

На правах рукописи



ВАСИЛЬЕВА НАТАЛЬЯ СЕРГЕЕВНА

**РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ ТЕРАПИИ ГЛИОМ С ПОМОЩЬЮ  
ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА VV-GMCSF-Lact**

1.5.3 – молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

**Кулигина Елена Владимировна**, к.б.н.

Официальные оппоненты:

**Черноловская Елена Леонидовна**, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, главный научный сотрудник.

**Нетёсов Сергей Викторович**, д.б.н., профессор, академик РАН, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», заведующий лабораторией.

**Гуляева Людмила Федоровна**, д.б.н., профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», руководитель лаборатории.

Защита состоится «\_» \_\_\_\_\_ 2024 г. в 10:00  
на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01. при  
Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
по адресу: 630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте <http://www.niboch.nsc.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
к.х.н.

П.Е. Пестряков

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Стандартная терапия глиом включает максимальную хирургическую резекцию опухоли с последующей радио- и/или химиотерапией. Однако применяемая мультимодальная терапия не позволяет в достаточной степени повысить качество жизни пациентов с данным диагнозом. Таким образом, поиск и разработка более эффективных методов терапии злокачественных глиом является актуальной задачей современных биомедицинских исследований.

На сегодняшний день одним из наиболее перспективных и активно развивающихся терапевтических подходов является виротерапия, или терапия с помощью онколитических вирусов. Разработанный ранее в ИХБФМ СО РАН совместно с ГНЦ ВБ «Вектор» на основе штамма Л-ИВП вируса осповакцины, VV-GMCSF-Lact несет делеции фрагментов генов вирусных тимидинкиназы и ростового фактора, в районы которых встроены гены ГМ-КСФ и апоптоз индуцирующего белка лактапина, соответственно (. В настоящее время проходят клинические испытания 1ой фазы данного онколитического вируса в качестве средства для терапии рака молочной железы, в том числе с трижды-негативным фенотипом (NCT05376527, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Кроме того, в доклинических исследованиях показана высокая онкотоксическая активность VV-GMCSF-Lact в отношении глиобластомы человека U87 MG как *in vitro*, так и *in vivo*.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы являлась оценка терапевтического потенциала рекомбинантного онколитического вируса VV-GMCSF-Lact в отношении глиомы человека и разработка подходов терапии глиальных опухолей с помощью VV-GMCSF-Lact.

В ходе исследования необходимо было решить следующие задачи:

1. Получить панель культур клеток глиом человека из образцов опухолей различной степени злокачественности и охарактеризовать клетки полученных культур и клетки immortalized линий глиом человека по молекулярным маркерам стволовых опухолевых клеток;

2. Оценить цитотоксическое действие VV-GMCSF-Lact в отношении клеток immortalized линий и полученных от пациентов культур глиом человека *in vitro*;

3. Оценить противоопухолевую и антиметастатическую активность VV-GMCSF-Lact на мышинной модели ксенотрансплантатов глиом человека;

4. Исследовать биораспределение VV-GMCSF-Lact при внутривенном введении здоровым животным и мышам с ортотопически трансплантированной глиобластомой U87 MG;

5. Оценить противоопухолевую эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении синграфтов глиомы С6 крысы;

6. Провести анализ совместного действия VV-GMCSF-Lact и темозоломида на мышинной модели ксенотрансплантатов глиом человека;

7. Исследовать механизмы, способные обуславливать устойчивость клеток глиомы к действию VV-GMCSF-Lact.

**Научная новизна и практическая значимость.** В результате оценки терапевтического потенциала рекомбинантного онколитического вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact в отношении глиомы человека показано, что данный вирус является перспективным для дальнейших доклинических и клинических испытаний. 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.

Проведена оценка комбинированного действия VV-GMCSF-Lact и химиотерапевтических агентов, используемых при терапии злокачественных опухолей головного мозга. Впервые предложен перспективный подход терапии глиом - совместное применение VV-GMCSF-Lact и темозоломида, а также схема использования препаратов для дальнейших доклинических и клинических исследований.

Предложен возможный механизм устойчивости клеток глиом человека к действию VV-GMCSF-Lact. 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.

Согласно полученным результатам, онколитический вирус VV-GMCSF-Lact является перспективным кандидатным препаратом для терапии глиом человека.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Онколитический вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact обладает высокой цитотоксической активностью в отношении клеток иммортализованных линий и культур глиом человека, полученных из образцов опухолей пациентов. Чувствительность исследуемых клеток к вирусу не зависит от степени злокачественности первичной опухоли и уровня маркеров стволовых опухолевых клеток;

2. Онколитический вирус VV-GMCSF-Lact обладает высокой противоопухолевой и антиметастатической активностью в отношении глиом человека в мышинной модели подкожных ксенографтов.

3. VV-GMCSF-Lact проникает как через интактный гематоэнцефалический барьер, так и через ГЭБ животных с ортотопически трансплантированными опухолями. При внутривенном введении VV-GMCSF-Lact распределяется по всем органам и тканям, включая мозг, и селективно реплицируется в опухолевой ткани;

4. Онколитический вирус VV-GMCSF-Lact при внутриопухолевом введении крысам с ортотопически трансплантированной глиомой С6 оказывает антипролиферативное действие и препятствует формированию метастазов. При внутривенном введении VV-GMCSF-Lact ингибирует рост глиомы С6;

5. Применение комбинации онколитического вируса VV-GMCSF-Lact и темозоломида является перспективным подходом для терапии глиом. При этом введение темозоломида в терапевтическую схему должно происходить не ранее чем через 8-9 дней после применения VV-GMCSF-Lact;

6. Предложена модель, описывающая механизмы, участвующие в формировании чувствительности клеток глиом человека к действию онколитического вируса VV-GMCSF-Lact. Модель основана на взаимодействии клеточных белков – участников процессов апоптоза и некроптоза, и вирусных белков, способных влиять на элементы сигнальных путей гибели клеток. Согласно предложенной модели, киназа Akt1 и белок XIAP могут являться потенциальными мишенями таргетной терапии в комбинации с VV-GMCSF-Lact.

