

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу

Семеновой Анастасии Викторовны «Конструирование и изучение противоопухолевых свойств рекомбинантных вариантов вируса осповакцины, экспрессирующих трансгены репортерных, иммуностимулирующих и онкотоксических белков», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

03.01.03 – «Молекулярная биология»

На сегодняшний день онкологические заболевания представляют собой одну из наиболее актуальных проблем, стоящих перед отечественной системой здравоохранения. По данным Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена "грубый" показатель заболеваемости на 100 000 населения России составил 425,5, прирост за 10 - летний период 23,7%, что в значительной мере определено неблагоприятным направлением демографических процессов в популяции России, обусловившим "постарение" населения. К сожалению, Сибирский Федеральный округ лидирует по заболеваемости среди других округов за 2018 год - 464,50, при смертности - 7,42 (данные показатели рассчитаны для обоих полов («грубые» показатели на 100 000 населения)). В связи с этим актуальны разработки улучшенных методов лечения, в том числе, связанные с использованием потенциальных возможностей вирусов семейства *Poxviridae* в борьбе с онкологическими заболеваниями.

Данная работа направлена на решение проблемы профилактики и терапии онкологических заболеваний, в частности, посвящена конструированию рекомбинантных вариантов аттенуированных штаммов вирусов осповакцины (VACV), несущих трансгены репортерных, иммуностимулирующих и онкотоксических белков и изучение их онколитических свойств с целью создания терапевтических противоопухолевых вакцин. В данной работе для усиления противоопухолевых свойств аттенуированных вариантов VACV в их геномы

встраивали следующие трансгены: онкотоксический белок NS1 (первый неструктурный белок парвовируса Н-1); зелёный флуоресцентный белок GFP2; онкотоксический белок лактаптин; цитокин ГМ-КСФ.

Исходя из вышесказанного диссертационная работа Семеновой А.В., целью которой являлось создание онколитических вирусов, представляется актуальным исследованием.

Автором работы были сконструированы и исследованы противоопухолевые эффекты рекомбинантных вариантов: (1) двух вирусов осповакцины (штаммы Л-ИБП и MVA), экспрессирующих трансген онкотоксического белка NS1 парвовируса крыс Н-1, (2) вируса на основе штамма Л-ИБП с делециями двух генов вирулентности – VGF и ТК и встройкой репортерного трансгена GFP2; (3) двойного рекомбинантного штамма Л-ИБП с удалением генов вирулентности VGF и ТК и встройкой трансгенов противоопухолевого белка лактапина и ГМ-КСФ. Показано, что рекомбинантный вариант VACV на основе репликативно-компетентного штамма Л-ИБП может рассматриваться в качестве перспективного средства для лечения глиобластомы человека, а рекомбинантный вариант VV-GMCSF-Lact обладает высокой онколитической активностью в отношении широкого спектра клеток опухолей молочной железы человека. Более того сравнительный анализ последнего с зарубежным аналогом Pexa-Ves показывает ряд прогнозируемых преимуществ разработанного штамма VV-GMCSF-Lact: штамм более безопасен, уровень продукции ГМ-КСФ выше, литическая активность выше и т.д. В 2019 году были успешно закончены его доклинические исследования как первого в России лекарственно средства для виротерапии злокачественных новообразований молочной железы. Все это говорит о высоком практическом значении проделанной работы.

Анализ основных положений диссертационного исследования позволяет сделать вывод, что диссертация является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным на высоком научном уровне. Представленные в работе выводы обоснованы. Основные положения

диссертационной работы опубликованы в международных и российских журналах (4 статьи), а также неоднократно докладывались на российских и международных конференциях (11 конференций), автором получено 2 патента РФ.

Диссертация построена по классической схеме и изложена на 121 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 4 таблиц и 33 рисунков. Список литературы включает 226 источников.

Во введении автор чётко очерчивает проблему, определяет цель и задачи исследования. Литературный обзор написан подробно, структурирован, хорошо освещено современное состояние науки по данной проблематике. Имеются главы посвященные: онколитической виротерапии в целом, приведена характеристика семейства *Poxviridae*, типы модификации вируса осповакцины с целью повышения безопасности и улучшения онколитических свойств, а также описаны методы конструирования рекомбинантных вариантов вируса осповакцины. По литературному обзору имеется заключение. Материалы и методы описаны достаточно подробно, чтобы можно было воспроизвести поставленные эксперименты. Используемые методики и анализ полученных результатов не вызывают сомнения в их достоверности, обоснованности выводов. Стоит отметить большой объем проделанной работы - сконструировано четыре целевых рекомбинантных вируса, исследованы их противоопухолевые эффекты, помимо этого были сконструированы соответствующие контроли, промежуточные варианты.

Заключение в полной мере отражает суть работы, содержит обсуждение полученных результатов исследования. Выводы, научные положения, достоверность, научная и практическая новизна полученных результатов обоснованы.

Личный вклад автора заключается в конструировании, анализе структуры и иммунохимических свойств рекомбинантных вариантов VACV, наработке и очистке вирусных штаммов, исследовании цитотоксических свойств на опухолевых и нормальных клеточных культурах человека, *in vivo* на мышах линии Nu/Nu. Остальные работы были проведены совместно с коллабораторами.

В целом диссертация Семеновой А.В. оценивается положительно, имеются следующие замечания, не умаляющие значение диссертации:

1. Так как в работе постоянно сравниваются попарно полученные рекомбинантные вирусы, то было бы логично исследовать онколитическую активность штамма VV-NS1-dGF в сравнении с исходным штаммом VVdGF2/6 на панели опухолевых клеток человека разного тканевого и органного генеза, так же как исследовали таковую для MVA-NS1.
2. Касательно рисунков: Рисунок 1 в диссертации содержит английские слова. Рисунок 1 в автореферате – на рисунке обозначена нумерация – А, Б, В, в описании к рисунку – А, В, С, там же - отсутствует обозначение дорожки 4 на вестерн – блоте. Рисунок 9 – надо было обозначить праймер ТК—flank 1 sense на рис.9(А), чтобы правильно интерпретировать рис.9 (Б). На вестерн-блотах лучше указывать размер целевого белка.

Тем не менее, в целом, полученные соискателем результаты имеют важнейшее практическое значение для профилактики и лечения онкологических заболеваний, и несмотря на представленные замечания, заслуживают высокой оценки. Учитывая актуальность выполненного исследования, практическое значение работы, полагаю, что диссертационная работа Семеновой Анастасии Викторовны «Конструирование и изучение противоопухолевых свойств рекомбинантных вариантов вируса осповакцины, экспрессирующих трансгены репортерных, иммуностимулирующих и онкотоксических белков» является законченной научно-квалификационной работой и отвечает требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения учёных степеней» (Постановление правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор

заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»

Дымова Майя Александровна

630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева,
8, тел. 8 (913) 476-40-12, e-mail:

maua.a.rot@gmail.com, Федеральное
государственное бюджетное учреждение
науки Институт химической биологии и
фундаментальной медицины Сибирского
отделения Российской академии наук
(ИХБФМ СО РАН), научный сотрудник
лаборатории Биотехнологии, кандидат
биологических наук (03.01.03)

Подпись Дымовой М.А. заверяю

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН



к.х.н. Пестряков П.Е.