

ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНСТВО РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ВИДОВ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ И МЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА РОССИИ» (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России)

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ФГБУ ФНКЦ ФМБА России
доктор медицинских наук, профессор



А.В. Троицкий

«01» июня 2020 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России» на диссертационную работу Семеновой Анастасии Викторовны «Конструирование и изучение противоопухолевых свойств рекомбинантных вариантов вируса осповакцины, экспрессирующих трансгены репортерных, иммуностимулирующих и онкотоксических белков», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Актуальность темы диссертационного исследования

Проблема разработки новых методов лечения онкологических заболеваний является едва ли не самой актуальной биомедицинской проблемой на сегодняшний день. Низкая эффективность лечения ряда опухолей, таких как трипленегативный метастазирующий рак молочной железы, рак панкреатодуоденальной зоны, мультиформная глиобластома и др. с использованием имеющегося арсенала методов терапии, требует поиска новых нетрадиционных подходов. Одним из таких подходов является применение онколитических вирусов (ОВ), обладающих способностью избирательно распознавать и уничтожать опухолевые клетки человека, а также индуцировать противоопухолевый иммунный ответ. Об актуальности разработки новых онколитических вирусов свидетельствует количество проводимых в мире

клинических исследований (КИ). Только в одном международном регистре *Clinicaltrials.gov* по состоянию на 1.06.2020 зарегистрировано 6 КИ I и II фазы испытаний онколитических вирусов при трипленегативном метастазирующем раке молочной железы и 19 КИ по лечению с помощью онколитических вирусов мультиформной глиобластомы.

Диссертационная работа Семеновой Анастасии Викторовны посвящена конструированию и изучению противоопухолевых свойств ряда рекомбинантных вариантов онколитических вирусов на основе вируса осповакцины. Этот вирус, кроме уникальных противоопухолевых свойств, обладает природной онкоселективностью и онколитической активностью в отношении широкого спектра опухолей человека. В связи с этим выбор объекта исследования в диссертационной работе представляется актуальным и обоснованным.

Работа включает конструирование шести рекомбинантных штаммов вируса осповакцины, два из которых представляют наибольшую ценность и могут рассматриваться в качестве прототипов лекарственных препаратов для терапии мультиформной глиобластомы и метастазирующего рака молочной железы. Лечение этих двух видов опухолей является чрезвычайно актуальным вследствие их наименьшей хирургической курабельности и роста заболеваемости в последнее десятилетие.

Научная новизна и практическая значимость результатов работы

Диссертантом сконструирован не имеющий аналогов двойной рекомбинантный вариант вируса осповакцины VV-GMCSF-Lact со встроенными генами ГМ-КСФ человека и пептида лактапина. Пептид лактапин является разработкой сибирских учёных из ИХБФМ СО РАН и сам по себе обладает хорошей противоопухолевой активностью. Диссертанту удалось суммировать противоопухолевые свойства вируса осповакцины и лактапина в едином конструкте и показать его эффективность не только в стандартной модели аллогенных ксенографтов, но также и для лекарственно устойчивых опухолей, причем как при внутриопухолевом, так и при системном введении.

На штамм VV-GMCSF-Lact в 2019 году получен патент РФ № 2604187. В этом же году в рамках программы «Фарма 2020» с участием диссертанта закончены полноразмерные доклинические исследования этого штамма как первого в России лекарственного средства для виротерапии злокачественных новообразований молочной железы.

Кроме лактапина автор использует ещё один онкотоксический белок NS1, который является главным фактором онколитической активности парвовируса крыс Н-1. Этот подход также оказался успешным и позволил диссертанту получить ещё один уникальный рекомбинантный штамм вируса осповакцины VV-NS1-dGF, нацеленный на лечение опухолей мозга человека. Штамм VV-NS1-

dGF также запатентован диссертантом с соавторами в России (Патент № 2692628).

Нужно отметить, что для получения рекомбинантов автором разработаны оригинальные конструкции интеграционных плазмид, которые позволяют проводить делеции генов вирулентности вируса осповакцины вместе с одновременной встройкой соответствующего трансгена. Удаление генов вирулентности необходимо для аттенуации вируса осповакцины, который является патогенным для человека и может вызывать осложнения при лечении пациентов с онкозаболеваниями.