**Публикации и апробация результатов.** По результатам диссертации опубликовано 4 работы в рецензируемых научных журналах. Основные результаты работы были представлены на: международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2019), форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Новосибирск, Россия, 2020), FEBS Virtual Congress (онлайн участие, 2021), Всероссийской научной-практической конференции с международным участием «Цивьяновские чтения» (Новосибирск, Россия, 2021), Всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, Россия, 2022).

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и обсуждения, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 192 страницах, включает 45 рисунков, 9 таблиц и 3 приложения. Список литературы содержит 373 источника.

**Личный вклад автора.** Основная часть экспериментальной работы и анализ результатов выполнены лично автором, либо с его непосредственным участием. Работы по получению культур клеток глиом из образцов опухолей пациентов выполнены совместно с к.б.н., н.с. лаборатории биотехнологии Нуштаевой А.А. (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск). Работы по культивированию и анализу клеток глиом выполнены совместно с м.н.с. лаборатории биотехнологии Агеевко А.Б. (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск). Работы по оценке противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении иммунокомпетентной модели глиомы С6 крысы выполнены совместно с к.м.н., с.н.с. лаборатории клеточных технологий Юсубалиевой

Г.М. (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, г. Москва) и м.н.с. лаборатории биотехнологии Агеенко А.Б. (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск). МРТ-сканирование крыс линии Wistar выполнено заведующим отделением общей рентгенологии, рентгеновской компьютерной и магнитно-резонансной томографии Губским И.Л. (ФЦМН ФМБА России, г. Москва). Анализ МРТ-изображений крыс линии Wistar выполнен к.б.н., с.н.с. лаборатории генетики лабораторных животных Ромащенко А.В. (ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск). Иммуногистохимический анализ опухолей С6 крысы выполнен в ФНКЦ ФМБА России (г. Москва) под руководством заведующего патологоанатомическим отделением д.м.н. Забозлаева Ф.Г. (ФЦМН ФМБА России, г. Москва). Работы по ортотопической трансплантации клеток глиобластомы U87 MG мышам линии SCID выполнены к.б.н., заведующим ЦКП "SPF-виварий" Завьяловым Е.Л. (ФИЦ ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск). Гистологический анализ опухолей U87 MG после терапии мышей SCID с помощью VV-GMCSF-Lact и темозоломида выполнен к.м.н., с.н.с. лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Сеньковой А.В. (ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Получение и характеристика культур клеток глиом, полученных из образцов опухолей пациентов, как модели для оценки онкотоксического действия VV-GMCSF-Lact

#### *1.1. Получение культур клеток глиом из образцов опухолей различной степени злокачественности*

Для оценки цитотоксического действия VV-GMCSF-Lact была создана коллекция культур клеток глиом, полученных из образцов опухолей пациентов. Для получения данных культур были использованы образцы глиом различной степени злокачественности, предоставленные Новосибирским научно-исследовательским институтом травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна с письменного согласия пациентов. Культуры, используемые в работе, представлены в Таблице 1.

Клетки культур глиом, полученных из образцов опухолей пациентов, культивировали в условиях, позволяющих инициировать и поддерживать рост нейросфер. Оказалось, что клетки не всех полученных культур способны формировать нейросферы. Культуры клеток, способных образовывать нейросферы, были обозначены как MG1ns, BR1.20ns, BR2.20ns, BR3.20ns и BR5.21ns.

Таблица 1. Клиническая характеристика культур клеток глиом, полученных из образцов опухолей пациентов и используемых в работе.

Культура	Степень злокачественности	Диагноз
MG1	4	глиобластома
MG2	4	глиобластома
MG4	4	глиобластома
AS1	3	олигодендроглиома
AS2	3	астроцитомы
BR1.20	4	глиобластома
BR2.20	2	диффузная астроцитомы
BR3.20	4	глиобластома
BR4.21	4	глиобластома
BR5.21	3	анапластическая астроцитомы
U87 MG	4	глиобластома
U343 MG	4	глиобластома

Клетки культур глиом, полученных из образцов опухолей пациентов, культивировали в условиях, позволяющих инициировать и поддерживать рост нейросфер. Оказалось, что клетки не всех полученных культур способны формировать нейросферы. Культуры клеток, способных образовывать нейросферы, были обозначены как MG1ns, BR1.20ns, BR2.20ns, BR3.20ns и BR5.21ns.

### ***1.2. Характеризация клеток иммортализованных линий и культур глиом, полученных из образцов опухолей пациентов***

Для характеристики клеток полученных культур глиом, а также клеток иммортализованных линий глиобластомы U87 MG и U343 MG проводили исследование уровня маркеров нейральных стволовых клеток (CD133, CD44, CD15, CD171), эмбриональных стволовых клеток (SOX-2, c-Myc) и маркеров EGFR и PDGFRA.

Согласно полученным данным исследуемые маркеры на разном уровне представлены в клетках различных культур. При этом уровни

данных маркеров не зависят от степени злокачественности первичной опухоли.

## 2. Цитотоксическая активность VV-GMCSF-Lact в отношении клеток иммортализованных линий и культур глиом, полученных из образцов опухолей пациентов

Исследование цитотоксической активности VV-GMCSF-Lact в отношении клеток глиом человека проводили как на клетках иммортализованных линий глиобластомы U87 MG и U343 MG, так и на клетках культур, полученных из образцов опухолей пациентов (MG1, MG4, BR1.20, BR2.20, BR3.20, BR4.21, BR5.21 и AS2), в том числе содержащих нейросферы (MG1ns, MG4ns, BR1.20ns, BR2.20ns, BR3.20ns и BR5.21ns) (Таблица 2).

