

*На правах рукописи*



**РЯПОЛОВА АНАСТАСИЯ ВЛАДИМИРОВНА**

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА  
ВЕЗИКУЛЯРНОГО СТОМАТИТА, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО КОМБИНАЦИЮ  
ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ**

1.5.3. Молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Федеральная территория «Сириус» – 2026

Работа была выполнена в научном центре трансляционной медицины автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Научно-технологический университет «Сириус»

**Научный руководитель:** Минская Екатерина Сергеевна,  
PhD

Защита состоится 23 мая 2026 г. в 9:00 на заседании диссертационного совета НТУ.1.5.3.07 в АНОО ВО «Университет «Сириус» по адресу 354340, Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», Олимпийский пр., д.1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте АНОО ВО «Университет «Сириус» <https://siriusuniversity.ru/sveden/science/obyavleniya-o-zashchitakh>

Автореферат разослан “22” апреля 2026 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



Колмыков С. К.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы исследования**

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности в развитых странах. Внедрение в клиническую практику методов иммунотерапии позволило значительно увеличить эффективность лечения ряда онкологических заболеваний. Первые препараты этого класса, моноклональные антитела против антигенов PD-1/PD-L1 и CTLA-4, позволяют достичь длительных ответов на терапию у 20-40% пациентов с метастатической меланомой, раком легкого и другими метастатическими опухолями. Впервые удалось достичь контроля над заболеванием, а в ряде случаев полного исчезновения опухолевых очагов у столь значительного числа больных, ранее считавшихся неизлечимыми.

Однако существующие методы иммунотерапии эффективны лишь при определенных разновидностях злокачественных опухолей, составляющих примерно треть от всех случаев онкологических заболеваний. И даже при этих разновидностях онкологических заболеваний ответ на терапию развивается примерно у трети пациентов. Основные причины отсутствия эффективности иммунотерапии – недостаточная иммуногенность опухолевых клеток, слабое проникновение иммунокомпетентных клеток в иммуносупрессивное опухолевое микроокружение (tumor microenvironment, TME). Для преодоления устойчивости к иммунотерапии необходим запуск локальной воспалительной реакции в ткани опухоли в сочетании с активным подавлением механизмов опухоль-индуцированной иммуносупрессии.

Онколитические вирусы (ОВ) – это новый класс лекарственных средств на основе вирусов, способных специфично размножаться в опухолевых клетках, уничтожать их и активировать иммунную систему пациента, не поражая при этом здоровые клетки человека. Модифицированные для экспрессии иммуностимулирующих молекул ОВ являются потенциальным решением проблемы малой эффективности существующих методов иммунотерапии. В настоящее время ведется разработка различных ОВ. Первый зарегистрированный препарат в этом классе (Imlygic™, США) был одобрен в США в 2015 году, однако его эффективность невысока в силу того, что механизм действия ограничен экспрессией одного цитокина гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) и прямым цитолитическим действием. При этом большинство исследователей отмечают крайне высокий уровень безопасности терапии ОВ.

### **Степень разработанности темы**

К середине XX века было накоплено достаточно сведений, согласно которым некоторые вирусы могут разрушать опухоли, не причиняя чрезмерного вреда пациенту. Регрессию опухоли,

опосредованную вирусом, чаще всего наблюдали, когда пациенты имели ослабленную иммунную систему, но такие ремиссии, как правило, были кратковременными и неполными.

Эти и другие предпосылки привели к появлению концепции терапии ОВ и серии связанных исследований. В 1950-х и 1970-х годах было проведено множество клинических испытаний с использованием природных вирусов для лечения опухолей, но из-за невозможности на тот момент ограничить патогенность вирусов изучение ОВ было замедлено. Только в 1980-х годах появление новых методов генной инженерии сделало возможным модификацию геномов вирусов, после чего появились аттенуированные, безопасные и высокоселективные вирусы. Однако на сегодняшний день только 5 препаратов ОВ были одобрены к терапевтическому применению.

По сравнению с другими видами иммунотерапии опухолей, ОВ имеют ряд преимуществ, таких как высокая эффективность уничтожения раковых клеток, меньшее количество побочных эффектов и сравнительно низкая стоимость производства и хранения препаратов. Все это делает онколитическую виротерапию перспективной стратегией для борьбы с раком по сравнению хирургическими вмешательствами, химиолучевой терапией и таргетной терапией.

В настоящее время в России основной объем исследований по поиску эффективного ОВ осуществляется отдельными научными коллективами, при этом потенциал темы остается огромным.

### **Цель и задачи исследования**

Целью данной работы является оценка противоопухолевой эффективности рекомбинантного вируса везикулярного стоматита (Vesicular stomatitis virus, VSV), кодирующего комбинацию иммуностимулирующих факторов, для создания нового генотерапевтического препарата.

Для ее достижения были сформулированы следующие задачи:

1. Сконструировать рекомбинантный вариант VSV (recombinant VSV, rVSV), экспрессирующий слитую иммуностимулирующую молекулу mIL12-mGMCSF с последующей проверкой *in vitro*;
2. Проанализировать онколитическую активность rVSV-mIL12-mGMCSF в сравнении с rVSV-GFP на панели мышинных опухолевых клеток разного происхождения;
3. Оценить противоопухолевую эффективность rVSV-mIL12-mGMCSF и rVSV-GFP *in vivo* в сингенных моделях;
4. Исследовать влияние rVSV-mIL12-mGMCSF на TME в сравнении с rVSV-GFP.

### **Объект исследования**

Объектами данного исследования были варианты rVSV, созданные методами обратной генетики.

### **Предмет исследования**

Предметом исследования был способ эффективной терапии онкологических заболеваний путем создания rVSV, кодирующего комбинацию иммуностимулирующих факторов.

