом человека и животных.
2. Автором проведена оценка комбинированного действия VV-GMCSF-Lact и химиотерапевтических препаратов, используемых при терапии злокачественных опухолей головного мозга. На этой основе впервые предложен новый многообещающий подход к терапии глиом в виде сочетанного применения VV-GMCSF-Lact и темозоломида, а также схема применения этих препаратов для дальнейших доклинических и клинических исследований.
3. Автором также была выявлена проявляющаяся иногда устойчивость клеток глиом к онколитическим вирусам и предложен возможный механизм этой устойчивости к действию VV-GMCSF-Lact. В том числе впервые показано, что в клетках глиом, более устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact, снижается уровень белка p53 и повышается уровень белков-ингибиторов апоптоза: активированной киназы Akt1 и белка XIAP.

На основе полученных результатов автор сделал вывод о том, что рекомбинантный онколитический вирус VV-GMCSF-Lact является перспективным кандидатным препаратом для терапии глиом человека.

Структура и объем диссертации. Диссертация имеет традиционную структуру: список сокращений, введение, обзор литературы, экспериментальная часть (материалы, методы и оборудование), результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы, который включает 373 источника. Работа изложена на 192 страницах, содержит 45 рисунков, 9 таблиц и 3 приложения.

Введение посвящено обоснованию актуальности проблемы лечения глиом, дана краткая характеристика этого типа опухолей и проблем с их

лечением. В этом разделе кратко обозначены проблемы, которые далее разбираются в работе, поставлены цели и определены задачи. Также приведены главные характеристики работы, конкретизированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, приведены ссылки на публикации и апробации результатов, а также указан личный вклад автора в результаты исследования.

В **Обзоре литературы**, который называется «Глиома: Особенности опухоли и виротерапия как перспективный терапевтический подход (Обзор литературы)» представлен весьма обширный материал по этому типу онкозаболеваний. В частности, в нем описаны гетерогенность и идентификаторы молекулярных подтипов глиом, внутриопухолевая гетерогенность. Далее описаны типы лечения глиом: хирургическая резекция; радиотерапия; химиотерапия; иммунотерапия; перечислены ингибиторы контрольных точек иммунитета. Затем представлены краткие описания разработанных кандидатных противоопухолевых вакцин и более подробные результаты разработок и опытных применений онколитических вирусов в терапии глиом на примере рекомбинантов на основе вируса простого герпеса I типа, аденовирусов, парвовирусов, разных штаммов вируса болезни Ньюкасла и вируса осповакцины. Приведены также и пока что первые результаты использования виротерапии глиом в России, в том числе в виде комбинаций виротерапии и других терапевтических подходов. Описаны неудачи в лечении этих типов опухолей, связанные с их нередкой резистентностью к радиотерапии, химиотерапии, иммунотерапии и даже к виротерапии, а также приведен возможный механизм этой устойчивости. Обзор написан весьма последовательно, фундаментально, логично, содержит самую новую информацию и заслуживает отдельной публикации.

В разделе **Экспериментальная часть** подробно описаны все использованные материалы, реагенты и наборы для определения ряда необходимых маркеров. Приведены последовательности всех использованных олигонуклеотидов для ОТ-ПЦР и ПЦР в режиме реального времени, описаны использованные штаммы вирусов, виды животных, типы культур клеток, составы буферных растворов. В отношении использованных методов и методик стоит отметить, что они описаны предельно детально, особенно следующие: получение культур клеток глиом из образцов опухолей пациентов, культивирование клеток иммортализованных линий глиом человека и глиомы С6 крысы, культивирование клеток глиом человека в адгерентных условиях и в условиях формирования нейросфер, применение проточной цитометрии,

детекции целевых белков, измерения уровня экспрессии генов SOX-2 и MYC в клетках культур глиом человека, оценки цитотоксической активности VV-GMCSF-Lact в отношении клеток глиом человека и крысы, изучения цитотоксической активности химиопрепаратов в отношении клеток глиом человека, оценки биораспределения VV-GMCSF-Lact в организме мышей линии SCID, исследования противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении глиом человека *in vivo*, изучения противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении глиомы C6 *in vivo*, оценки апоптотических процессов в клетках глиом под действием ортопоксвирусного штамма VV-GMCSF-Lact. Особого упоминания заслуживает подробное описание применения использованных методов статистической обработки полученных результатов., что далеко не всегда приведено в диссертационных работах.