Согласно полученным данным клетки различных культур обладают разной чувствительностью к действию VV-GMCSF-Lact, что не зависит от степени злокачественности первичной опухоли ( $R^2=0.037$ ). Клетки астроцитом BR2.20 и AS2 (3 степень злокачественности) оказались наиболее чувствительны к действию VV-GMCSF-Lact. Астроцитом BR5.21 и глиобластома BR4.21 были наиболее устойчивы к вирусу (Таблица 2). Кроме того, не обнаружено корреляции между уровнями маркеров стволовых опухолевых клеток, маркеров EGFR и PDGFRA в клетках исследованных культур и их чувствительностью к действию VV-GMCSF-Lact.

Таблица 2. Цитотоксическая активность VV-GMCSF-Lact в отношении клеток глиом.

Культура клеток	CD50, БОЕ/клетку
U87 MG	0.1±0.028
U343 MG	0.06±0.008
MG1	0.12±0.02
MG1ns	0.007±0.0012
MG4	0.08±0.004
MG4ns	0.05±0.006
BR1.20	0.006±0.0004
BR1.20ns	0.07±0.005
BR3.20	0.02±0.0015
BR3.20ns	0.16±0.03
BR2.20	0.00004±0.000007
BR2.20ns	0.0033±0.0005
BR4.21	0.65±0.07
BR5.21	0.5±0.018

Культура клеток	CD50, БОЕ/клетку
BR5.21ns	0.7±0.21
AS2	0.00002±0.000003

CD50 – множественность инфекции, вызывающую гибель 50% клеток

### 3. Оценка противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении глиобластомы человека в модели ксенографтов

#### 3.1. Противоопухолевая и антиметастатическая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении опухолей U87 MG и U343 MG глиобластомы человека

Для оценки противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact использовали модель подкожных ксенотрансплантатов. В качестве опухолевых моделей были использованы клетки иммортализованных линий глиобластомы человека U87 MG и U343 MG. Мышам с подкожно трансплантированными опухолями объемом 100 – 120 мм<sup>3</sup> внутриопухолево вводили VV-GMCSF-Lact в дозе 10<sup>7</sup> БОЕ/мышь. Курс терапии состоял из 3 – 4 инъекций с интервалом 7 дней. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор по той же схеме в тех же объемах. Торможение роста опухоли определяли путем сравнения объемов опухолей животных опытной и контрольной групп. Ингибирование роста опухоли U343 MG составило 84% (Рисунок 1А).

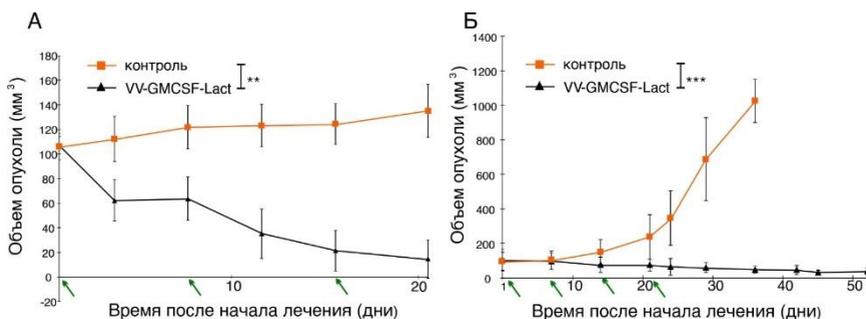


Рисунок 1. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении подкожных ксенографтов глиобластомы человека. Внутриопухолево введение. А – динамика изменения объемов опухолей U343 MG, \*\**p* < 0.01 на 20 день от начала лечения; Б – динамика изменения объемов опухолей U87 MG, \*\*\**p* < 0.001 на 36 день от начала лечения. Представлены средние значения±SD (стандартное отклонение) группы из шести мышей. Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

При этом, у 30% животных при визуальном осмотре в момент окончания эксперимента опухоли не были выявлены. При лечении мышей с опухолями U87 MG подавление роста опухоли через 22 дня после первой инъекции составило 68%. После 4ой инъекции препарата на 53 день эксперимента ингибирование роста опухоли U87 MG составило 96% (Рисунок 1Б). Но при этом эффекта элиминации опухолей в случае U87 MG достигнуто не было.

Для оценки способности VV-GMCSF-Lact находить метастазы глиобластомы и подавлять их развитие, была использована следующая модель метастазирования: клетки U343 MG подкожно трансплантировали с разных сторон тела мышей SCID для формирования «опухоли» и «метастаза». Терапию проводили по схеме, описанной выше. На 7-й день после последней инъекции наблюдалось статистически значимое ( $p < 0,05$ ) уменьшение объемов как «опухоли», так и «метастаза» мышей, получавших VV-GMCSF-Lact, по сравнению с животными контрольной группы (Рисунок 2). Индекс торможения роста опухоли составил 93.9% для опухоли и 85.2% для «метастаза».

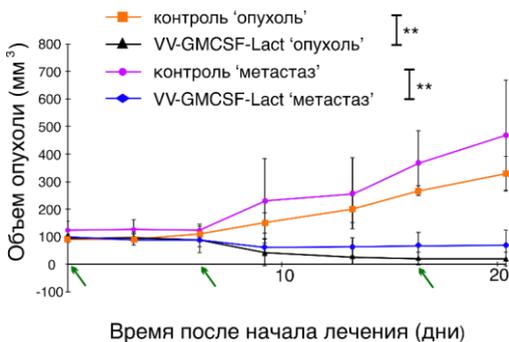


Рисунок 2. Динамика развития «опухоли» и «метастаза» глиобластомы U343 MG при лечении VV-GMCSF-Lact. Внутритропухолевое введение.  $**p < 0.01$ . Представлены средние значения  $\pm$ SD группы из шести мышей. Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

### **3.2. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении ксенографтов глиобластомы человека, полученной из образца опухоли пациента**

В ходе проведения исследования было обнаружено, что одна из культур, полученных ранее из образца глиобластомы, в условиях культивирования нейросфер (MG4ns) способна формировать опухоли при подкожной трансплантации мышам линии SCID. Эти опухоли были в дальнейшем использованы для оценки противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact. Вирусный препарат вводили мышам-опухоленосителям внутритропухолево, в дозе  $10^7$  БОЕ/мышь, курсом из 4х инъекций с интервалом между инъекциями 7 дней. Контрольные животные получали

физиологический раствор по той же схеме. Было показано, что VV-GMCSF-Lact эффективно подавляет рост опухоли MG4ns. Через 22 дня после первой инъекции вируса ингибирование роста опухоли составило 97%. При этом, у 10% животных при визуальном осмотре в момент окончания эксперимента опухоли не были выявлены (Рисунок 3).