### **Научная новизна**

В рамках работы с применением методов обратной генетики был создан rVSV, кодирующий комбинацию иммуностимулирующих факторов в формате слитого белка. Функциональная активность каждого из трансгенов была подтверждена *in vitro*. Изучение терапевтических эффектов такого ОБ потенциально позволяет создать новый лекарственный препарат для иммунотерапии опухолей.

В данной работе показано, что rVSV, кодирующий комбинацию иммуностимулирующих факторов, обладает онколитической активностью против различных ноозоологий рака мыши *in vitro*. Терапевтический эффект был подтвержден на сингенных моделях меланомы B16-F10 и рака толстой кишки CT26.WT *in vivo*. Установлено, что способность к подавлению роста опухоли преимущественно осуществляется за счет прямого онколиза. Помимо этого, показано, что терапия rVSV приводит к снижению количества M2-подобных макрофагов в опухолевом узле.

### **Теоретическая и практическая значимость**

В рамках работы дополнены современные представления о терапевтической эффективности ОБ, в частности нового варианта VSV, кодирующего комбинацию иммуностимулирующих факторов. Полученный ОБ может быть использован для разработки таргетных лекарственных препаратов против онкозаболеваний. Слитая молекула иммуностимулирующих факторов, закодированная в геноме VSV, способна привлекать иммунные клетки в иммуносупрессированную среду опухоли при внутриопухолевой инъекции, что повышает эффективность терапии. Кроме того, дальнейшее изучение механизма действия этого ОБ позволит грамотно подобрать подходы для комбинированной иммунотерапии, эффективность которой предполагается еще выше.

Результаты получены при финансовой поддержке исследования, реализуемого в рамках государственной программы федеральной территории «Сириус» «Научно-технологическое развитие федеральной территории «Сириус» (Соглашение №18-03 от 10 сентября 2024 г.).

### **Методология и методы исследования**

Методология исследования включала создание rVSV путем обратной генетики, его верификацию *in vitro* и апробацию терапевтической эффективности *in vivo*.

Получение необходимых генетических конструкций, культивирование эукариотических клеток, трансфекция и трансдукция осуществлялись стандартными методами генной и клеточной инженерии.

Верификация полученного в работе rVSV проводилась с применением комплекса физико-биологических методов, включающих электронную микроскопию, титрование методом TCID50, вестерн блоттинг, проточную цитометрию, ИФА.

Терапевтическая активность rVSV была апробирована на животных моделях *in vivo*.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Впервые создан рекомбинантный вариант вируса везикулярного стоматита (rVSV-mIL12-mGMCSF), кодирующий комбинацию иммуностимулирующих факторов IL12 и GMCSF мыши в формате слитого белка, который обладает противоопухолевым потенциалом в сингенных моделях меланомы B16-F10 и рака толстой кишки CT26.WT.

2. Способность к замедлению роста опухоли зависит от прямой онколитической способности рекомбинантного вируса и способности иммуностимулирующих факторов IL12 и GMCSF, закодированных в геноме вируса, влиять на иммунные клетки в иммуносупрессированной среде опухоли.

#### **Степень достоверности**

Степень достоверности обеспечивается статистически значимым объемом экспериментальных данных и их воспроизводимостью в серии независимых экспериментов. Все проведенные исследования были направлены на достижение поставленных задач. Дополнительным подтверждением валидности результатов служит их апробация в виде публикаций в ведущих рецензируемых отечественных и международных изданиях, индексируемых в таких базах данных, как Scopus и Web of Science.

#### **Апробация работы**

Основные научные результаты диссертации опубликованы в 4 печатных работах, в рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science.

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 123 страницах, построена по следующему плану: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты, обсуждение, выводы, приложение. Библиографический список включает 312 источник. Работа проиллюстрирована 35 рисунками и содержит 17 таблиц.

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Во введении** обоснована актуальность выбранной темы, проанализирована степень изученности проблемы, сформулированы цель и конкретные задачи исследования. Также представлены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, изложены основные положения, выносимые на защиту, и приведены сведения об апробации результатов и их достоверности.

**Первая глава** кратко описывает биологию опухолей, онколитические вирусы, их особенности. Особое внимание вирусу везикулярного стоматита (VSV) и модификациях, позволяющих сделать VSV более эффективным противораковым агентом. Отдельно рассматриваются подходы комбинированной терапии и клинические исследования с использованием VSV.

**Во второй главе** представлена методология экспериментального исследования по созданию рекомбинантного VSV и изучению его противоопухолевых свойств *in vitro* и *in vivo*. В данной работе дизайн и сборка генетических конструкций были выполнены в соответствии с классическими методами генетической инженерии, получение VSV и его характеристика осуществлялись комплексом методов (трансфекция, трансдукция, электронная микроскопия, проточная цитометрия, кПЦР). Охарактеризованные вирусные препараты были апробированы в экспериментах на лабораторных животных.

**Третья глава** описывает результаты экспериментальных исследований рекомбинантных вариантов VSV, их терапевтические свойства и потенциальный механизм их действия на активацию иммунной системы опухоли.

**В параграфе 3.1.** описывается сравнительный анализ двух вариантов рекомбинантного VSV (rVSV) с вариантом дикого типа М белка (wtM) и с делецией метионина в положении 51 (dM51), которая нарушает взаимодействие с комплексом Rae1-Nup98 и снижает способность вируса подавлять иммунный ответ. На трех линиях мышинных опухолевых клеток (B16-F10, LL/2, SCC VII) показано, что через 24 часа после инфицирования wtM-версия обладает более высокой репликативной активностью, за исключением клеток SCC VII (Рисунок 1). К 48 часам различия сглаживаются из-за масштабного лизиса клеток, а статистический анализ подтверждает значимость наблюдаемых различий между двумя вариантами. Несмотря на то, что вирус с мутацией dM51 в целом демонстрирует более низкий репликационный потенциал, именно он был выбран для дальнейшего применения на основании данных клинических исследований, указывающих на его большую безопасность в качестве терапевтического агента.