Для оценки антиметастатического действия аттенуированных штаммов вируса осповакцины диссертантом предложена элегантная модель искусственного метастазирования, представляющая собой два удаленных ксенографта карциномы А-431, один из которых имитирует опухоль, а второй метастаз. С использованием этой модели на примере рекомбинанта российского штамма вируса осповакцины Л-ИВП с делециями двух генов вирулентности (ТК и VGF) и встройкой трансгена репортерного белка GFP показана высокая адресность накопления вируса в опухоли и метастазе, приводящая к их последующему разрушению.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Достоверность полученных в диссертации результатов, обоснованность научных положений, выводов и заключений не вызывает сомнений и основывается на продуманном дизайне исследования и использованной методической базы. Четко сформулированные задачи определили последовательность выполнения исследования и достижение поставленной цели: конструирование рекомбинантных вариантов аттенуированных штаммов вируса осповакцины, несущих трансгены репортерных, иммуностимулирующих и онкотоксических белков, и изучение их онколитических свойств с целью создания терапевтических противоопухолевых вакцин.

Работа проведена с использованием современных вирусологических, молекулярно-биологических и биохимических методов, трансляционных моделей и мощностей ЦКП «SPF-виварий». Используются корректные методы статистической обработки данных. Автором выполнен большой объем экспериментальной работы с использованием адекватных контролей. Хочется подчеркнуть, что для каждой серии экспериментов кроме целевых рекомбинантов автором был использован или сконструирован контрольный рекомбинантный вариант вируса, аналогичный по структуре, но не содержащий встройку трансгена. Так, например, для корректного сравнительного изучения онкотоксических свойств лактапина, экспрессированного в составе рекомбинантного штамма VV-GMCSF-Lact, автором сконструирован рекомбинантный вариант вируса VV-GMCSF-dGF, который, так же, как и

рекомбинант с лактаптином, содержал вставку трансгена ГМ-КСФ в районе делеции гена ТК вируса, но имел дополнительную делецию гена VGF без вставки трансгена лактаптина.

Все вышесказанное позволяет считать диссертационное исследование Семеновой А.В. соответствующим требованиям, предъявляемым к проведению научных исследований. Выводы диссертации хорошо обоснованы и подтверждены экспериментальным материалом. Результаты работы представлены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях, а также опубликованы в рецензируемых журналах из списка ВАК Минобрнауки России.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению

Представленная диссертация носит целостный и завершенный характер, построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Она изложена на 121 странице, включает 33 рисунка, 4 таблицы. Список литературы включает 226 источников.

Во введении изложена актуальность темы и степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна полученных результатов и практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту, апробация работы и личный вклад автора.

В обзоре литературы приведены последние данные о наиболее успешных онколитических вирусах, проходящих клинические испытания или уже разрешенных для лечения различных видов рака; описаны характеристика семейства поксвирусов и преимущества вируса осповакцины как онколитического агента; представлены и проанализированы современные стратегии модификации и конструирования рекомбинантных вирусов, разнообразие встраиваемых трансгенов. В заключении обзора обозначается место проведенного диссертантом исследования в контексте современного состояния проблемы.

В разделе «Материалы и методы» приводится характеристика примененных автором реактивов, материалов и методов исследования. В работе использовались методы ПЦР, молекулярного клонирования, секвенирования, культивирования клеток млекопитающих, Вестерн-блот анализа, биотитрования, трансфекции плазмидной ДНК, клонирования методом бляшек, градиентного центрифугирования, микроскопии, колориметрической оценки цитотоксической активности с реагентом ХТТ, проточной цитометрии, работы с лабораторными животными, включая иммунодефицитные модели и ксенотрансплантацию опухолевых клеток. Такой широкий набор методов свидетельствует о полноте,

всесторонности и объективности проведенных исследований, а также высоком уровне методической квалификации диссертанта.

Раздел «Результаты и обсуждение» включает три части. В первой части описано конструирование и сравнение противоопухолевых свойств двух рекомбинантных вариантов вируса осповакцины, несущих вставку трансгена NS1. Один из этих вариантов сконструирован на основе репликативно-компетентного штамма Л-ИБП, аттенуированного путём удаления гена вирусного ростового фактора, а второй – на основе высоко аттенуированного репликативно-дефектного штамма MVA. В результате такого сравнения для дальнейшего конструирования рекомбинантов был выбран литически более активный штамм Л-ИБП вируса осповакцины.

Во второй части проведена дополнительная аттенуация литически активного штамма Л-ИБП за счёт вставки трансгена GFP с одновременной делецией гена вирулентности вирусной тимидинкиназы. Введение репортерного трансгена позволило автору инструментально подтвердить адресное накопление аттенуированного штамма в клетках опухолевого узла и метастаза на модели искусственного метастазирования.