В главе **Результаты и Обсуждение** представлено подробное изложение результатов с их грамотной статистической обработкой. Наиболее важными с точки зрения оппонента являются следующие результаты :

1. Получение и характеристика панели культур клеток глиом человека из образцов опухолей различной степени злокачественности. Также демонстрация того факта, что уровень наиболее важных маркеров стволовых опухолевых клеток (CD133, CD44, CD15, CD171, SOX-2, c-Мус) и маркеров EGFR и PDGFRA в клетках полученных автором культур и immortalized линий глиом человека не коррелирует со степенью злокачественности первичной опухоли;
2. Продemonстрирована высокая цитотоксическая активность онколитического вируса VV-GMCSF-Lact в отношении клеток immortalized линий глиобластомы и полученных из образцов опухолей пациентов культур глиом.
3. Показано, что при внутривенном введении как здоровым животным, так и животным с ортотопически трансплантированными опухолями, VV-GMCSF-Lact распределяется по всем органам и тканям, включая мозг, и селективно реплицируется в опухолевой ткани;
4. При внутриопухолевом введении VV-GMCSF-Lact крысам с ортотопически трансплантированной глиомой C6 предотвращает развитие метастазов. При внутривенном введении вирусного препарата происходит достоверное уменьшение объемов опухолей (ТРО=60%);
5. При введении онколитического вируса VV-GMCSF-Lact, как в режиме монотерапии, так и в комбинации с темозоломидом (ТРО = 93 – 96%), показано, что он обладает большей противоопухолевой эффективностью, чем темозоломид (ТРО= 33%,) на мышинной модели

подкожных ксенографтов глиобластомы человека. Применение комбинации VV-GMCSF-Lact и темозоломида является перспективным подходом к терапии глиом. аВтором рредложена терапевтическая схема совместного применения препаратов;

6. Автором показано, что в клетках глиом, более устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact, снижается уровень белка p53 и повышается уровень белков-ингибиторов апоптоза: активированной киназы Akt1 и белка XIAP, которые могут являться потенциальными мишенями таргетной терапии в комбинации с VV-GMCSF-Lact.

7. Предложен наиболее вероятный механизм, определяющий чувствительность или устойчивость клеток глиом человека к действию онколитического вируса VV-GMCSF-Lact, основанный на взаимодействии клеточных белков - участников процессов апоптоза и некроптоза, и вирусных белков, способных влиять на отдельные фрагменты сигнальных путей клеточной гибели.

В Заключение диссертационной работы подведены итоги проведенных исследований, в которых обоснована перспективность рекомбинантного штамма вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact для клинических испытаний в качестве средства терапии глиом. При этом несомненно необходимы проведение сначала полного цикла доклинических испытаний, дальнейшее исследование механизмов, обуславливающих эффективность виротерапии опухолей головного мозга с помощью VV-GMCSF-Lact и уже после этого организация клинических испытаний данного препарата как в качестве монотерапии, так и в виде сочетанных с другими препаратами схем лечения этого актуального типа онкозаболеваний.

По теме диссертации опубликовано 4 научные работы, все они - статьи в рецензируемых российских и зарубежных журналах уровня не менее Q4 и из перечня ВАК.

Несмотря на почти четыре года пандемии, большинство результатов работы были представлены на ряде конференций: международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2019), FEBS Virtual Congress (онлайн участие, 2021), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Цивьяновские чтения» (Новосибирск, Россия, 2021), Всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, Россия, 2022).

Перечень опубликованных работ в том виде, как он указан в автореферате, выглядит весомо:

1. Vasileva N., Ageenko A., Dmitrieva M., Nushtaeva A., Mishinov S., Kochneva G., Richter V., Kuligina E. Double Recombinant Vaccinia Virus: A Candidate Drug against Human Glioblastoma // *Life*. – 2021. – V. 11(10). – P. 1084. doi: 10.3390/life11101084
2. Васильева Н.С., Агеенко А.Б., Рихтер В.А., Кулигина Е.В. Сигнальные пути, определяющие эффективность терапии глиобластомы вирусом осповакцины // *Acta Naturae*. – 2022. – Т. 14. – №2. – С. 62-70. doi: 10.32607/actanaturae.11623
3. Васильева Н. С., Агеенко А. Б., Чинак О. А. , Рихтер В. А., Кулигина Е. В. Роль ингибитора апоптоза XIAP в устойчивости клеток глиобластомы к действию рекомбинантного вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact // *Биотехнология*. – 2022. – Т. 38. – № 5. – С. 73-79. doi: 10.56304/S0234275822050155
4. Vasileva N., Ageenko A., Byvakina A., Sen'kova A., Kochneva G., Mishinov S., Richter V., Kuligina E. The Recombinant Oncolytic Virus VV-GMCSF-Lact and Chemotherapy Drugs against Human Glioma. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – V. 25(8):4244. – doi:10.3390/ijms25084244

Содержание диссертационной работы соответствует опубликованным результатам.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность результатов диссертационного исследования Н.С.Васильевой и обоснованность основных положений, выносимых на защиту, заключения и выводов обеспечивается как современным уровнем исходных знаний об онкозаболеваниях в целом и глиомах в частности, так и разумной и адекватной задачам логикой плана исследования, использованием современных методов, соответствующих поставленной цели и задачам, корректной статистической обработкой и интерпретацией полученных результатов.