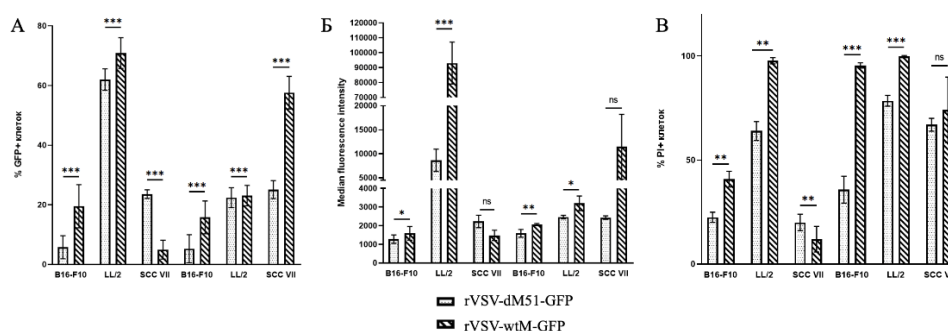


Рисунок 1 – Анализ клеток B16-F10, LL/2 и SCC VII методом проточной цитометрии через 24 и 48 часов после заражения rVSV-dM51-GFP и rVSV-wtM-GFP. Количество GFP+ клеток (A), значения MFI (Б) и количество PI+ клеток (В). (\*)  $p$ -value <0.05, (\*\*)  $p$ -value <0.01, (\*\*\*)  $p$ -value <0.001, (\*\*\*\*)  $p$ -value <0.0001, not significant (ns) –  $p$ -value >0.05.

По результатам сравнения двух версий rVSV (wtM и dM51) на трех линиях опухолевых клеток подтвердилась гипотеза о снижении репликационного потенциала у rVSV-dM51-GFP, несущего делецию метионина в М белке. Однако на основании опыта клинических исследований было принято решение о последующем использовании только вирусов с мутацией в М белке, т.к. они считаются более безопасными в качестве терапевтических агентов.

**В параграфе 3.2.** приведены последовательности генов белков мыши mIL12 и mGMCSF и описывается сборка генетической конструкции, кодирующей слитый вариант этих иммуностимулирующих факторов. Генетическая карта конструкции представлена на Рисунке 2.



Рисунок 2 – Карта генетической конструкции, кодирующей ген слитого белка mIL12-mGMCSF.

**В параграфе 3.3.** представлен предполагаемый механизм действия и расположение трансгена в геноме rVSV-mIL12-mGMCSF (Рисунок 3). Также описываются результаты котрансфекции клеток НЕК293ТN плазмидами, необходимыми для получения вируса, и приведена фотография, полученная методом электронной микроскопии, алиquotы полученного вирусного препарата через 72 часа культивирования ВНК-21 после трансдукции (Рисунок 4).

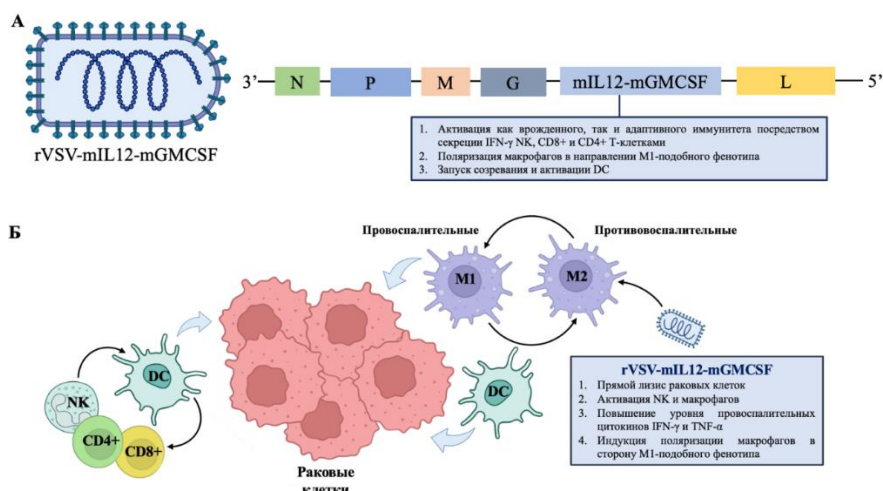


Рисунок 3 – Расположение трансгена (А) в геноме получаемого rVSV-mIL12-mGMCSF и потенциальный механизм действия (Б).

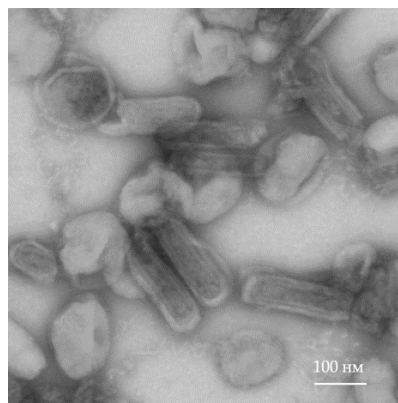


Рисунок 4 – Морфологическая характеристика полученного препарата rVSV-mIL12-mGMCSF методом электронной микроскопии.

Дополнительное подтверждение принадлежности полученного рекомбинантного вируса к роду *Vesiculovirus* было проведено вестерн блоттингом с антителами к G белку VSV (Рисунок 5).

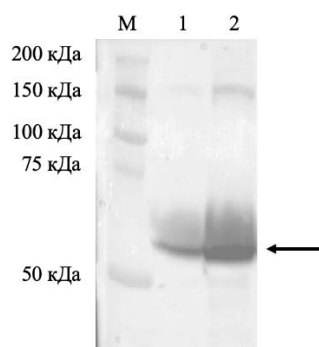


Рисунок 5 – Вестерн блоттинг с антителами к G белку VSV. М – маркер молекулярного веса, супернатанты клеток, инфицированные: 1 – rVSV-GFP, 2 – rVSV-mIL12-mGMCSF. Стрелкой отмечен бенд G белка VSV (67 кДа).