Третья часть работы посвящена конструированию и изучению противоопухолевых свойств двойного рекомбинантного штамма вируса осповакцины с делециями двух генов вирулентности и вставкой вместо них трансгенов ГМ-КСФ человека и онкотоксического белка лактапина.

В заключении обобщены результаты проведенных исследований и сделан прогностический анализ преимуществ полученного автором двойного рекомбинантного штамма по сравнению с наиболее близким к нему американским препаратом Pexa-Ves, разрешенным FDA для лечения гепатокарциномы.

Выводы обоснованы данными экспериментальных исследований, последовательно и логично сформулированы.

Список литературы сформирован по порядку цитирования статей в тексте диссертации, поэтому русскоязычные и англоязычные источники не сгруппированы, как это обычно делается.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе А.В. Семёновой нет.

Замечания по оформлению диссертации

1. В работе подробно описаны методы аттенуации вируса осповакцины, однако недостаточно обосновано, для чего вообще нужна аттенуация и какие осложнения может вызвать использование природных неаттенуированных штаммов вируса.

2. Очень кратко описана структура интеграционных плазмид, не приведены результаты секвенирования ни в виде приложений к диссертации, ни в виде ссылок на номера в базе данных GenBank.
3. Оценка онколитической активности рекомбинантных штаммов проведена только на immortalized клеточных линиях опухолей человека. Хотя автор использует достаточно широкий набор таких линий, желательно было бы включить в этот набор первичные культуры клеток опухолей, которые на начальных этапах культивирования более точно моделируют опухоли человека. Особенно данное замечание касается линии глиобластомы U87MG, молекулярный профиль которой драматически изменился после immortalization и сильно отличается в различных лабораториях, в зависимости от количества пассажей. Проведение экспериментов *in vivo* с ортотопическими ксенографтами первичной глиобластомы должно быть следующим этапом на пути клинического внедрения полученных диссертантом уникальных рекомбинантных штаммов вирусов осповакцины.
4. Результаты эксперимента по терапии с помощью рекомбинантных штаммов VV-NS1-dGF и MVA-NS1 мышей SCID с ортотопическими ксенографтами глиобластомы U87MG, представленные на рис. 15 диссертации не подтверждены МРТ изображениями. Не указана эффективность приживления ксенографтов в эксперименте, который проводил диссертант в SPF-виварии ИЦиГ СО РАН.

Сделанные замечания не снижают общей научной и практической значимости диссертационного исследования.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации Семеновой А.В. отражает ее основное содержание, включает все основные разделы, текст четко структурирован, результаты проведенных исследований хорошо проиллюстрированы.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

По теме диссертации опубликовано 4 работы, из них 3 – в научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки для опубликования результатов диссертационных работ. Одна статья опубликована в высокорейтинговом журнале *Oncotarget* из списка Q1. Получены 2 патента РФ. Материалы диссертации были также представлены на всероссийских и международных конференциях, по итогам которых опубликовано 11 тезисов. Публикации автора полностью отражают основные результаты проведенных исследований.

**Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным
Положением о порядке присуждения ученых степеней**

Диссертационная работа Семеновой Анастасии Викторовны «Конструирование и изучение противоопухолевых свойств рекомбинантных вариантов вируса осповакцины, экспрессирующих трансгены репортерных, иммуностимулирующих и онкотоксических белков», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой представлено решение задачи по созданию новых онколитических вариантов вируса осповакцины, обладающих высоким противоопухолевым и антиметастатическим потенциалом.

По актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов работа полностью соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. №842, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Отзыв на диссертационную работу Семеновой Анастасии Викторовны рассмотрен и утвержден на заседании Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России», протокол №50у от 01.06.2020.

Отзыв составил:

Заместитель генерального директора
по научной работе и медицинским технологиям
ФГБУ ФНКЦ ФМБА России,
доктор медицинских наук



В.П. Баклаушев

Подпись д.м.н. В.П. Баклаушева удостоверяю:

Заместитель исполнительного директора
ФГБУ ФНКЦ ФМБА России по персоналу



Т.М. Ильнина

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России» (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России)
115682, Москва, Ореховый бульвар, 28
Телефон: +7495 395 6207; Факс: +7495 395 6430; e-mail: info@fnkc-fmba.ru.