

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель директора по научной
работе ФГБУН Федеральный
исследовательский центр проблем
химической физики и медицинской
химии РАН д.х.н.



Е.В. Золотухина

«07» ноября 2024 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра проблем
химической физики и медицинской химии

Российской академии наук

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 исследования

Онкологическая ситуация в мире остается крайне неблагоприятной. По оценке ВОЗ, каждый пятый мужчина и каждая шестая женщина на планете заболевают раком на каком-либо этапе жизни. Согласно статистике за 2020 г., число больных раком в 185 странах достигло 19,3 миллиона, почти 10 млн человек скончались от этой болезни. Злокачественные новообразования являются второй по численности причиной смерти и в России. В 2020 году 289,9 тысячи россиян умерли от злокачественных новообразований. За последние 10 лет количество заболевших раком в России выросло почти на 23%. Это связано не только с ростом заболеваемости, но и в большой степени с доступностью диагностики. По статистике больных раком спасает прежде всего своевременная диагностика. 90% больных, у которых онкологию выявили на ранней стадии, успешно излечиваются и живут долгие годы в состоянии ремиссии. В связи с этим, решение проблемы ранней диагностики и своевременного лечения онкологических заболеваний является одной из наиболее научно значимых и безусловно актуальных в современной фундаментальной и клинической медицине.

В настоящее время при лечении онкологических заболеваний применяются методы лучевой, радиоизотопной, гормональной, иммуно- и химиотерапии. Большинство из этих методов неспецифичны и имеют значительное вредное побочное воздействие на весь организм человека. В частности, химиопрепараты, кроме раковых клеток, повреждают также активно пролиферирующие клетки костного мозга, слизистой оболочки полости рта и желудочно-кишечного тракта, репродуктивной системы, волосяных фолликулов и др. По этой причине противоопухолевые лекарственные препараты являются причиной целого ряда осложнений. Получение препаратов с нацеленным на раковые ткани действием может значительно повысить их эффективность и уменьшить влияние побочных эффектов. Кроме того, вероятность излечения онкологического больного в значительной мере зависит от стадии болезни на момент диагностики. Многие современные методы диагностики достаточно дороги, сложны, и применяются лишь в крайних случаях при серьезных подозрениях. Таким образом, одной из важнейших фундаментальных проблем современной медицины является разработка таргетных (нацеливающих) препаратов, которые позволяют проводить раннюю диагностику (визуализацию) и одновременную терапию злокачественных новообразований (тераностические препараты). В настоящее время, в частности, предпринимаются попытки создания таргетных онкопрепаратов на основе антител и лигандов к определенным антигенам или рецепторам раковой клетки, локализованным на поверхности клеточных мембран (HER2/neu, ErbB-1 и EGFR, VEGFR). Эти рецепторы присутствуют и в нормальной клетке, но при опухолевой трансформации клеток некоторых типов может происходить их гиперэкспрессия. Однако, неустойчивая экспрессия этих маркеров в раковых клетках создает значительные трудности. Кроме того, при традиционном нацеливании терапевтических средств с использованием молекулярных биомаркеров, часто возникает резистентность за счет клональной селекции, которая затрудняет терапию. Также, клетки в здоровых тканях обычно экспрессируют те же белки, что снижает специфичность таргетинга с помощью антител и лигандов, нацеленных на эти рецепторы. Другой, более универсальный подход к таргетингу, может быть основан на различиях в основных свойствах нормальных и опухолевых клеток.