**В параграфе 3.4.** проводится определение функциональной активности mIL12 и mGMCSF, закодированных в формате слитой молекулы в геноме rVSV-mIL12-mGMCSF. Эксперимент на репортерной клеточной линии НЕК-Blue™ IL-12 с клеточными супернатантами ВНК-21 после вирусного заражения подтвердил активность mIL12 (Рисунок 6).

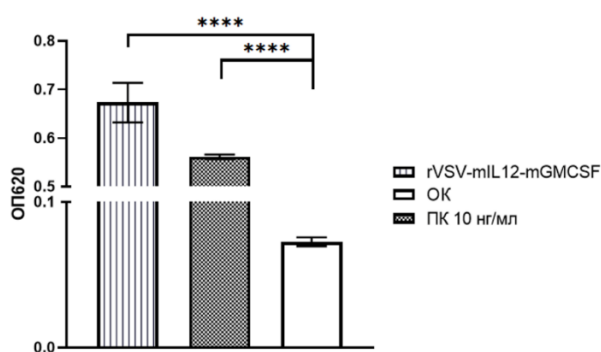


Рисунок 6 – Анализ функциональной активности mIL-12 на репортерной клеточной линии НЕК-Blue™ IL-12. ОП620 – оптическая плотность при 620 нм, ОК – отрицательный контроль, ПК – положительный контроль. (\*)  $p$ -value <0.05, (\*\*)  $p$ -value <0.01, (\*\*\*)  $p$ -value <0.001, (\*\*\*\*)  $p$ -value <0.0001, not significant (ns) –  $p$ -value >0.05.

Оценка связывания mGMCSF, закодированного в формате слитой молекулы в геноме rVSV-mIL12-mGMCSF, проводилась методом ИФА кондиционированной культуральной жидкости ВНК-21. Результаты подтвердили связывание mGMCSF из кондиционированной rVSV-mIL12-mGMCSF культуральной жидкости (Рисунок 7).

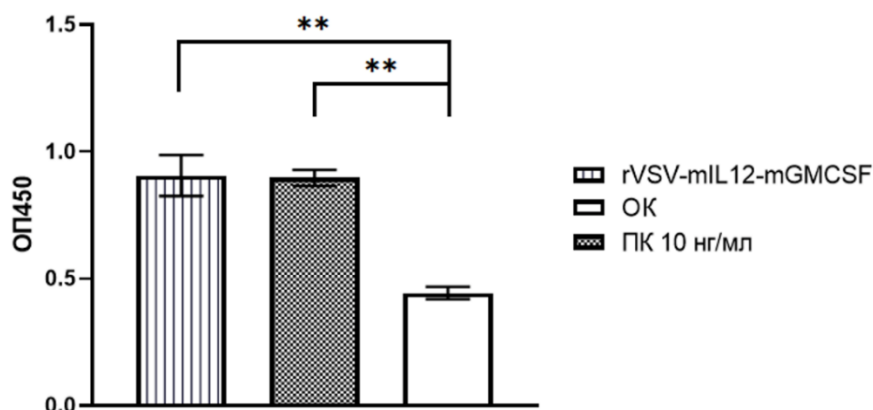


Рисунок 7 – Анализ связывания mGMCSF методом ИФА. ОП450 – оптическая плотность при 450 нм, ОК – отрицательный контроль, ПК – положительный контроль. (\*)  $p$ -value <0.05, (\*\*)  $p$ -value <0.01, (\*\*\*)  $p$ -value <0.001, (\*\*\*\*)  $p$ -value <0.0001, not significant (ns) –  $p$ -value >0.05.

**В параграфе 3.5.** представлено описание анализа кинетики репликации rVSV-GFP на двух линиях мышинных опухолевых клеток (B16-F10 и LL/2) с использованием прибора прижизненной визуализации IncuCyte S3 (Sartorius, Германия). Выявлена четкая дозозависимость: чем выше исходная доза вируса ( $1 \times 10^7$  TCID50), тем раньше регистрируется первый пик флуоресценции, свидетельствующий о проникновении и репликации rVSV-GFP. Отмечаются различия в чувствительности клеток линии LL/2 и B16-F10 (Рисунок 8 и 9).

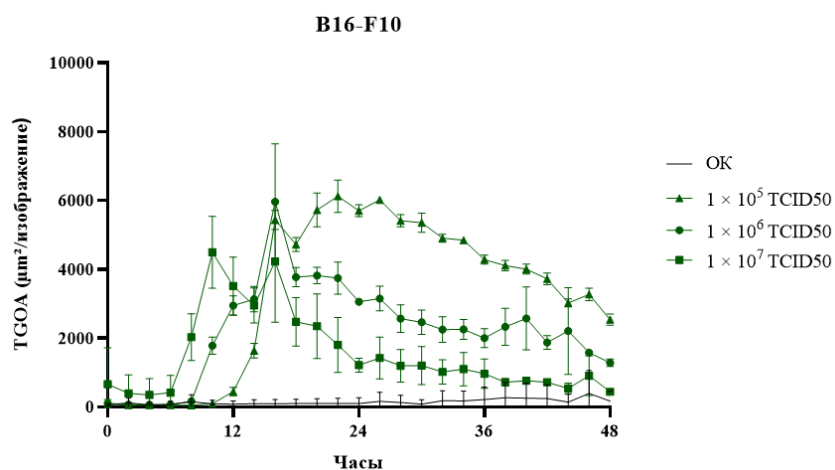


Рисунок 8 – Прижизненная визуализация клеток B16-F10 после заражения rVSV-GFP в разных дозах TCID50. TGOA – total green object area, ОК – отрицательный контроль.

