

## Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу

Пыхтиной Марии Борисовны «Аполипопротеин AI-содержащие химерные полипептиды как система доставки терапевтических биомакромолекул», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – биохимия

### Актуальность темы исследования

Диссертационное исследование Пыхтиной М.Б. посвящено одному из наиболее важных направлений медицинской биотехнологии – разработке новых способов доставки в клетки терапевтических биомакромолекул (генетического материала, цитокинов). Разработка безопасных методов доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени с целью коррекции или замены дефектных генов, становится все более возрастающей потребностью медицины.

Благодаря исследованиям последних 40 лет в мире достигнут значительный прогресс в области создания эффективных систем переноса генов в организм с использованием специальных векторов на основе плазмидных ДНК и вирусов теплокровных. Несмотря на высокую трансдуцирующую эффективность вирусных векторов, их использование связано с рядом ограничений, таких как вызываемые ими иммуногенность, потенциальная мутагенность и развитие воспалительного ответа. В отличие от вирусных векторов, группа невирусных систем доставки генов весьма разнообразна и включает использование различных полимеров, наноконструкций, неорганических частиц, положительно заряженных пептидов и белков. В последние годы активно исследуются невирусные системы доставки генов на основе положительно заряженных пептидов, белков и мультимодульных химерных конструкций на их основе, обеспечивающих преодоление различных барьеров организма и защиту транспортируемых генов от гидролитических ферментов.

Наряду с вышеописанными генотерапевтическими средствами, важным направлением современной фармакологии является разработка биопрепаратов на основе рекомбинантных белков, используемых для иммуно – и заместительной терапии. Достижения молекулярной биологии и биотехнологии позволили получать лекарственные препараты на основе рекомбинантных белков, которые в настоящее время широко применяются для лечения заболеваний самой разной природы. Вместе с тем применение биопрепаратов на основе рекомбинантных белков ограничено рядом

недостатков, среди которых следует выделить короткое время их жизни в организме и оказываемые ими побочные эффекты. Эти недостатки обусловили разработку целого ряда стратегий продления полужизни и улучшения фармакокинетических свойств рекомбинантных белков и пептидов.

В этой связи диссертационная работа Пыхтиной М.Б., направленная на разработку и исследование химерных белковых ApoA-I-содержащих конструкций, предназначенных для транспорта терапевтических биомолекул (ДНК, белки) и пролонгации их действия в организме, является, несомненно, актуальной.

### **Степень разработанности темы исследования**

Изучению транспортной и регуляторной роли липо(апо)протеинов посвящено большое количество работ в НИИ биохимии ФИЦ ФТМ. Сотрудниками института исследовались способности липопротеинов и их основных компонентов - аполипопротеинов, связывать и транспортировать жирорастворимые витамины, стероидные соединения, тиреоидные гормоны, лекарственные препараты. Кроме того, была показана способность аполипопротеина A-I (ApoA-I) как свободного, так и в комплексе с тетрагидрокортизолом связываться с эукариотической ДНК. ApoA-I, ассоциированный со стероидными гормонами, взаимодействует с одно и двцепочечными короткими GСС-богатыми олигодезоксирибонуклеотидами, образуя с ними устойчивые комплексы, константа диссоциации которых составляет  $10^{-6} - 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ . Обнаруженная способность белка ApoA-I взаимодействовать и связывать ДНК представляет интерес с точки зрения возможности его использования для формирования ДНК-белкового комплекса с целью его защиты от действия нуклеаз и доставки в клетки-мишени. Эти исследования легли в основу разработки соискателем невирусных ApoA-I-содержащих полипептидных векторов для переноса генетического материала.

Способность аполипопротеина A-I связывать соединения различной природы, длительное время циркулировать в крови, а также наличие к нему SR-BI рецептора на большинстве типов клеток, использовалось многими исследователями для доставки терапевтических молекул. Так например, были созданы наночастицы на основе ApoA-I и реконструированных ЛПВП в качестве транспортной формы противоопухолевых агентов (10-гидроксикамптотecin, доксорубин, паклитаксел), противогрибкового средства амфотерицина В и липофильного пептида Нозигептида против инфекции, вызываемой вирусом гепатита В (HBV). Во всех этих работах использовалась способность ApoA-I-содержащих наночастиц связывать выше названные соединения нековалентными связями.



