

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. Нацеленная доставка в клетки организма пациента терапевтического генетического материала (в форме терапевтических генов либо их матричных РНК, различных видов интерферирующих РНК, а также генетических инструментов, направленных на редактирование генома) было и остается приоритетной задачей современной медицинской биотехнологии с момента разработки и применения первой в истории медицины генотерапии, использовавшей генетическую модификацию стволовых клеток кроветворения *ex vivo* с помощью ретровирусного вектора, несущего ген аденозин дезаминазы, для лечения синдрома тяжелого комбинированного иммунодефицита. Однако трагическая смерть пациента, получившего эту одобренную FDA терапию в 1999 г., надолго остановила трансляцию генотерапевтических подходов от этапов доклинической разработки и клинических испытаний до их широкого применения в клинической практике. Следующие генотерапевтические препараты были одобрены FDA для применения только 2 десятилетия спустя, в 2017 г.: весь этот период времени был потрачен на разработку и обеспечение высокого уровня биологической безопасности вирусных векторов различного происхождения (лентивирусных, аденовирусных, везикуловирусных, векторов на основе аденоассоциированных вирусов и пр.), а также технологий их массового производства. Несмотря на достигнутую высокую безопасность современных вирусных векторов, некоторые опасения по поводу их минимального иммуногенного потенциала, возможности редких инсерционных событий, опасных для здоровья пациента, вероятности эпигенетического сайленсинга терапевтических трансгенов и др. актуализируют задачу разработки альтернативных, невирусных систем доставки терапевтического генетического материала в клетки организма пациента.

Хотя на сегодняшний день проводится ряд клинических испытаний генотерапевтических подходов, использующих невирусные векторы, только три подобных препарата были разрешены FDA. Среди них препарат Патисиран для лечения полинейропатии у людей с одной из форм наследственного амилоидоза, содержащий терапевтические короткие интерферирующие РНК (siRNA) и две вакцины от COVID-19, содержащие мРНК спайкового белка коронавируса SARS-CoV-2. Все три препарата используют в качестве невирусного вектора липидные наночастицы, состоящие из

специально разработанных смесей липидов. В связи с вышесказанным, разработка альтернативных невирусных векторов представляется актуальной задачей.

Альтернативой генотерапии представляется применение препаратов белков, обладающих терапевтическими свойствами. Разработка таких препаратов испытывает сегодня свой расцвет – более 250 белковых фармпрепаратов уже применяется в клинической практике и 885 (на момент 2019 г.) находятся на стадии клинических испытаний. Значительная доля этих препаратов относится к препаратам с иммунологическим спектром действия, среди которых выделяются моноклональные антитела, рекомбинантные интерлейкины, хемокины, интерфероны и колониестимулирующие факторы. Клиническое применение биопрепаратов на основе белков ограничивается рядом проблем, среди которых необходимость преодоления анатомических барьеров организма и внутриклеточных барьеров, таких как цитоплазматическая, эндосомальная и ядерная мембраны, а в связи с этим – низкая биодоступность, недостаточная стабильность как при хранении, так и в организме пациента, короткое время действия и др. Помочь устранить эти недостатки способно применение мультидоменных белковых конструкций, сочетающих разные функциональные домены.

В связи с вышесказанным, разработка систем доставки терапевтических биомолекул на основе химерных мультидоменных полипептидов, содержащих аполипопротеин А-I, которой посвящена диссертационная работа Пыхтиной М.Б., несомненно, представляется актуальным исследованием.

Степень разработанности темы исследования. К началу исследований соискателя описывалась способность рекомбинантного ApoA-I проникать в ядра гепатоцитов и транспортировать туда конъюгированные с ним вещества, такие как FITC или эстриол. Однако эффективность рекомбинантного ApoA-I или химерных полипептидных конструкций, содержащих ApoA-I в качестве трансфекционного агента для плазмидной ДНК, не изучалась. Насколько известно оппоненту, разработка конструкций, содержащих домен ApoA-I и другие домены, способствующие эффективной трансфекции (такие как домены белковой трансдукции (protein transduction domains/PTD) или гистоны), также не проводилась.