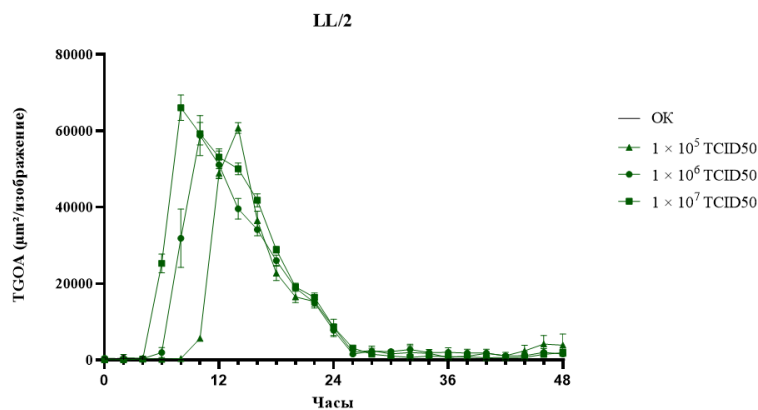


Рисунок 9 – Прижизненная визуализация клеток LL/2 после заражения rVSV-GFP в разных дозах TCID50. TGOA – total green object area, ОК – отрицательный контроль.

Примечательно, что при заражении клеток линии LL/2 наблюдалась более ускоренная кинетика развития вирусной инфекции по сравнению с B16-F10: пик флуоресценции и ее интенсивность регистрировались на 4-6 часов раньше при соответствующих дозах, что указывает на изначально более высокую чувствительность клеток данной линии к заражению VSV. Последующее снижение уровня флуоресценции после достижения пика (24 часа для B16-F10 и 16 часов для LL/2), вероятно, обусловлено вирус-индуцированным онколизом, приводящим к гибели зараженных клеток, что сопровождается потерей флуоресцентного сигнала.

**В параграфе 3.6.** представлен анализ экспрессии ряда генов в двух линиях раковых клеток (B16-F10 и LL/2) для объяснения их различной чувствительности к онколизу, опосредованному rVSV-GFP (Рисунок 10). Методом количественной ПЦР через 12 часов после заражения установлено, что клетки B16-F10, более устойчивые к вирусному онколизу, характеризуются низкой экспрессией *IFN-β1*, но высокой экспрессией *RIG-I* и *IFIT1*, что указывает на дисфункцию сигнального каскада между распознаванием вируса и выработкой интерферона. В свою очередь, более чувствительные клетки LL/2 демонстрируют высокий уровень *IFN-β1* при низких уровнях *RIG-I* и *IFIT1*, что свидетельствует о неэффективном обнаружении вируса и подавленном противовирусном ответе. Экспрессия проапоптотического *p53* оказалась выше в клетках LL/2.

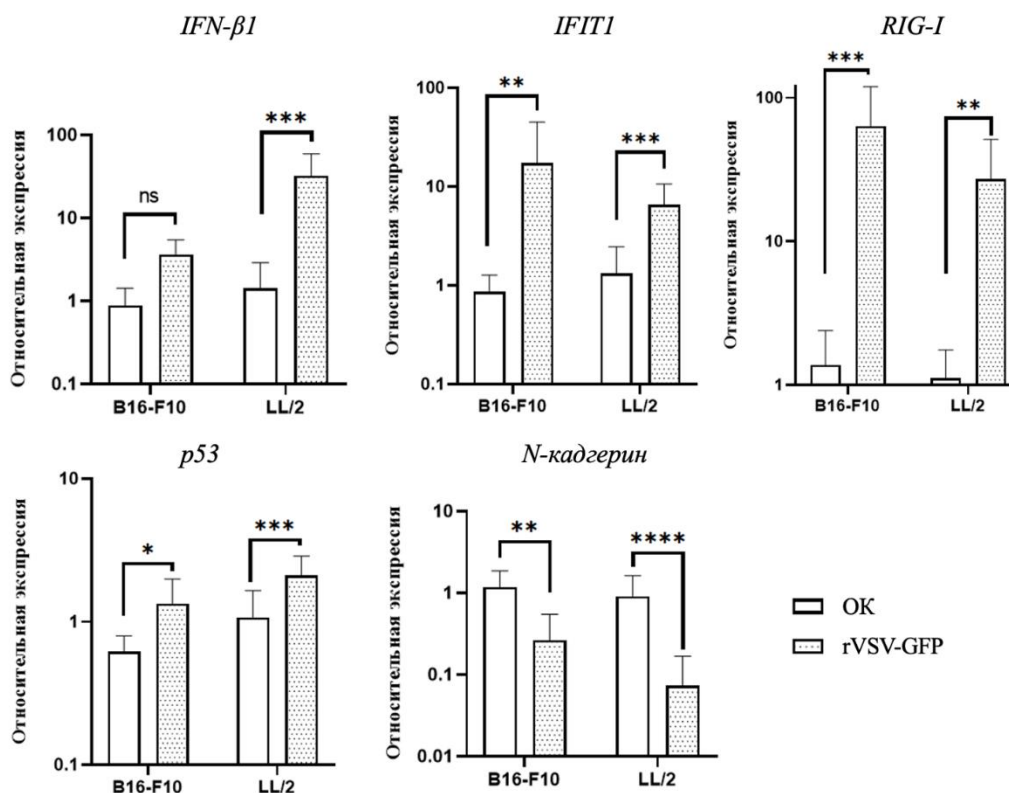


Рисунок 10 – Анализ методом кПЦР клеток B16-F10 и LL/2, инфицированных rVSV-GFP, через 12 часов после заражения. ОК – отрицательный контроль. (\*)  $p$ -value <0.05, (\*\*)  $p$ -value <0.01, (\*\*\*)  $p$ -value <0.001, (\*\*\*\*)  $p$ -value <0.0001, not significant (ns) –  $p$ -value >0.05.

Важно выделить несколько факторов, которые могут повлиять на интерпретацию полученных результатов: выбранный момент времени (12 часов), тот факт, что уровни мРНК часто напрямую не коррелируют с уровнями и активностью белка, и/или условиями эксперимента *in vitro*, которые не отражают достоверно взаимодействие вируса с раковыми клетками и иммунными клетками в пределах ТМЕ в течение терапии *in vivo*.

