

УТВЕРЖДАЮ

Директор Института химической
биологии и фундаментальной
медицины СО РАН

член-корреспондент РАН,
доктор хим. наук, профессор
Д.В. Пышный

19 2022 г.

Отзыв ведущего

Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения
Российской академии наук о научно-практической ценности диссертации 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 диссертационной работы

Разработка методов доставки нуклеиновых кислот с целью коррекции генетических
дефектов или генной иммунизации, а также подходов к повышению эффективности
действия белковых препаратов является актуальной задачей современной биомедицины.

Современные способы доставки нуклеиновых кислот (НК) в клетки базируются на
использовании надмолекулярных комплексов нуклеиновых кислот с поликатионами или
положительно заряженными липидами, другими доставляющими синтетическими
молекулами и использовании вирусных систем доставки. И те и другие методы имеют
недостатки, ограничивающие их применение *in vivo*, но тем не менее используются для
упаковки современных НК-вакцин. Что касается белковых иммуномодуляторов то они
широко используются для коррекции иммунодефицитных состояний и борьбы с
инфекционными заболеваниями, и пролонгирование их действия за счет повышения
времени жизни в организме, оптимизации фармакокинетики так же является актуальной
задачей. Создание систем доставки генетического материала и терапевтически ценных
белков на основе природных, биodeградируемых и нетоксичных носителей, несомненно,
востребовано в современной биологии и медицине.

В качестве таких носителей могут быть использованы естественные эндогенные
биополимеры – переносчики биомолекул (жиров, гормонов, витаминов, и пр.), такие как
сывороточный альбумин, или аполипопротеин A-I (ApoA-I) – основной белковый
компонент липопротеинов высокой плотности.

Диссертационная работа соискателя, посвященная изучению возможности использования аполипротеина А-I в качестве базового компонента химерных полипептидов для разработки доставки терапевтических нуклеиновых кислот и повышения эффективности природных белковых иммуномодуляторов, что несомненно является актуальной задачей.

Научная новизна исследования

В работе Пыхтиной М.Б. впервые предложено использование аполипротеина А-I в качестве несущего компонента мультимодульных конструкций, предназначенных как для переноса генетического материала в клетки млекопитающих, так и повышения эффективности действия цитокинов человека.

Соискателем предложен оригинальный вариант невирусной системы доставки генов на основе рекомбинантных гибридных полипептидов, состоящих из полноразмерного ApoA-I и одного или двух гистонов H2A человека присоединенных через серин-глициновые линкеры. Показано, что гибридные белки связываются с плазмидной ДНК, и обеспечивают её трансфекцию в ядра клеток НЕК 293Т с эффективностью, составляющей 3-5%. Эти результаты позволили соискателю сделать заключение, что полученные гибридные белковые конструкции могут стать в перспективе прообразом будущих невирусных систем переноса целевых генов в клетки млекопитающих.

Соискателем впервые получены рекомбинантные штаммы *P. pastoris*, продуцирующие полипептиды, состоящие из цитокинов человека, присоединенных к ApoA-I через линкер (Ser-Gly)₁₀ (rhIFN-ApoA-I, rhG-CSF-ApoA-I, rhGM-CSF-ApoA-I). Как предполагала Мария Борисовна, такие полипептиды могут обеспечить длительную циркуляцию цитокинов в крови и межклеточной жидкости за счёт повышения устойчивости химер к протеолитическим ферментам. Ей было показано, что полученные химерные белки не теряют специфической активности, вместе с тем, химерные цитокины приобретают новые свойства, отличающие их от свободных цитокинов. В частности, rhG-CSF-ApoA-I и rhGM-CSF-ApoA-I повышают жизнеспособность и снижают апоптоз клеток костного мозга человека, а также эффективнее нормализуют сегментацию нейтрофилов. Интересным является отмеченный соискателем факт модуляции свойств rhG-CSF в составе химерного белка rhG-CSF-ApoA-I. На примере химерного белка rhIFN-ApoA-I показано, что время полужизни химеры в крови в 1,8 раза превышает время жизни свободного rhIFN.

Обоснованность и достоверность полученных результатов

В работе использован набор современных методов исследования. Наряду с общепринятыми в таких исследованиях микробиологическими, молекулярно-биологическими, генно-инженерными (клонирование гетерологичных генов в двух системах экспрессии - *E. coli*, *P. pastoris*), и культуральными методами использованы современные физико-химические методы (ИК-фурье спектроскопия, масс-спектрометрия), что несомненно повышает достоверность результатов и их качество. Количественные результаты подвергнуты соответствующей статистической обработке.

По результатам исследования опубликовано 27 научных работ, включая 14 тезисов, 11 статей в научных рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК, 9 из которых индексируются в базах Scopus и Web of Science, а также 2 патента на изобретение РФ.

Использование широкого арсенала современных методов исследования, большой объем экспериментального материала, его статистическая обработка, апробация результатов исследований на многочисленных отечественных и международных научных форумах свидетельствуют о высокой степени достоверности полученных соискателем данных.

Всё изложенное позволяет говорить о высоком профессиональном уровне соискателя.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Полученные соискателем результаты расширяют представление о возможности использования AroA-I в качестве носителя для биологически активных белков или их связывающих сайтов.

Предложенный автором способ трансфекции эукариотических клеток плазмидными ДНК с помощью химер, содержащих AroA-I и гистон H2A, может быть положен в основу разработки будущих невирусных систем переноса генов.