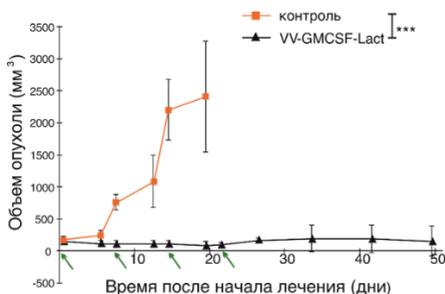


Рисунок 3. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении глиобластомы MG4ns. \*\*\* $p < 0.001$  на 20 день от начала лечения. Представлены средние значения  $\pm$ SD группы из шести мышей. Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Таким образом, VV-GMCSF-Lact обладает высокой противоопухолевой и антиметастатической активностью в отношении подкожных ксенографтов глиобластомы человека.

#### 4. Распределение VV-GMCSF-Lact по органам и тканям при внутривенном введении лабораторным животным

В настоящее время наиболее распространенным способом доставки онколитических вирусов является внутриопухолевое введение, так как при этом влияние на эффективность препарата таких факторов как наличие ГЭБ и формирование противовирусного иммунного ответа значительно снижается. В то же время, с точки зрения безопасности системное введение вирусных препаратов является предпочтительным, поскольку этот способ наименее инвазивен.

Для оценки способности VV-GMCSF-Lact проникать через ГЭБ, мы исследовали распределение вируса по органам и тканям здоровых мышей и мышей SCID с ортотопически трансплантированными опухолями U87 MG. VV-GMCSF-Lact вводили внутривенно в дозе  $5 \times 10^7$  БОЕ/мышь однократно. Через 7 дней после инъекции мышей подвергали эвтаназии и забирали кровь, опухоли и органы для дальнейшего анализа методом ПЦР в режиме реального времени. Полученные данные показали, что VV-GMCSF-Lact способен проникать через ГЭБ и распределяется по всем органам и тканям, включая головной мозг. При этом у животных с трансплантированной опухолью количество вируса в опухоли было на несколько порядков выше, чем в других органах и тканях (Рисунок 4).

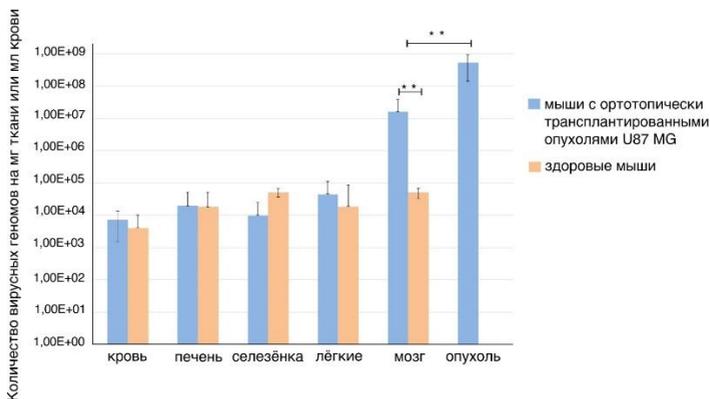


Рисунок 4. Распределение VV-GMCSF-Lact в организме здоровых животных и мышей-опухоленосителей при внутривенном введении. Представлены средние значения±SD группы из шести мышей. \*\*\* $p < 0.01$ . Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. На графике представлена логарифмическая шкала оси значений с основанием 10.

Таким образом, установлено, что VV-FMCSF-Lact эффективно проникает через ГЭБ здоровых животных и мышей-опухоленосителей.

## 5. Оценка эффективности VV-GMCSF-Lact в отношении синграфтов глиомы С6 крысы

Поскольку виротерапия является иммунотерапевтическим подходом, необходимо было провести оценку противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact на иммунокомпетентной модели. Глиома С6 крысы по ряду параметров сходна с глиомами человека и является подходящей моделью. Мы показали, что клетки глиомы С6 крысы чувствительны к действию VV-GMCSF-Lact. Для оценки противоопухолевой эффективности VV-GMCSF-Lact *in vivo* самкам крыс линии Wistar ортотопически трансплантировали клетки глиомы С6. Формирование опухолей отслеживали с помощью МРТ-сканирования. Когда опухоли были сформированы, животных делили на группы по схеме: контрольная группа 1 (1 мл физраствора внутривенно); контрольная группа 2 (50 мкл физраствора внутриопухолево); группа внутриопухолевого введения (доза вируса  $1.65 \times 10^7$  БОЕ в 50 мкл физраствора) и группа внутривенного введения (доза вируса  $3 \times 10^8$  БОЕ в 1 мл физраствора). Дозы препарата были определены на основании предварительных экспериментов. Курс терапии состоял из 3-х инъекций с интервалом 7 дней. Динамику развития опухолей оценивали с помощью МРТ-сканирования. Полученные

данные позволяют сделать вывод об изменении характера роста опухоли под действием VV-GMCSF-Lact (Рисунок 5).