Необходимо отметить личный вклад соискателя: подавляющее большинство результатов, представленных в работе, получены лично автором или при его непосредственном участии.

Таким образом, рассмотрение работы показывает, что диссертационная работа Васильевой Н.С. является самостоятельным законченным исследованием, посвященным изучению онколитических свойств онколитического вируса VV-GMCSF-Lact в отношении клеток глиом – как стандартных, так и полученных от реальных больных в России.

Полученные диссертантом новые экспериментальные данные также помогут в будущем ускорить проведение доклинических испытаний данного и других подобных онколитических вирусных препаратов, причем не только на основе вирусов осповакцины, но и других вирусов.

Практическая значимость выполненной работы очевидна уже на настоящем этапе, но она просматривается и в будущем в плане универсализации доклинических испытаний онколитических вирусов других семейств.

Замечания

Принципиальных недостатков в работе не выявлено. Но кое-какие недоработки имеют место:

1. К ним относится отсутствие подробного списка тезисов конференций, на которых докладывались результаты работы и статуса докладов.
2. Перепутаны названия конгрессов, в которых участвовал автор, что легко видеть при их проверке в Elibrary.
3. Во Введении на стр.8 имеется предложение «Лечение злокачественных глиом является достаточно сложным и дорогостоящим». Непонятно здесь как значение слова «достаточно», так и само значение этого предложения. Поскольку если человек будет вылечен, то почти любая цена оправдана, а если не будет вылечен, то какое же это лечение? – это пустая трата денег.
4. На стр. 10 диссертации приведена фраза «Впервые показана способность VV-GMCSF-Lact проникать через гематоэнцефалический барьер и установлено, что VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью *in vitro* и противоопухолевой эффективностью *in vivo* в отношении глиом человека и животных.» На самом деле в диссертационной работе показаны активность и эффективность в отношении КЛЕТОК глиом человека и животных, а не полных опухолей типа глиом.
5. Оппонент вынужден также отметить наличие ряда досадных опечаток, в том числе – в автореферате: во втором абзаце на стр.3. Но при этом количество опечаток в диссертации существенно меньше, чем во многих других диссертационных работах, ранее рецензированных оппонентом.

Основные положения автореферата всесторонне отражают материалы диссертационной работы. Опубликованные научные труды в основном представляют ее содержание. Научные положения, выносимые на защиту, достаточно полно отражены в опубликованных работах.

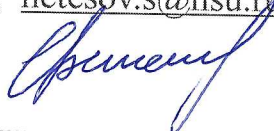
Заключение

Диссертационная работа Васильевой Натальи Сергеевны является законченным исследованием, выполненным автором самостоятельно, на высоком научном и методическом уровне. Основные результаты диссертационной работы были представлены на различных конференциях, и опубликованы в международных и отечественных высокорейтинговых журналах и рецензируемых российских журналах из списка ВАК. Заключение и выводы, сделанные по результатам работы, обоснованы и полностью соответствуют поставленным задачам. Автореферат полностью соответствует основному содержанию диссертации. Исходя из вышеизложенного, считаю, что диссертационная работа «Разработка подходов к терапии глиом с помощью онколитического вируса VV-GMCSF-Lact», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3 – молекулярная биология», полностью соответствует требованиям и критериям, установленным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертационная работа оформлена в соответствии с Приложениями № 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. а сама Васильева Наталья Сергеевна, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - молекулярная биология.

Заведующий лабораторией бионанотехнологии,
микробиологии и вирусологии Факультета естественных наук
Новосибирского государственного университета,
академик РАН, д.б.н., профессор

E-mail: svn15@hotmail.com; netesov.s@nsu.ru; тел. +7 (383) 363-42-03

 Сергей Викторович Нетёсов

Подлинность подписи С.В. Нетёсова заверяю:

Ученый секретарь НГУ, к.х.н.

«17» июня 2024 года

 А.А.Тарабан

630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ). Тел. (383) 363-43-33. <http://www.nsu.ru>.