**В параграфе 3.7.** проведено сравнение онколитической активности rVSV-GFP и rVSV-mIL12-mGMCSF на пяти линиях мышинных опухолевых клеток (B16-F10, LL/2, SCC VII, H22, CT26.WT) и на мезенхимальных стволовых клетках мыши (mMSC) *in vitro*. В экспериментах rVSV-GFP показал более выраженный онколитический эффект, чем rVSV-mIL12-mGMCSF, однако чувствительность различных линий к вирусам существенно варьировала (Рисунок 11). Наиболее эффективный лизис наблюдался в клетках гепатомы H22 и рака толстой кишки CT26.WT, тогда как клетки меланомы B16-F10 и плоскоклеточной карциномы SCC VII оказались менее чувствительными.

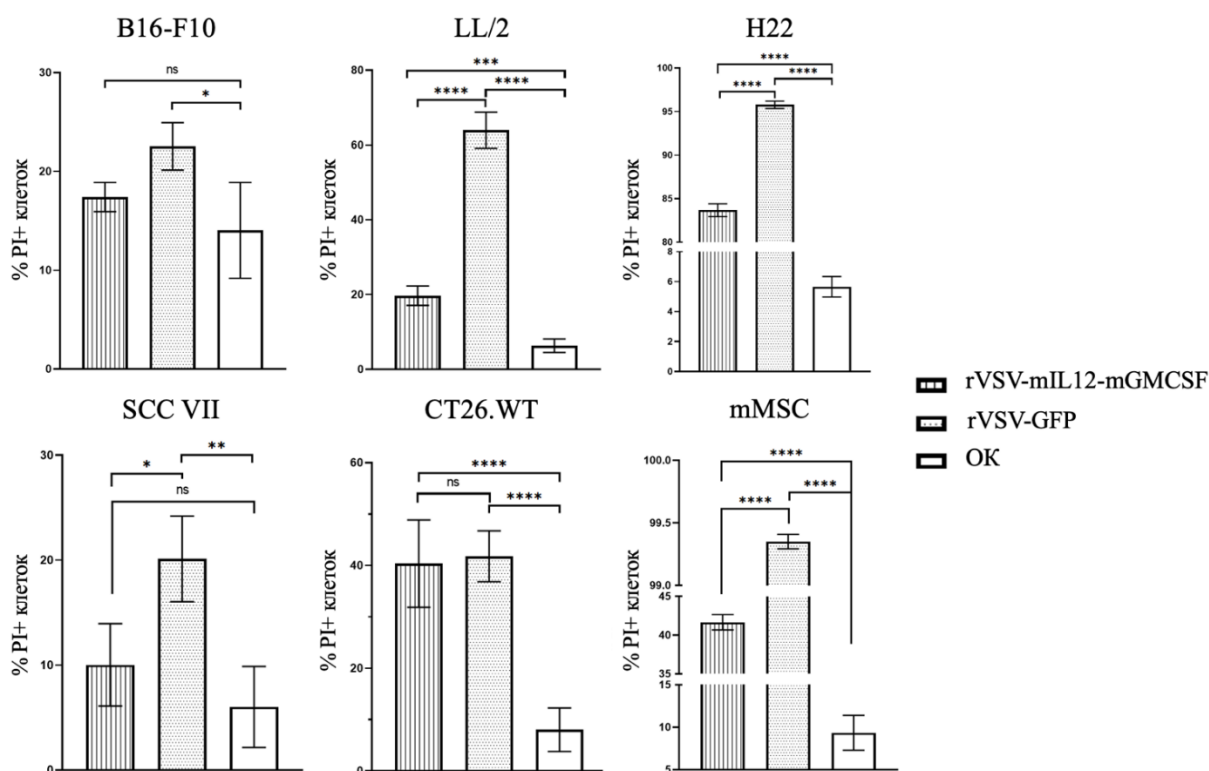


Рисунок 11 – Онколитическая активность rVSV-mIL12-mGMCSF и rVSV-GFP в опухолевых клетках различного происхождения и в MSC мыши через 24 часа после заражения. ОК – отрицательный контроль. (\*)  $p$ -value <0.05, (\*\*)  $p$ -value <0.01, (\*\*\*)  $p$ -value <0.001, (\*\*\*\*)  $p$ -value <0.0001, not significant (ns) –  $p$ -value >0.05.

Успешное проникновение вируса зависит от набора рецепторов. Согласно опубликованным исследованиям, LDLR служит основной точкой входа для VSV, а широко распространенная экспрессия этих рецепторов объясняет пантропизм VSV. VSV, как и некоторые другие оболочечные вирусы, также взаимодействует с EGFR, облегчая проникновение и размножение вируса. Как было ранее продемонстрировано, уровень экспрессии EGFR в клетках LL/2 значительно выше, чем в клетках B16-F10, что может объяснить их разницу в восприимчивости к онколизу на основе VSV.

**В параграфе 3.8.** описывается экспериментальная проверка противоопухолевой активности рекомбинантного вируса везикулярного стоматита (rVSV-GFP) на мышинной модели меланомы B16-F10. Результаты показали, что лечение замедляло рост опухоли (индекс торможения роста до 52,5%) и статистически значимо увеличивало продолжительность жизни животных в группе с высокой дозой. Дополнительно с помощью конфокальной микроскопии было подтверждено, что вирус сохранялся в злокачественных клетках более 20 дней после инъекции. Полученные результаты указывают на потенциал rVSV не только как непосредственного ОБ, но и как возможной платформы для длительной экспрессии терапевтических генов в ТМЕ.

**В параграфе 3.9.** уделяется внимание второму этапу эксперимента, направленного на сравнение терапевтической эффективности rVSV-GFP и rVSV-mIL12-mGMCSF на сингенной модели меланомы B16-F10. Оба вируса показали частичное подавление роста опухоли по сравнению с плацебо, но в группе, получающей лечение rVSV-mIL12-mGMCSF, индекс ТРО сохранял статистическую значимость дольше, а выживаемость животных была выше.