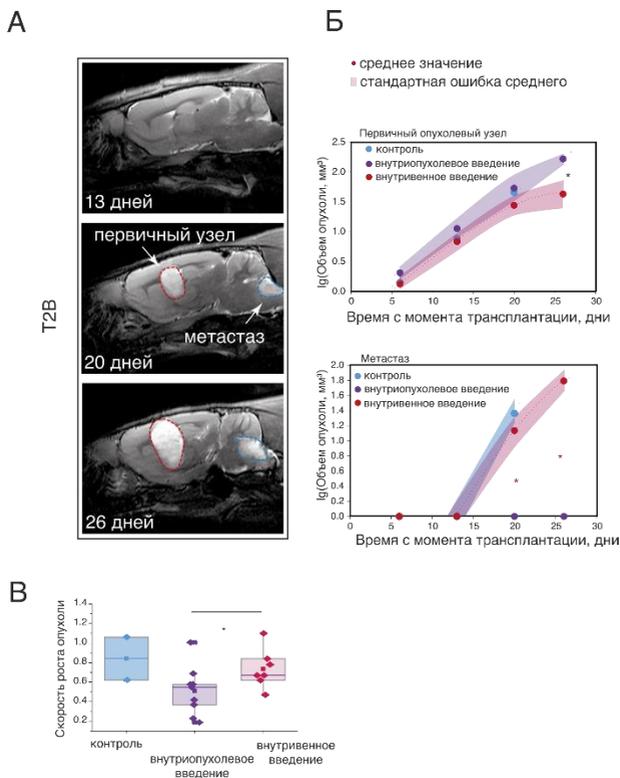


Рисунок 5. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении глиомы С6 крысы. А – МРТ-изображения опухоли и метастаза контрольной группы в динамике; Б – изменение объемов опухолей и метастазов глиомы С6 при внутривенном и внутриопухолевом введении VV-GMCSF-Lact; В – скорость роста опухолей С6 при внутривенном и внутриопухолевом введении VV-GMCSF-Lact. \* -  $p \leq 0.05$ . Представлены данные в виде «среднее значение±стандартная ошибка». Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

У животных контрольной группы помимо основного опухолевого узла через 7 дней после последней инъекции присутствуют отдаленные очаги инвазивного роста глиомы. У животных, получавших вирус внутривенно, суммарные объемы опухолей достоверно меньше, чем у контрольных животных. Индекс торможения роста опухолей составил 60%. Однако, при внутривенном введении препарата также наблюдается развитие отдаленных метастазов. При внутриопухолевом введении вируса

отдаленных очагов не выявлено, хотя объемы опухолей у крыс достоверно не отличались от контроля. Данный факт можно объяснить формированием отека в результате воспалительного процесса. При этом, сравнение скорости роста опухолей животных, получавших лечение, и животных контрольной группы позволяет сделать вывод, что VV-GMCSF-Lact тормозит развитие опухоли при внутриопухолевом введении. Об антипролиферативном эффекте VV-GMCSF-Lact при внутриопухолевом введении свидетельствует также снижение уровня Ki-67 (антиген Kiel 67) опухолевых клеток (Рисунок 6).

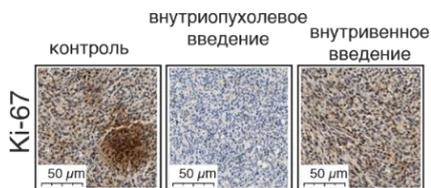


Рисунок 6. Иммуногистохимический анализ представленности маркера Ki-67 в опухолях С6 при внутривенном и внутриопухолевом введении VV-GMCSF-Lact.

## 6. Анализ совместного действия VV-GMCSF-Lact и химиопрепаратов в отношении глиом человека

Ввиду развития резистентности глиом к действию различных противоопухолевых агентов, одним из наиболее оптимальных терапевтических режимов является комбинация препаратов разнонаправленного действия. В предварительных экспериментах *in vitro* мы показали, что при совместном применении VV-GMCSF-Lact и темозоломид необходимо разносить по времени. Для оценки противоопухолевой эффективности комбинации VV-GMCSF-Lact и TMZ терапию проводили согласно схеме, представленной в Таблице 4.

Таблица 4. Схема терапии мышей с подкожно трансплантированными опухолями U87 MG с помощью VV-GMCSF-Lact и TMZ как в режиме монотерапии, так и в комбинации.

Группа (n=6)	Терапевтическая схема
VV-GMCSF-Lact	<b>Вирусный препарат:</b> в/о введение, доза $10^7$ БОЕ/мышь, 3 инъекции с интервалом в 7 дней
TMZ	<b>TMZ:</b> в/б введение, доза 7.5 мг/кг, 4 инъекции, ежедневно
VV-GMCSF-Lact+TMZ	<b>Вирусный препарат:</b> в/о введение, доза $10^7$ БОЕ/мышь, один раз. <b>TMZ:</b> через 8 дней после вируса, в/б введение, доза 7.5 мг/кг, 4 инъекции, ежедневно.
TMZ+VV-GMCSF-Lact	<b>TMZ:</b> в/б введение, доза 7.5 мг/кг, 4 инъекции, ежедневно. <b>Вирусный препарат:</b> через 72 ч после TMZ, в/о введение, доза $10^7$ БОЕ/мышь, 3 инъекции с интервалом в 7 дней
Контроль	Нелеченные мыши-опухоленосители

Полученные результаты свидетельствуют о том, что VV-GMCSF-Lact как в режиме монотерапии, так и в комбинации с ТМЗ, независимо от порядка применения препаратов, обладает большей противоопухолевой эффективностью, чем ТМЗ (Рисунок 8). Индексы торможения роста опухолей (ТРО) для групп «вирус», «вирус-тмз» и «тмз-вирус» достоверно не отличаются, что свидетельствует о том, что все исследованные схемы терапии возможны к применению. При этом, при применении ТМЗ в режиме монотерапии индекс ТРО составил лишь 33%.