Соискателем был предложен альтернативный подход использования АроА-I в качестве белка-транспортёра целевых полипептидов и компонента, пролонгирующего время их полужизни, основанный на создании генно-инженерными методами гибридных (химерных) АроА-I -содержащих цитокинов. Параллельно с исследованиями соискателя, близкие по идеологии работы проводились испанской группой исследователей. Ими были разработаны генетические конструкции, содержащие гены слитых с АроА-I некоторых биологически активных полипептидов (IL15, IFN- $\alpha$ , ингибитор TGF- $\beta$ , FGF15/19, инсулин), которые в составе вирусного вектора доставлялись в организм лабораторных животных, где и осуществлялась их экспрессия. АроА-I в составе новосинтезированных цитокин- и гормон-содержащих химер увеличивал время их циркуляции в крови, и обеспечивал адресную доставку в органы мишени (печень, мозг).

### **Научная новизна работы**

Работа соискателя представлена двумя большими частями – 1) части, посвященной конструированию химерных белков для переноса генетического материала (пл ДНК) в клетки млекопитающих и 2) части, описывающей получение химерных цитокиновых белков с целью повышения их стабильности и увеличения времени циркуляции в организме человека.

В результате выполнения первой части работы соискателем впервые сконструированы оригинальные полипептидные химеры АроА-I с гистоном H2A, способные образовывать прочные комплексы с исследуемой плазмидной ДНК и трансфицировать ее в ядра клеток эукариот с эффективностью 3-5%. Хотя уровень трансфекции является невысоким, как отмечает автор, эта система доставки генов лишена множества недостатков, свойственных другим системам переноса генов. Не могу не согласиться с заключением соискателя, что предложенная ею система переноса генов может рассматриваться в качестве прообраза одного из будущих невирусных систем переноса генов в клетки эукариот.

Наиболее интересной, и перспективной с практической стороны, на мой взгляд, является часть работы, посвященная получению генно-инженерными методами оригинальных химерных полипептидных конструкций, содержащих слитые аминокислотные последовательности отдельных цитокинов человека и АроА-I (rhIFN-АроА-I, rhG-CSF-АроА-I, rhGM-CSF-АроА-I). Следует отметить, что к моменту начала работ соискателя за рубежом были опубликованы работы, в которых была предложена и экспериментально проверена стратегия продления в организме лабораторных животных

полу-жизни функционально активных белков за счёт их слияния генно-инженерными методами с альбумином, иммуноглобулином либо их фрагментами. Подобные химерные белки демонстрируют существенно больший период полужизни в организме, вместе с тем, иногда создание подобного рода конструкций сопровождается существенным снижением (иногда на порядок) биоактивности терапевтического белка в составе химеры.

В этом отношении впервые предложенный соискателем способ пролонгации активности цитокинов, введённых в организм, за счёт образования их химер с АроА-I является, несомненно, новаторским. Важным достоинством полученных химерных цитокинов является полное сохранение их биологических активностей, обусловленное, по-видимому, как относительно малым размером АроА-I, по сравнению с размерами альбумина и иммуноглобулина, так и оптимальным подбором линкерного связующего пептида.

Интересным является обнаруженный диссертантом факт некоторого изменения биологических свойств новообразованных химерных АроА-I-содержащих колониестимулирующих факторов (rhG-CSF-АроА-I и rhGM-CSF-АроА-I). В частности, указанные химеры повышают жизнеспособность бластных и зрелых клеток костного мозга и эффективнее, чем их аутентичные аналоги, снижают апоптоз.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные соискателем результаты расширяют современные представления об АроА-I не только как о транспортной форме биологически активных соединений, но и о его роли в повышении жизнеспособности многих типов клеток, нормализации их функциональной активности. Об этом свидетельствуют полученные соискателем данные о модулирующем действии химерных цитокинов, связанном с их способностью снижать апоптоз клеток-мишеней, нормализовать сегментацию аномальных нейтрофилов и стимулировать фагоцитоз клеточного дебриса. Эти факты, несомненно, являются важными с точки зрения возможного дальнейшего использования полученных химерных белков для создания на их основе иммунотерапевтических препаратов со сниженной токсичностью, которая, как известно, является частым побочным эффектом цитокинотерапии.

Отмеченный факт усиления фагоцитоза клеточного дебриса в присутствии химеры rhG-CSF-АроА-I представляет несомненный теоретический и практический интерес для изучения возможности использования химерного белка в терапии



трофических язв у больных сахарным диабетом, для которых характерно нарушение фагоцитоза (незавершенный фагоцитоз или его отсутствие).

