

ОТЗЫВ

официального оппонента
на диссертационную работу Фроловой Анастасии Юрьевны
«Мультифункциональные гибридные структуры для тераностики раковых
заболеваний», представленную на соискание учёной степени кандидата
химических наук
по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия»

Актуальность

Проблема воздействия на раковые клетки с минимальными повреждениями здоровых является основной в терапии рака. Разработка таргетной терапии на основе антител к ряду онкомаркеров привела к значительным успехам в онкотерапии. Несмотря на эффективность этих препаратов, не все типы онкологических образований содержат онкомаркеры, что является существенным ограничением для данного вида терапии. Однако известно, что вне зависимости от молекулярного профиля раковые клетки способны к закислению их внеклеточного пространства ввиду особенностей механизмов метаболизма и энергообеспечения. По этой причине в последние годы активно развивающимся направлением в терапии рака является нацеливание на кислотное микроокружение опухоли, которое в последнее время часто реализуется при помощи пептидов семейства pHILIP (pH low insertion peptides), которые способны к встраиванию в мембрану клетки при значениях pH, ниже физиологических. К настоящему моменту при помощи pHILIP-технологии были реализованы нацеливания самых различных нагрузок для визуализации опухоли или ее терапии, а некоторые из них в настоящее время проходят клинические испытания на людях. Однако доставка белковых молекул при помощи пептидов pHILIP являлась слабо представленным направлением в литературе на момент начала настоящей работы, даже несмотря на то, что терапевтические препараты на основе белковых молекул обладают бесспорной эффективностью и огромным потенциалом. В ходе выполненного исследования были впервые изучены вопросы совместимости pHILIP-технологии в сочетании с высокомолекулярными белковыми компонентами для дальнейшей разработки новых таргетных противоопухолевых, диагностических или тераностических агентов. Параллельно с ходом текущей работы и выходом публикаций, посвященных ее результатам, в

литературе по данной тематике появлялись и публикации научных конкурентов, что также свидетельствует о ее актуальности и своевременности.

Новизна и практическая значимость

В данной работе была изучена совместимость pH-LIP-технологии и белковых молекул и впервые были отражены аспекты, негативно влияющие на ряд функций таких белково-пептидных конструкций. Были получены десятки гибридных конструкций вида белок-pH-LIP и проведено их подробное систематичное изучение. Установлено, что на эффективность pH-зависимого связывания целевой конструкции может влиять линкерная последовательность, соединяющая белковую часть и пептид pH-LIP. Продемонстрировано, что гибридные pH-чувствительные конструкции на основе различных пептидов pH-LIP обладают разной эффективностью связывания при понижении pH. Обнаружено влияние последовательности пептидов pH-LIP на фолдирование белкового компонента в составе гибридной конструкции. На основе представленных выше закономерностей, выявленных впервые, предложены новые подходы для получения конструкций, способных к эффективному связыванию с раковыми клетками при понижении pH. Полученные результаты позволят заполнить пробелы как в понимании верных стратегий дизайна гибридных конструкций на основе белков и пептидов pH-LIP, так и оптимальных стратегий их применения для направленного воздействия на раковые клетки.

Степень достоверности результатов

Исследования выполнены с использованием современных методов и оборудования. Результаты, полученные в соответствии с поставленными задачами, описаны точно и подробно. Работа выполнена на высоком уровне. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. На их основе опубликованы три статьи в рецензируемых журналах, а также представлены на российских и международных конференциях.

Общая характеристика работы

Диссертация имеет классическую структуру и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списков сокращений и используемой литературы, включающего 244

В разделе «Введение» обоснована актуальность исследования, представлена научная новизна, обозначены цели и задачи работы и определены основные положения, выносимые на защиту. Также сообщается о теоретической и практической значимости полученных результатов, приведены сведения о личном вкладе автора, апробации результатов исследования.