Обнаруженные соискателем новые свойства химерных AroA-I-содержащих цитокинов открывают новые возможности для модификации свойств цитокинов при помощи их конъюгирования с AroA-I.

Теоретическая значимость работы заключается в обнаружении способности химерного белка rhG-CSF-AroA-I, повышать пролиферацию клеток моноцитарного ряда из костного мозга человека.

Полученные химерные цитокины после их детального исследования могут использоваться для создания на их основе лекарственных препаратов пролонгированного действия.

Структура и общая характеристика работы

Диссертационная работа Пыхтиной М.Б. изложена на 200 страницах машинописного текста. Работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 406 источников.

Во введении автор обосновывает актуальность данного исследования, формулирует цели и задачи, выносимые на защиту положения, отмечает научную новизну работы, ее теоретическую и практическую значимость, достоверность полученных результатов и личный вклад в исследовании.

Обзор литературы охватывает рассмотрение вопросов, касающихся структуры и функции АроА-I в организме и возможности его использования в качестве транспортёра и протектора различных соединений; описания основных невирусных систем доставки генетического материала; рассмотрения функций отдельных цитокинов человека (IFN, G-CSF, GM-CSF) и современных подходов к пролонгации их активности в организме с акцентом на конструирование гибридных белков, а также описанию наиболее распространенных продуцентов цитокинов.

В главе «Материалы и методы» дается подробное описание используемых в исследовании молекулярно-биологических, генно-инженерных, микробиологических, культуральных, гистологических и физических методов.

В главе «Результаты и их обсуждение» представлены полученные соискателем данные, а также их корректная интерпретация. Данный раздел хорошо иллюстрирован изображениями высокого качества (электрофореграммы рекомбинантных белков, схемы и графики). Глава начинается с описания разработанного способа выделения нативного белка АроА-I из крови человека с целью его использования для оценки его способности формировать ДНК/белок комплексы и трансфицировать их в клетки эукариот. Следующий подраздел главы посвящен конструированию химерных полипептидов, содержащих модули полноразмерных АроА-I, гистона H2A и проникающего в клетки пептида РТD₄ и исследованию способности полученных химерных белков связывать и переносить плазмидную ДНК в клетки НЕК 293Т. Наибольшая часть результатов посвящена получению штаммов метилотрофных дрожжей *P. pastoris* - продуцентов рекомбинантных цитокинов rhIFN, rhG-CSF, rhGM-CSF и их химерных форм с АроА-I. Большая часть выводов диссертационной работы (4 из 6 выводов), формулируются на основании результатов, изложенных именно в данном подразделе. Очевидно, что именно эта часть работы явилась наиболее значимой и интересной как с научной точки зрения, так и в плане ее возможных практических приложений.

В целом, несмотря на то, что, диссертационная работа является многоплановым исследованием, включающим разделы, посвященные разным аспектам медицинской биотехнологии, все части этой работы объединены внутренней логикой и позволяют в итоге составить целостное представление о возможности использования ApoA-I в составе разработанных гибридных полипептидов в качестве перспективной транспортной формы фармакологически значимых молекул.

Замечания по работе.

Принципиальных замечаний к содержанию работы нет, однако есть некоторые технические недоработки и неточности.

При исследовании связывания химер (ApoA-I – гистон H2A) с плазмидной ДНК автор не оценил констант связывания комплексов, хотя это принципиально для оценки эффективности таких конструкций.

Автор говорит о защите цитокинов в составе химерных конструкций от действия протеаз крови, однако в экспериментах химеры и контрольные цитокины вводятся подкожно. Если говорить о времени циркуляции и времени жизни в крови, то, вероятно, имело бы смысл вводить белки в кровь?

В главе «Результаты и их обсуждение» в части, связанной с тестированием функциональных активностей аутентичных и химерных форм колониестимулирующих факторов (rhG-CSF, rhGM-CSF) в подписях к некоторым рисункам (рис. 37, 39) содержится неполная информация, не указаны данные о времени инкубации клеток костного мозга с этими факторами. Хотя эта информация присутствует в тексте результатов.

Отдельные предложения требуют стилистических корректировок.

Следует отметить, что высказанные замечания несколько не умаляют достоинств настоящей работы.

Заключение

Диссертационная работа Пыхтиной Марии Борисовны «Аполипопротеин AI-содержащие химерные полипептиды как система доставки терапевтических биомакромолекул», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей важное значение для развития медицинской биоинженерии, а именно, для создания новой технологии доставки терапевтических полипептидов и генетического материала в клетки млекопитающих. По актуальности проблемы, научной новизне, теоретической и практической значимости,

обоснованности научных положений и выводов, а также полноте опубликования данных в рецензируемых научных изданиях, диссертационная работа Пыхтиной М.Б. полностью соответствует 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», а её автор, без сомнения, заслуживает искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Заведующий лабораторией
молекулярной медицины
Института химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН
г.н.с., кандидат биологических наук,
(1.5.4. – биохимия)

П.П. Лактионов

Подпись Лактионова П.П. заверяю
Ученый секретарь Института химической
биологии и фундаментальной медицины
СО РАН, и.о. зам. директора Института
по научной работе, к.х.н.



П.Е. Пестряков

30.03.2022 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
Адрес: Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8
Тел.: (383) 363-51-50
E-mail: niboch@niboch.nsc.ru