В то же время, применение полипептидных конструкций на основе ApoA-I в качестве средства доставки терапевтических молекул в клетки, экспрессирующие рецептор SR-B1 (high density lipoprotein/HDL scavenger receptor class B type I), для которого ApoA-I является лигандом, представляется достаточно разработанным. В

частности, продемонстрирована эффективность применения наночастиц на основе рекомбинантного (нехимерного) ApoA-I и липидов в качестве средства доставки низкомолекулярного ингибитора взаимодействия CD40 с TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6), в макрофаги. Химерная конструкция, содержащая в своем составе фактор роста фибробластов 15/19 (FGF 15/19) и аполипопротеин A-I, была использована, наравне с рекомбинантным FGF 15/19, для лечения индуцированного диетой стеатоза печени у мышей. Было показано, что химерная конструкция превосходила FGF как по времени циркуляции в плазме крови (8.5 ч vs. 1.8 ч), так и по длительности её обнаружения в таргетных тканях (печени, мозге, жировой ткани). Биологическая активность такой химеры также значительно превосходила таковую рекомбинантного FGF 15/19. Ген химерной конструкции ApoA-I с пептидным ингибитором трансформирующего фактора роста бета (TGF β), P144, доставляемый в организм мыши в составе гепатотропного аденоассоциированного вектора, экспрессируется там и продукт его экспрессии, попадая в циркуляцию, подавляет экспрессию (TGF β), посредством чего предотвращает развитие аневризмы аорты у мышей линии, моделирующей серьезное наследственное заболевание, синдром Марфана. Показано также, что химерная конструкция, содержащая последовательности, ApoA-I и ИЛ15, а иногда, добавочно, рецептора ИЛ-15, IL-15R α , обладает противораковым действием, усиливая противоопухолевый цитотоксический клеточный ответ. Взаимодействие ИЛ-15 с гетеродимерным рецептором, в состав которого входят рецепторы ИЛ-2 (IL-2R β) и ИЛ-15 (IL-15R α), необходимо для активации пролиферации NK клеток и Т-лимфоцитов, в связи с чем, применение ИЛ-15 рассматривается как многообещающий вариант противораковой иммунотерапии. Роль ApoA-I в составе этой химеры состоит в адресности доставки, поскольку многие опухолевые клетки экспонируют на мембране рецептор SR-BI.

Работы по созданию гибридных конструкций, представляющих собой слитые с ApoA-I цитокины (IFN- α , IL-15, FGF15/19 и др.), были начаты одновременно с диссертационным исследованием соискателя, и они детально описаны в обзоре литературы настоящей диссертации. Синтезированные химеры имели лучшую фармакокинетику, меньшую гематотоксичность, более выраженную биологическую активность и, что интересно, проявляли дополнительные новые, несвойственные нативным цитокинам свойства, что отмечалось и автором данного исследования в отношении ряда своих химерных конструкций.

Научная новизна диссертационного исследования. Работа соискателя логически разделена на два больших блока - первый связан с решением задачи переноса генов в

клетки эукариот с помощью мультимодульных конструкций, содержащих в своем составе последовательности, кодирующие АроА-I, гистон H2A, и, в ряде случаев – домен белковой трансдукции, и блока, посвященного созданию, в целях повышения стабильности и периода полужизни цитокинов человека, их химерных форм.

В представленной работе впервые предложено применение белка плазмы крови АроА-I в качестве составного компонента химерных полипептидов, используемых как для потенциального переноса ДНК в клетки эукариот, так и для стабилизации терапевтически значимых белков (цитокинов человека) и продления времени их полужизни в организме.

Соискателем разработана оригинальная невирусная система доставки генов на основе химерных полипептидов, содержащих модули полноразмерных АроА-I и гистона H2A человека. Комплексы полученных химерных белков с плазмидной ДНК трансфицируют клетки НЕК 293Т с эффективностью 3-5%.

Автором сконструированы оригинальные рекомбинантные штаммы *P. pastoris*, продуцирующие аутентичные цитокины человека (rhIFN, rhG-CSF, rhGM-CSF), причем впервые были получены продуценты химерных форм этих цитокинов с АроА-I. Важно отметить, что создание химер не сопровождается падением специфических биологических активностей слитых с АроА-I цитокинов, что является одной из основных проблем при конструировании аналогичных гибридных белков.

Для химерной формы интерферона показано двукратное увеличение времени полужизни в организме мышей по сравнению с таковым аутентичного рекомбинантного интерферона rhIFN.