**В параграфе 3.10.** описывается сравнение противоопухолевой активности rVSV-GFP и rVSV-mIL12-mGMCSF на сингенной модели рака толстой кишки CT26.WT, которая считается более подходящей для оценки иммунотерапии благодаря менее агрессивному росту опухоли. Результаты показали, что терапия rVSV-mIL12-mGMCSF обеспечивает более длительное и статистически значимое торможение роста опухоли по сравнению с контролем, а также более высокую выживаемость (Рисунок 12).

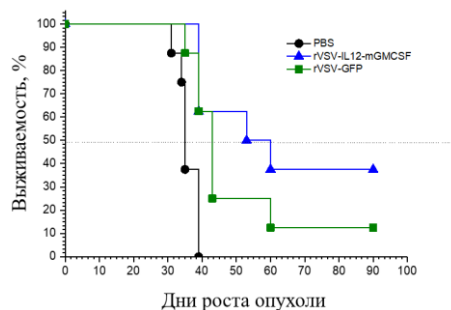


Рисунок 12 – Анализ выживаемости животных с CT26.WT-индуцированной опухолью.

Дополнительный эксперимент, выполненный для последующего иммунологического фенотипирования, подтвердил устойчивое снижение объема опухоли только в группе с rVSV-mIL12-mGMCSF, тогда как эффект rVSV-GFP был менее выражен и кратковременным (Рисунок 13).

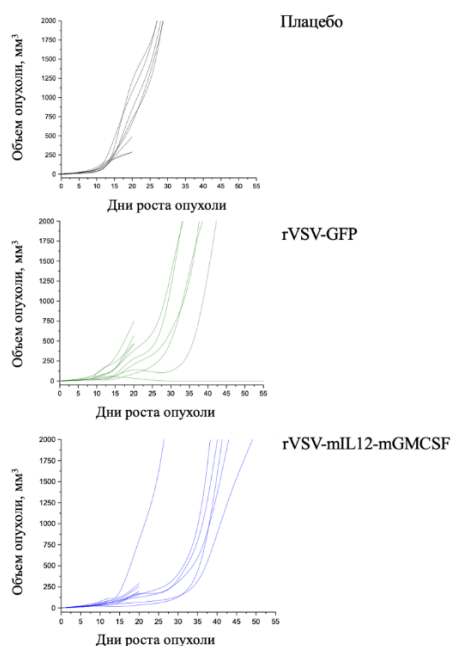


Рисунок 13 – Динамика индивидуальных кривых роста CT26.WT-индуцированной в группах экспериментальных животных.

**В параграфе 3.11.** представлены результаты оценки влияния терапии на основе rVSV на локальный иммунный ответ в модели рака толстой кишки CT26.WT. Не было выявлено статистически значимых различий между группами экспериментальных животных в общем количестве лейкоцитов (CD45+) (Рисунок 14), а также в содержании CD4+ и CD8+ Т-клеток.

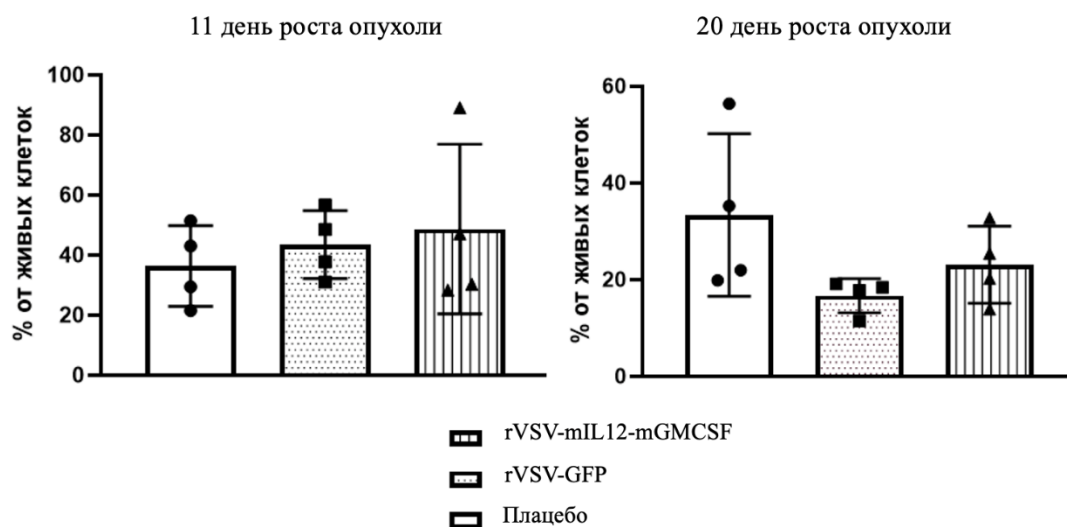


Рисунок 14 – Анализ количества CD45+ клеток, инфильтрирующих опухоль, на 11 и 20 дни роста опухоли у животных экспериментальных групп.

Наиболее значимые изменения наблюдались в миелоидном компартменте: к 20-му дню под воздействием препаратов rVSV-GFP и rVSV-mIL12-mGMCSF происходило снижение содержания M2-подобных макрофагов (F4/80+CD206+), тогда как количество M1-подобных макрофагов не менялось (Рисунок 15).