Согласно данным иммуногистохимического анализа, при комбинированной терапии онколитическим вирусом с последующим введением ТМЗ были выявлены более значимые, чем в других группах, очаги бесструктурной некротически измененной ткани (Таблица 5). Очаги деструкции в данном случае занимали  $93.6 \pm 3.6\%$  от всей площади среза. Также при виротерапии как в режиме монотерапии, так и в комбинации с ТМЗ, наблюдается достоверное снижение количества митозов относительно контроля.

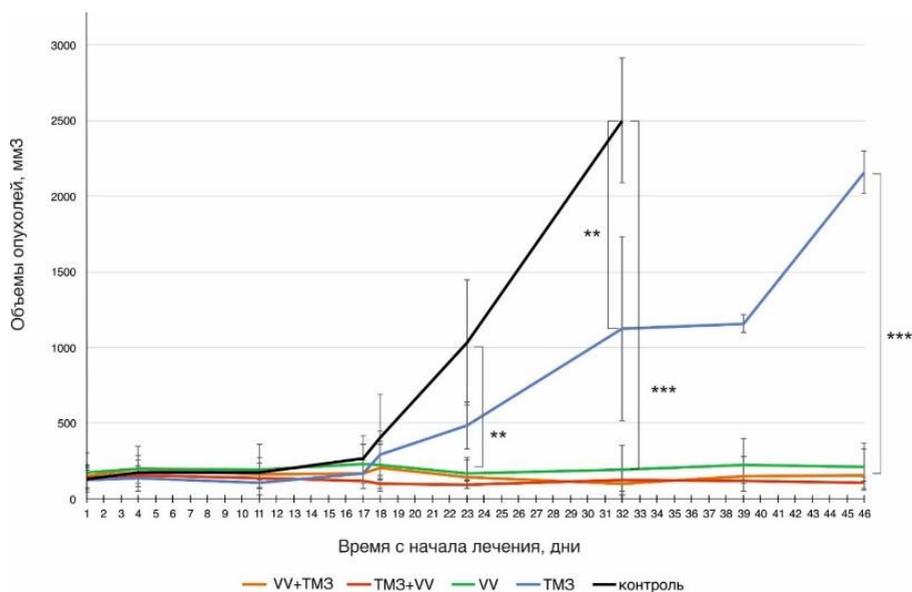


Рисунок 8. Противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact, темозоломида и их комбинации в отношении подкожно трансплантированной глиобластомы U87 MG. Данные представлено как среднее значение  $\pm$  SD (n=6). \*\* -  $p \leq 0.01$ , \*\*\* -  $p \leq 0.001$ . Статистический анализ данных проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Согласно полученным данным, терапия глиобластомы вирусным препаратом VV-GMCSF-Lact как в режиме монотерапии, так и в комбинации с TMZ, значительно эффективнее, чем терапия только TMZ. применение сначала VV-GMCSF-Lact, а затем TMZ приводит к большей деструкции опухолевой ткани.

Таблица 5. Структурные изменения ткани глиобластомы U-87 без лечения и после введения темозоломида, вирусного препарата и их комбинации.

	Контроль	TMZ	VV	VV + TMZ	TMZ + VV
Митозы, Nv	5.5±0.7	3.6±0.6	0.6±0.4**	0	0
Деструктивные изменения, %	52.1±9.5	62.5±12	74.5±9.8	93.6±3.6*	66.8±2.5

\* отличия статистически значимы от контроля при  $p \leq 0.05$ . \*\* отличия статистически значимы от контроля при  $p \leq 0.001$ .

## 7. Исследование механизмов, обуславливающих чувствительность клеток глиом человека к действию VV-GMCSF-Lact

### 7.1. Оценка уровня белков, опосредующих проникновение VV-GMCSF-Lact в клетки глиом человека

Поскольку одной из причин отсутствия значимых достижений в терапии глиом является формирование резистентности опухоли к терапевтическим агентам, и мы показали, что различные опухоли обладают разной чувствительностью к действию VV-GMCSF-Lact, необходимо было исследовать механизмы, способные обуславливать устойчивость глиом к нашему онколитическому вирусу. Известно, что вирус осповакцины способен проникать в клетку, в частности, по механизму макропиноцитоза за счет взаимодействия остатков фосфатидилсерина на вирусной мембране с рецепторами, ассоциированными с G-белком клетки, что приводит к активации нижележащих сигнальных путей, таких как PI3K/Akt, реорганизации цитоскелета клетки-хозяина и последующему проникновению вируса в клетку.

Мы провели оценку уровня белков, в частности компонентов PI3K/Akt пути, способных опосредовать проникновение VV-GMCSF-Lact, в клетках U87 MG, U343 MG и BR1.20, BR3.20, обладающих различной чувствительностью к VV-GMCSF-Lact. И показали, что уровень Akt, фосфорилированной по треонину в 308 положении, коррелирует с устойчивостью клеток к VV-GMCSF-Lact (Рисунок 9). Киназа Akt, согласно литературным данным, ингибирует митохондриальный путь апоптоза. Фосфорилирование Akt1 именно по треонину в 308 положении определяет полную активацию этой киназы

Таким образом, можно предположить, что в более устойчивых к действию вируса клетках выше уровень активированной киназы Akt.

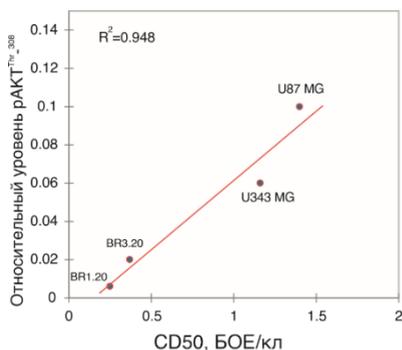


Рисунок 9. Корреляция между относительным уровнем белка pAkt<sup>Thr-308</sup> в клетках глиом и их чувствительностью к действию VV-GMCSF-Lact (CD50). Нормализация pAkt<sup>Thr-308</sup> выполнена относительно уровня β-актина.