Автором обнаружено влияние АроА-I в составе гибридных белков на проявление специфических активностей слитых с ним цитокинов. Так, показано, что воздействие химерных белков rhG-CSF-АроА-I и rhGM-CSF-АроА-I на клетки костного мозга человека способствует их большей сохранности по сравнению с аналогичным действием аутентичных колониестимулирующих факторов. В частности, химеры достоверно снижают апоптоз, а также восстанавливают нормальную сегментацию ядер у аномальных нейтрофилов. Важной находкой соискателя является обнаруженный им факт расширения спектра действия rhG-CSF в составе химеры, выражающийся в его способности увеличивать пролиферацию моноцитарных клеток костного мозга. Представляется целесообразным в дальнейшем исследовать механизмы этого явления – лежит ли в его основе влияние АроА-I в структуре химерного белка на свойства G-CSF или взаимодействие АроА-I и G-CSF в составе химеры с рецепторами как гранулоцитов, так и моноцитов клеток костного мозга человека.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Проведенные в работе исследования носят как фундаментальный, так и практический характер.

Теоретически значимым является экспериментальное подтверждение ожидаемой способности сконструированных соискателем химерных полипептидов, содержащих слитые АроА-I и гистон H2A, связывать и переносить плазмидную ДНК в ядро клетки, причём переносимая ДНК сохраняет в составе такого комплекса способность к экспрессии.

Хотя эффективность такой трансфекции невысока, но, как отмечает и сам автор, цитотоксичность трансфекции с помощью АроА-I-содержащих полипептидов весьма низкая по сравнению с широко применяемыми липополикативными трансфектантами.

Интересным и, несомненно, имеющим фундаментальную ценность является обнаруженное соискателем расширение спектра действия химерного цитокина - rhG-CSF-АроА-I, приобретающего способность стимулировать пролиферацию клеток моноцитарного ростка. Однако, в связи с отсутствием пока данных о механизме наблюдаемого явления, рано судить о том, имеет ли данное наблюдение отношение к фундаментальным аспектам физиологии, в т.ч., к дифференцировке и пролиферации клеток миелоидного ряда.

Предложенная технология получения химерных форм цитокинов представляет несомненную **научно-практическую значимость** диссертационной работы. Данная технология может быть применима к получению ряда других АроА-I-содержащих химерных белков с прочими терапевтически ценными пептидами и белками.

Следует также отметить практическую ценность полученного в работе штамма *P. pastoris*, продуцирующего аутентичный rhGM-CSF, ввиду ограниченного количества препаратов GM-CSF на российском рынке, а также значимость полученных дрожжевых продуцентов G-CSF и GM-CSF вследствие отсутствия лечебных препаратов на основе указанных цитокинов, полученных биосинтезом в *P. pastoris*, как в России, так и за рубежом.

Степень достоверности результатов исследования. Достоверность результатов работы определяется использованием современных генно-инженерных методов, направленных на проектирование и сборку плазмидных векторов для экспрессии мультидоменных полипептидных конструкций на основе АроА-I. Эти работы проводились с применением специализированных пакетов программ, среди которых, наряду с коммерческим программным обеспечением применялась и разработанная в лаборатории соискателя программа поиска пар кодонов, затрудняющих или даже

останавливающих трансляцию мРНК. Используемые в работе методы молекулярной и клеточной биологии включали в себя как часто применяемые методы (ПЦР, технологии генного клонирования и трансформации бактерий, анализ белков методом электрофореза, культивирование эукариотических клеток и их трансформация/трансфекция, продукция и очистка рекомбинантных белков), так и достаточно редко встречающиеся, связанные с клонированием и экспрессией генов дрожжах *P.pastoris*. Некоторая часть работ, связанных с тестированием биологической активности цитокинов, выполнялась соискателем в сотрудничестве со специалистами ведущих исследовательских центров Сибирского отделения РАН в Новосибирске. Иллюстрации наиболее значимых результатов представлены в наглядной графической форме (рисунки и подписи к ним), результаты экспериментов статистически обработаны с использованием специализированного пакета программ и являются вполне достоверными.

Всё изложенное говорит о высоком профессиональном уровне исследования, проведенного на большом объеме экспериментального материала и с использованием широкого арсенала разнообразных методов исследования (молекулярно-биологических, микробиологических, иммунологических, гистологических). Всё это позволило Марии Борисовне сформулировать основные положения и выводы диссертационной работы, объективность и высокая степень достоверности которых не вызывает сомнений.