Большое практическое значение имеют полученные рекомбинантные штаммы *P. pastoris*, продуцирующие аутентичные цитокины rhIFN, rhG-CSF и rhGM-CSF, поскольку имеющиеся на российском фармацевтическом рынке лекарственные препараты на основе указанных цитокинов, получены, главным образом экспрессией в клетках *E. coli*. Как известно, использование в качестве продуцентов терапевтических белков *P. pastoris* позволяет получать корректно гликозилированные, растворимые белки с сохраненными биологическими функциями.

Полученные результаты открывают перспективы для дальнейших исследований полученных рекомбинантных аутентичных и химерных белков и созданию на их основе специфических иммунобиологических препаратов.

В целом, работа соискателя открывает перспективу использования аполипопротеина А-I в качестве перспективной белковой платформы для создания на ее основе терапевтических полипептидных препаратов пролонгированного действия.

#### **Степень достоверности результатов исследования**

Диссертация Пыхтиной М.Б. представляет собой большую по объёму разноплановую работу с использованием современных методов исследования. Работы, связанные с проектированием и оптимизацией генов, предназначенных для клонирования в клетках бактерий и дрожжей, были проведены с использованием ряда специализированных компьютерных программ таких, как: GeneDesigner 2.0, VisualGeneDeveloper и Invitrogen GeneOptimizer. Работы по клонированию оптимизированных генов в клетках *Escherichia coli* и *Pichia pastoris* и анализу их экспрессии проводились с использованием стандартных методов молекулярной биологии и геной инженерии. Части работы, связанные с исследованием биологических активностей полученных аутентичных и химерных рекомбинантных белков осуществлялись с помощью культуральных и гистологических (миелограмма) методов, а также методов проточной цитометрии, что позволило детально изучить биологические эффекты, оказываемые полученными химерными белками.

Результаты исследований получены на современных приборах и оборудовании: жидкостный хроматограф («АКТА start GE Healthcare, Швеция»), ИК-Фурье спектрометр (Nicolet 6700, Thermo Scientific, США), масс-спектрометр UltraFlex III MALDI-TOF/TOF («Bruker», Германия), проточный цитофлуориметр (CYTOFLEX S-100, Beckman Coulter, США), электропоратор ДНК Gene Pulser Xcell Total System Electroporator (BioRad,

США), флуоресцентный микроскоп AxioObserver.D1 (Carl Zeiss, Германия) и ген-амплификатор MC2 DNA Thermal Cycler (DNA technology, RF). Основные результаты диссертационной работы Пыхтиной М.Б. были многократно апробированы на российских и международных научных форумах и опубликованы в 11-ти научных статьях в зарубежных и отечественных журналах перечня ВАК, 9 из которых в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science.

Всё изложенное позволяет говорить о высоком профессиональном уровне исследования. Большой объем экспериментального материала, использование современных высокоинформативных методов исследований и теоретическое обобщение полученных данных, позволили Марии Борисовне сформулировать основные положения и выводы диссертационной работы, объективность и высокая степень достоверности которых не вызывает сомнений.

#### **Общая характеристика работы**

Диссертация Пыхтиной Марии Борисовны оформлена в соответствии с Национальным стандартом РФ (ГОСТ Р 7.0.11-2011), изложена на 200 страницах машинописного текста, имеет общепринятую структуру и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей материалы и методы исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 406 источников, в т.ч. 11 отечественных и 395 зарубежных авторов. Работа проиллюстрирована 45 рисунками высокого качества и 1 таблицей.

В разделе введение дается обоснование актуальности проблемы исследования, формулируются цели и задачи работы. Обзор литературы включает подразделы, посвященные подробному рассмотрению структуры и функций ApoA-I в организме, систем доставки генетического материала, описанию отдельных клинически значимых цитокинов (IFN, G-CSF, GM-CSF), имеющихся способов их модификации с целью улучшения фармакокинетических параметров и характеристике основных продуцентов указанных рекомбинантных цитокинов. Каждый из подразделов обзора литературы позволяет читателю составить целостное представление о последних достижениях по рассматриваемым проблемам и, в конечном итоге, подойти к пониманию цели и основных задач исследования.

Глава «Материалы и методы» включает в себя большое количество разнообразных и современных методов исследования. Большая часть методов довольно детально описана в соответствующем разделе диссертации, некоторые наиболее



распространенные молекулярно-биологические методы описаны кратко со ссылками на источники.