## 7.2. Анализ апоптотических процессов в клетках глиобластомы человека под действием VV-GMCSF-Lact

Для исследования процессов клеточной гибели, запускаемых в клетках глиом человека онколитическим вирусом VV-GMCSF-Lact, клетки исследуемых культур обрабатывали вирусом и проводили идентификацию апоптотических клеток методом проточной цитометрии.

В культуре BR1.20, самой чувствительной к вирусу, количество AnnV+/PI- и AnnV+/PI+-клеток больше в сравнении с остальными исследуемыми культурами (Рисунок 10). При этом, в самой устойчивой иммортализованной культуре U87 MG количество как AnnV+/PI-, так и AnnV+/PI+-клеток значительно ниже.

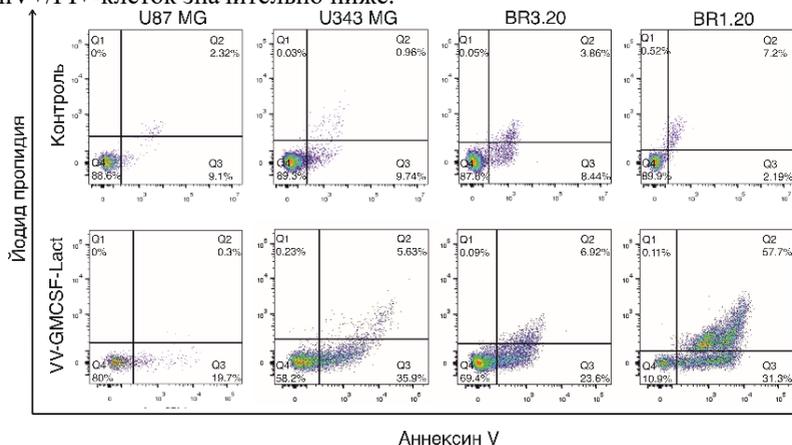


Рисунок 10. Анализ процессов клеточной гибели в клетках иммортализованных и полученных из образцов опухолей пациентов культур глиобластомы человека под

действием VV-GMCSF-Lact. Популяции клеток: Q2 – погибшие клетки; Q3 – клетки, находящиеся на ранних стадиях апоптоза; Q4 – живые клетки. Проточная цитометрия. Окрашивание Аннексином V (ось X) и PI (йодидом пропидия (ось Y)).

На основании того, что клетки исследуемых культур в большей степени положительны только по Аннексину V, можно судить о преобладании апоптотического пути гибели клеток глиом под действием VV-GMCSF-Lact, что является несомненным преимуществом, поскольку развитие воспалительных реакций при некрозе опухолевых клеток головного мозга является нежелательным фактором.

### ***7.3. Оценка уровня белков, участвующих в VV-GMCSF-Lact-опосредованной гибели клеток глиом человека***

Онколитический вирус осповакцины VV-GMCSF-Lact экспрессирует ген онкотоксического белка лактапина, который, как показано ранее в нашей лаборатории, индуцирует апоптоз опухолевых клеток по митохондриальному пути. Однако известно, что зачастую в клетках глиом наблюдается высокий уровень белков, ингибирующих апоптоз, например, XIAP. Также на эффективность реализации апоптоза, индуцируемого лактапином, может влиять уровень в опухолевых клетках белка SMAC, который при увеличении проницаемости мембран митохондрий покидает митохондрии и участвует в связывании белков-ингибиторов каспаз, таких как XIAP.

При исследовании уровня белков, опосредующих активацию апоптоза в клетках глиом под действием вируса, показано, что в клетках наиболее чувствительной к VV-GMCSF-Lact культуры процессы, ведущие к апоптотической гибели по митохондриальному пути, происходят более эффективно. BR1.20 – самая чувствительная к вирусу и единственная культура, в клетках которой детектируется активированная каспаза-7 (Рисунок 11), что свидетельствует о необратимой активации митохондриального пути апоптоза. Также установлена отрицательная корреляция между относительным уровнем белка p53 в клетках глиом и чувствительностью клеток к действию вируса (Рисунок 12).

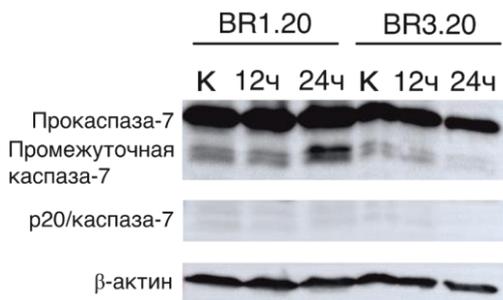


Рисунок 11. Анализ содержания каспазы-7 в клетках культур глиом BR1.20 и BR3.20. Вестерн-блот. В качестве «загрузочного» контроля использован  $\beta$ -актин. К - лизаты контрольных клеток; 12 ч, 24 ч - лизаты клеток, инкубированных с VV-GMCSF-Lact в течение 12 и 24 часов.

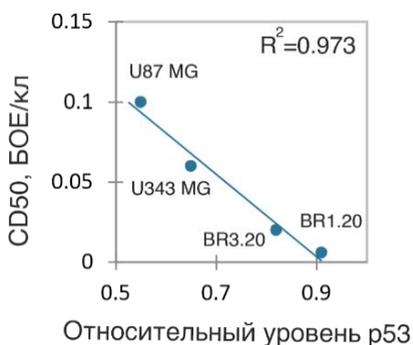


Рисунок 12. Корреляция между относительным уровнем p53 в клетках глиом и чувствительностью клеток к действию VV-GMCSF-Lact (CD50). Нормализацию уровня p53 проводили относительно уровня  $\beta$ -актина.