Общая характеристика работы. Диссертационная работа Пыхтиной Марии Борисовны изложена на 200 страницах машинописного текста, и состоит из введения, экспериментальной части, в которой описываются материалы и методы исследования, обзора литературы, раздела, в который входят 4 подраздела, где представлены результаты собственных исследований и их обсуждения, заключения с выводами и списка литературы, включающего 406 работ, из них 11 отечественных. Диссертация написана хорошим литературным языком, хотя и не лишена иногда стилистических неточностей и использования профессионального сленга. Содержание диссертации характеризуется четким, последовательным изложением, текст работы хорошо проиллюстрирован 45 рисунками высокого качества. Выводы логически следуют из полученных данных. Результаты исследования достаточно полно апробированы, докладывались на 13 отечественных и международных научных форумах, проходивших с 2012 по 2021 г. Основное содержание работы отражено в 11-ти научных публикациях в рецензируемых научных журналах, входящих в Перечень, рекомендованный ВАК, 9 из которых индексируются в базах данных Scopus и Web of Science и 2-х патентов РФ на изобретения. Все это позволяет высоко оценить диссертационное исследование Пыхтиной М.Б.

Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы нет, но **имеются некоторые замечания, касающиеся оформления работы и ряда не вполне точных формулировок:**

- Не вполне обосновано разбиение на подразделы части «1.2. Роль АроА-I и ЛПВП в регуляции физиологических процессов в организме» литературного обзора, в частности, вынесение в разные подразделы рассмотрения противовоспалительной и иммуномодулирующей функций АроА-I, в результате чего дважды, и в одинаковом ключе, обсуждается роль АроА-I в связывании бактериальных эндотоксинов в двух соседних подразделах.
- В то же время, вопрос о возможной роли АроА-I в противовирусном и противобактериальном иммунитете, затронутый в подразделе «Иммуномодулирующая функция», стоило бы рассмотреть более детально и с обсуждением механизмов, а также с привлечением публикаций последних 2-х – 3-х лет (ссылки в обзоре, относящиеся к роли АроА-I в противовирусном иммунитете, датируются 2007, 1999 и 1991 гг.).
- Кроме того, не вполне корректно (там же) описывать эндотоксин-связывающее действие АроА-I как антибактериальное. Эндотоксины высвобождаются после и в результате гибели бактериальной клетки, к которой АроА-I не имеет непосредственного отношения.
- По всему тексту диссертации следует заменить некорректно приведенное название вируса везикулярного стоматита (ВВС) – вирус везикулярного стоматита лошадей. Вирус с таким названием не входит в род везикуловирусов, описываемый в таксономии вирусов, разрабатываемой Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV). Согласно последней, ранее вирус везикулярного стоматита считался единым видом, представленным двумя серотипами – Нью Джерси и Индиана, на сегодня их считают двумя отдельными видами ВВС, последний – использованный в данной работе - корректно называть вирус везикулярного стоматита Индиана (VSIV).

Высказанные замечания не снижают общего очень хорошего впечатления от работы. Диссертация представляет собой законченное научное исследование. Выводы и научные положения, сформулированные в диссертации, адекватны результатам исследования и хорошо аргументированы. Материалы, представленные в автореферате

диссертации Пыхтиной М.Б., соответствуют основной информации, изложенной в самой диссертационной работе. Всё выше изложенное позволяет сделать следующее заключение.

Заключение

Кандидатская диссертация Пыхтиной Марии Борисовны «Аполипопротеин AI-содержащие химерные полипептиды как система доставки терапевтических биомакромолекул», выполненная под руководством д.б.н., профессора Беклемишева Анатолия Борисовича, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей важное значение для развития медицинской биотехнологии и фармакологии, а именно, для разработки новой белковой платформы на основе аполипопротеина А-I для доставки и пролонгации действия терапевтически ценных макромолекул.

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:

н.с. лаборатории молекулярной патологии ИМПЗ
Новосибирского государственного университета
(Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1)
кандидат биологических наук,
эл. почта: cheresiz@yandex.ru

..... С.В. Чересиз

Личную подпись

Начальник

.....

25.03.2022 г.