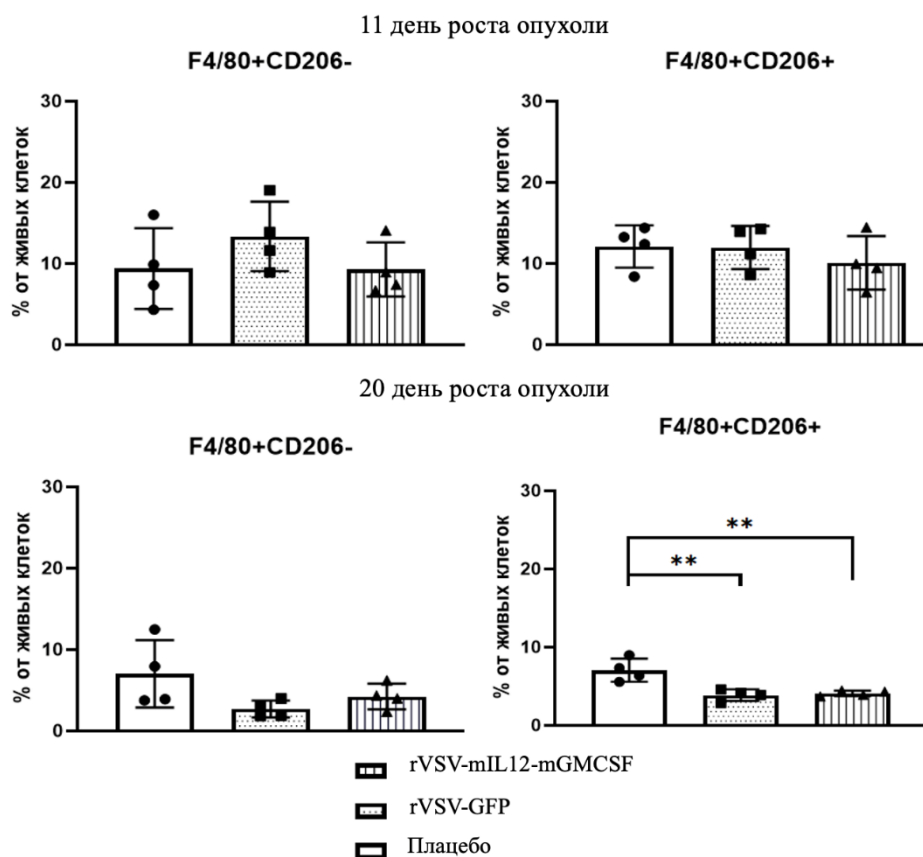


Рисунок 15 – Анализ количества F4/80+CD206- и F4/80+CD206+ клеток, инфильтрирующих опухоль, на 11 и 20 дни роста опухоли у животных экспериментальных групп. (\*) p-value <0.05, (\*\*) p-value <0.01, (\*\*\*) p-value <0.001, (\*\*\*\*) p-value <0.0001, not significant (ns) – p-value >0.05.

Полученные данные демонстрируют, что терапия на основе rVSV оказывает избирательное влияние на инфильтрацию опухоли клетками иммунной системы. Отсутствие разницы в общей численности лейкоцитов и среди основных субпопуляций Т-клеток, по-видимому, связано с тем, что на данном этапе развития опухоли не происходит активного привлечения лимфоцитов из циркулирующих иммунных клеток. Повышенная инфильтрация опухолей активированными моноцитами под влиянием rVSV на 11 день с последующим снижением содержания зрелых активированных дендритных клеток с высоким миграционным потенциалом на 20 день, по-видимому, отражает динамику развития адаптивного иммунного ответа.

В совокупности полученные данные свидетельствуют о способности rVSV-терапии перестраивать иммунный ландшафт опухоли в сторону ослабления иммуносупрессии, что обосновывает перспективность использования rVSV-векторов не только как онколитических агентов, но и как модуляторов противоопухолевого иммунитета.

**В обсуждении** рассматривается создание безопасных и эффективных ОБ на основе VSV, их модификация, различия в чувствительности клеток и молекулярные механизмы этих

различий, результаты доклинических испытаний на сингенных и необходимость дальнейшей оптимизации используемой терапии в комбинации с другими видами лечения.

**В заключении** обобщаются результаты выполненных экспериментов, а также отмечается основные ограничения диссертационного исследования.

### **Выводы**

1. С помощью методов обратной генетики был получен новый рекомбинантный вирус rVSV-mIL12-mGMCSF, кодирующий слитую молекулу mIL12-mGMCSF, где функциональная активность обоих компонентов иммуностимулирующей молекулы подтверждена *in vitro*.
2. rVSV-mIL12-mGMCSF проявлял меньшую онколитическую активность, чем rVSV-GFP *in vitro*, при этом наиболее перmissive к вирусному заражению были клетки гепатомы мыши H22, тогда как клетки плоскоклеточной карциномы SCC VII оставались наименее чувствительными.
3. rVSV-mIL12-mGMCSF на сингенных моделях B16-F10 и CT26.WT обладал более высоким противоопухолевым действием в сравнении с rVSV-GFP, однако статистически значимых различий в размерах опухолей и выживаемости животных между группами, получавшими rVSV не было.
4. По результатам фенотипирования иммунных клеток опухолей, индуцированных приживлением клеток CT26.WT, не обнаружено статистически значимых различий в представленности субпопуляций у животных, получавших rVSV-mIL12-mGMCSF или rVSV-GFP, при этом в экспериментальных группах наблюдалось понижение количества иммуносупрессивных M2-подобных макрофагов (F4/80+CD206+).

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Ryapolova A.** et al. Development of recombinant oncolytic rVSV-mIL12-mGMCSF for cancer immunotherapy // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 25. – №. 1. – С. 211.
2. Zinovieva M., **Ryapolova A.** et al. Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus: Optimisation Strategies for Anti-Cancer Therapies // Frontiers in Bioscience-Landmark. – 2024. – Т. 29. – №. 11. – С. 374.
3. **Ryapolova A.** et al. Recombinant Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus Expressing Mouse Interleukin-12 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (rVSV-dM51-mIL12-mGMCSF) for Immunotherapy of Lung Carcinoma // International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Т. 26. – №. 17. – С. 8567.
4. **Ryapolova A.** et al. Enhanced Antitumor Effect of Oncolytic Virotherapy Combined with mRNA-Encoded Immunoadjuvants in Colorectal Carcinoma (CT26) Tumor Model // Applied Biosciences. – 2025. – Т. 5. – №. 1. – С. 1.