Кроме того, при оценке ко-иммунопреципитатов XIAP показано, что уровень белка XIAP, ингибирующего апоптоз, в клетках культур, более устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact, был выше на базовом уровне (в контрольной точке) (Рисунок 13А). Более того, в клетках всех культур, кроме BR3.20 уровень XIAP возрастает к 24 часам инкубации с вирусом и коррелирует с устойчивостью клеток к VV-GMCSF-Lact (Рисунок 13Б), что может свидетельствовать об ингибировании апоптоза.

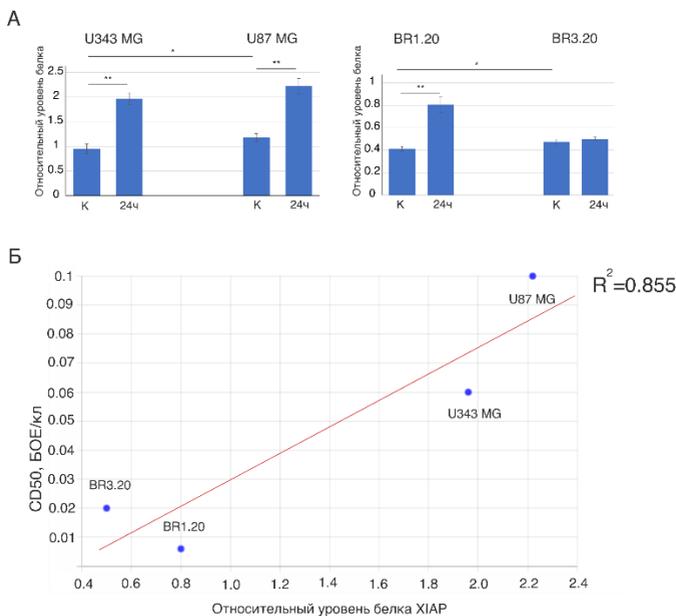


Рисунок 13. Изменение уровня белка XIAP под действием VV-GMCSF-Lact в коммунореципитатах клеток глиом. А – относительный уровень XIAP в клетках глиом с различной чувствительностью к вирусу (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ); Б – корреляция между относительным уровнем XIAP в клетках глиом и чувствительностью клеток к действию VV-GMCSF-Lact (CD50). Нормализацию уровня XIAP проводили относительно уровня  $\beta$ -актина. К - лизаты контрольных клеток; 24 - лизаты клеток, инкубированных с VV-GMCSF-Lact в течение 24 часов.

## 8. Предлагаемая модель молекулярного механизма, определяющего чувствительность клеток глиом человека к действию онколитического вируса VV-GMCSF-Lact

Совокупность полученных данных позволяет предложить модель, описывающую механизмы устойчивости клеток глиом к действию VV-GMCSF-Lact.

В клетках глиом человека, устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact, детектируется более высокий уровень активированной киназы Akt1, которая способна ингибировать митохондриальный путь апоптоза. Вероятно, ее активация в опухолевых клетках в процессе вирусной инфекции снижает эффективность цитотоксического действия рекомбинантного вируса, экспрессирующего трансген лактаптин – индуктор апоптоза по митохондриальному пути.

Анализ уровня белков, вовлеченных в активацию митохондриального пути апоптоза, показал, что в устойчивых к вирусу клетках снижается уровень p53, что может свидетельствовать о подавлении апоптотических процессов. Более того, уровень белка XIAP, ингибирующего апоптоз, в клетках более устойчивых к действию VV-GMCSF-Lact культур глиом также был выше. Известно, что существует взаимосвязь между уровнем XIAP, ингибитора каспаз, и активацией киназы Akt1. Таким образом, направленное воздействие на одну из этих молекул в комбинации с виротерапией VV-GMCSF-Lact позволит повысить эффективность действия вируса и ещё больше сдвинуть путь гибели клеток в сторону апоптоза.

## **ВЫВОДЫ**

1. Получена и охарактеризована панель культур клеток глиом человека из образцов опухолей различной степени злокачественности. Показано, что уровень маркеров стволовых опухолевых клеток (CD133, CD44, CD15, CD171, SOX-2, c-Myc) и маркеров EGFR и PDGFRA в клетках полученных культур и иммortalизованных линий глиом человека не коррелирует со степенью злокачественности первичной опухоли;

2. Показана высокая цитотоксическая активность онколитического вируса VV-GMCSF-Lact в отношении клеток иммortalизованных линий глиобластомы и полученных из образцов опухолей пациентов культур глиом. Чувствительность клеток к вирусу не зависит от степени злокачественности первичной опухоли и возрастает в ряду BR4.21<BR5.21<MG1<U87MG<MG4<U343MG<BR3.20<BR1.20<BR3.20<BR2.20<AS2;

3. Онколитический вирус VV-GMCSF-Lact является перспективным противоопухолевым препаратом для лечения глиом человека:

3.1 при внутривенном введении как здоровым животным, так и животным с ортотопически трансплантированными опухолям, VV-GMCSF-Lact распределяется по всем органам и тканям, включая мозг, и селективно реплицируется в опухолевой ткани;

3.2 при внутриопухолевом введении препарата мышам с подкожно трансплантированной глиобластомой человека индексы торможения роста опухолей и искусственного метастаза (ТРО) составили не менее 84%;

3.3. при внутриопухолевом введении крысам с ортотопически трансплантированной глиомой С6 VV-GMCSF-Lact предотвращает развитие метастазов. При внутривенном введении вирусного препарата происходит достоверное уменьшение объемов опухолей (ТРО=60%);

3.4 VV-GMCSF-Lact, как в режиме монотерапии, так и в комбинации с темозоломидом (ТРО = 93 – 96%), 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 терапии глиом. Предложена терапевтическая схема совместного применения препаратов;

4. 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.

5. Предложен возможный механизм, определяющий чувствительность 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 элементы сигнальных путей клеточной гибели.

#### **Основные результаты диссертации опубликованы в работах:**

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