В разделе «Литературный обзор» отражены основные аспекты, направленные на понимание причин и механизмов закисления опухоли ее внеклеточного пространства. Представлены современные сведения о методах воздействия на опухолевый ацидоз и о подходах, позволяющих реализацию нацеливания на кислотное микроокружение опухоли. В частности, подробно представлены сведения о применении pHLP-технологии при доставке целевых агентов к опухоли, обоснована актуальность развития данного направления. Литературный обзор подготовлен с использованием значительного числа публикаций, включая исследования последних лет, чем обусловлено хорошее понимание и представление о состоянии данного научного направления в настоящее время.

В главе «Материалы и методы» представлены реактивы, используемые при выполнении работы, подробно описаны методики, которые охватывают широкий диапазон задач: от сборки необходимых генов до тестирования разработанных белковых препаратов на животных моделях.

Раздел «Результаты и их обсуждение» состоит из шести основных частей, в которых последовательно представлены новые сведения, полученные в результате изучения гибридных конструкций на основе флуоресцентных бексов и пептидов pHLP. В данной работе были получены десятки гибридных конструкций, подробно изучены и проанализированы их свойства, в результате чего был выявлен ряд определенных закономерностей: 1) Сочетание белков с пептидами pHLP может приводить к нарушению фолдинга белковой нагрузки. 2) На эффективность pH-зависимого связывания может влиять тип ливерной последовательности, связывающей белковый компонент с пептидом pHLP. Конструкции, содержащие упорядоченный линкер, демонстрировали лучшую эффективность pH-зависимого связывания по сравнению с конструкциями, содержащими гибкие линкеры. 3) Не все пептиды pHLP эффективны при доставке высокомолекулярных белковых соединений. В частности, pH-зависимое связывание гибридных конструкций,

содержащих пептид рНLIPvar3, который часто используется в литературе для нацеливания целевых веществ на опухоль, было менее эффективным по сравнению с аналогичными конструкциями, содержащими пептид рНLIPwt.

На основе полученных данных с учетом аспектов, негативно сказывающихся на свойствах конструкций слияния белков и пептидов семейства рНLIP, были предложены стратегии получения оптимальных гибридных белково-пептидных конструкций, требующие их определенного дизайна. Исследование конструкций вида белок-рНLIP было проведено как на моделях *in vitro*, так и *in vivo*. Были изучены как модельные, так и токсичные рН-чувствительные конструкции. Продемонстрирован потенциал применения белково-пептидных конструкции при их конъюгации с низкомолекулярными синтетическими метками.

В разделах «Заключение» и «Выводы» приведены основные результаты выполненного исследования и полностью отражены ключевые моменты.

Диссертационная работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, является логично выстроенным, комплексным и подробным исследованием. Результаты диссертации, несомненно, обладают научной новизной, заметно расширяют представления о свойствах гибридных белковых конструкций на основе белков и пептидов семейства рНLIP, и стратегиях их дизайна и применения.

Вопросы и замечания

Рассматриваемая диссертация производит очень хорошее впечатление. Вместе с тем, можно сделать ряд замечаний:

1. В разделе 2.5 обзора литературы содержится информация о структуре и других особенностях различных пептидов рНLIP. Для более полного восприятия этой информации было бы удобно, чтобы она была представлена в виде таблицы.
2. Некоторые рисунки, например, 4 на странице 21 содержат английские надписи. На мой взгляд, стоит делать перевод подписей к рисунку в тексте диссертации.
3. Работа содержит некоторое количество опечаток и неточностей.
4. Остается неясным, чем был обусловлен выбор опухолевых клеточных линий, на которых проводили проверку полученных белковых конструкций.
5. В разделе 4.4.1. Дизайн конструкций на основе mCherry и пептидов рНLIP указано, что в работе использовались линкерные последовательности SGLRSRAE и GACGIERC GS в качестве гибкого и жесткого линкера соответственно. Чем была