Глава «Результаты и их обсуждение» включает описание результатов, полученных по двум направлениям исследования: разработке невирусных систем доставки генов и созданию химерных ApoA-I-содержащих цитокинов. Оба эти направления включают описание результатов получения двух групп рекомбинантных химерных белков, соответственно, в двух различных системах экспрессии - бактериальной (*E. coli*) и эукариотической (*P. pastoris*), что свидетельствует о владении соискателем особенностями методов работы с этими продуцентами. В то время как *E. coli* является распространенным объектом («рабочей лошадкой») при получении рекомбинантных белков, *P. pastoris* используется биотехнологами значительно реже, вместе с тем, как отмечает в своем обзоре соискатель, ожидается, что в скором будущем этот продуцент войдет в тройку распространенных систем экспрессии для продукции терапевтических рекомбинантных белков.

Несмотря на то, что работа носит, в первую очередь, биотехнологический характер, в ней представлено довольно детальное описание исследований биологических свойств как аутентичных колониестимулирующих факторов, так и их химерных форм с ApoA-I (rhG-CSF-ApoA-I, rhGM-CSF-ApoA-I) с применением как гистологических (миелограмма) методов, так и с использованием методов проточной цитометрии.

Интерпретация результатов, полученных автором, аргументирована и обоснована. Выводы работы логически вытекают из полученных результатов.

По содержанию и оформлению диссертации **принципиальных замечаний нет**, за исключением нескольких ремарок.

В тексте встречается небольшое количество стилистически некорректных предложений и опечаток, например, на стр. 104 -106 - трансфецирующая (в остальном тексте через «и»). Встречается некорректное использование термина "трансфекция", например на стр. 37 - трансфекция ДНК с помощью пептидов, при этом в разделе Материалы и Методы написано правильно - трансфекция клеток с использованием ДНК.

Подписи к ряду рисунков малоинформативны. Например, из подписей к рисункам 38, 39, 40, 43 и 44 не ясно, что является контролем (или контрольным препаратом); не указаны концентрации цитокинов и количество клеток, взятых для анализа. Нечётко описан алгоритм построения миелограммы (рис.40).

Определение количества гранулоцитарных клеток (рис. 37 и 38) проводилось с использованием метода проточной цитометрии только по размеру клеток (по SSC-FSC) с помощью гейтирования. Такой метод обладает достаточно большой погрешностью, поскольку сильно зависит от искусства гейтирования. Было бы корректнее использовать меченные флуоресцентной меткой моноклональные антитела к поверхностным маркерам гранулоцитов для более точного определения количества целевых клеток.

Отдельные методики в разделе "Материалы и Методы" описаны очень лаконично. В то же время, в разделе "Результаты" есть слишком детализированные описания эксперимента с такими техническими подробностями, которые бы логичнее было бы представить в разделе "Методы". Например, технологию получения рекомбинантных цитокинов и их химерных форм, можно было бы описать более кратко, не загромождая и без того довольно объемный раздел работы.

Вышеперечисленные замечания несколько не умаляют значимость полученных данных и не влияют на высокую оценку проделанной работы.

### **Заключение**

Кандидатская диссертация Пыхтиной Марии Борисовны «Аполипопротеин АI-содержащие химерные полипептиды как система доставки терапевтических биомакромолекул», выполненная под руководством д.б.н., профессора Беклемишева Анатолия Борисовича, является завершённым научно-исследовательским трудом, имеющим существенное значение для биохимии, медицинской биотехнологии и здравоохранения. В диссертации изучена новая система доставки биомакромолекул медицинского назначения на основе АпоА-I-содержащих химерных белков с целью повышения эффективности и продолжительности их действия в организме.

Полученные автором результаты достоверны, положения и выводы обоснованы. Автореферат соответствует основному содержанию диссертации. Опубликованные автором научные статьи полностью соответствуют теме диссертационной работы.

Диссертационная работа по актуальности изучаемой проблемы, степени научной новизны, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте публикаций материалов в научных печатных изданиях, соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (постановление Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842) в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых



степеней» с изменениями постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», а её автор, без сомнения, заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник отдела биоинженерии

Федерального бюджетного учреждения науки

«Государственный научный центр вирусологии

и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора

доктор биологических наук, доцент

Л.И. Карпенко

Тел.: +7(383)3634700 (доп 26-13)

Адрес: 630559, Новосибирская обл

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

эл. почта: [karpenko@vector.nsc.ru](mailto:karpenko@vector.nsc.ru)

Личную подпись Л.И. Карпенко

Начальник отдела кадров

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

29.03.2022 г.

И.В. Ильин