Одним из таких отличий является пониженный уровень pH во внеклеточном пространстве (pH 6.0-6.8) раковых клеток. Это явление связано с активным метаболизмом и наступающим дефицитом кислорода, гипоксией, в процессе роста и деления клеток. В результате, клетки «включают» анаэробный метаболизм, который связан с высокой скоростью гликолиза и образованием молочной кислоты, что в свою очередь приводит к избытку лактата и протонов. В ответ на повышенную концентрацию протонов в цитоплазме, клетка «выкачивает» избыточную «кислотность» во внеклеточное пространство для поддержания физиологического уровня pH в цитоплазме. Поскольку пониженный уровень pH является универсальным свойством всех типов раковых клеток, это свойство может быть использовано для избирательного нацеливания на пораженные ткани. Недавно было показано, что пептидный фрагмент из белка бактериородопсина (pHLIP) спонтанно связывается и встраивается в клеточную мембрану при снижении pH ниже нейтрального. При этом pHLIP обладает способностью переносить различные низкомолекулярные соединения через мембрану живой клетки в цитоплазму. Однако к 2018 г (году начала диссертационного исследования) способность pHLIP доставлять более высокомолекулярные биологически активные соединения, в том числе белки, была мало изучена (было известно о получении лишь двух конструкций такого рода). Между тем, применение нанобиотехнологических методов, таких как технология рекомбинантной ДНК, открывает новые возможности в медицинской и фармацевтической инженерии. Лишь в процессе текущей работы с выходом публикаций по ее результатам в литературе появились и публикации научных конкурентов, что свидетельствует об актуальности и своевременности данной тематики.

Научная новизна

Инструменты, применяемые в молекулярной биологии и позволяющие избирательно и с большой пространственно-временной точностью уничтожать определенные типы клеток, имеют большой потенциал для клинических применений в медицине. Направленная доставка препаратов к определенным клеткам и тканям является также одной из приоритетных задач современной медицины. Несмотря на то, что на основе различных соединений пептидной природы был создан ряд препаратов, некоторые из которых в настоящее время

находятся на стадии клинических испытаний, используемые препараты обладают, в основном, неспецифическим действием и во многих случаях не содержат визуализирующей составляющей, что затрудняет оценку нацеленности и раннего ответа опухоли на лечение. Кроме того, как уже было отмечено выше, применение таких биотехнологических методов, как метод рекомбинантной ДНК, открывает новые возможности в технологии с использованием пептидно-белковых конъюгатов. Настоящая работа направлена на разработку генно-инженерных подходов к созданию таргетных противораковых препаратов на основе пептидных нацеливающих составляющих, включающих помимо пептидной еще две составляющие: визуализирующую и терапевтическую. Данный подход, возможно, позволит решить комплексную проблему ранней диагностики и терапии онкологических заболеваний.

Кроме того, выполненная работа отличается от других работ в данной области комплексностью и систематичностью. Были получены, изучены и проанализированы десятки конструкций на основе белков и пептидов семейства рНЛIP. Впервые были выявлены закономерности, влияющие на эффективность рН-зависимого связывания гибридных конструкций с мембранами клеток и фолдирование белкового компонента, и с учетом этого предложены новые подходы для получения высокоактивных мультидоменных конструкций в условиях пониженных рН. Полученные в процессе работы данные и выводы, сформулированные диссертантом, в значительной степени дополняют имеющиеся сведения в данной научной области и могут служить основой для дальнейших исследований.

Теоретическая и практическая значимость

В результате выполнения данной работы было установлено, что получение мультифункциональных гибридных конструкций на основе белков и пептидов рНЛIP с сохранением их первоначальных свойств является неоднозначной задачей, поскольку был обнаружен ряд факторов, негативно сказывающихся либо на белковый компонент в составе гибридных конструкций, либо на рН-чувствительный. В частности, выявлено влияние типа линкерной последовательности, используемой для соединения молекулы белка и пептида рНЛIP. Установлено, что некоторые варианты пептида рНЛIP не эффективны при

доставке белковой высокомолекулярной нагрузки к раковым клеткам при понижении рН. Продемонстрировано влияние на рН-зависимые свойства белковых гибридных конструкций, включающей пептид рНЛIP, дополнительной нагрузки в виде гидрофобной низкомолекулярной метки, химически конъюгированной вблизи последовательности пептида. На основе результатов работы впервые были предложены стратегии для получения гибридных конструкций на основе белков и пептидов семейства рНЛIP, благодаря которым возможно получение высокоэффективных рН-чувствительных конструкций. Представленные в данной работе результаты позволят заполнить пробелы в понимании верной стратегии использования и получения оптимальных гибридных конструкций на основе белков и пептидов рНЛIP для противораковой терапии или ее диагностики.

Методики получения гибридных рН-чувствительных конструкций направленного на раковые клетки действия могут быть использованы в учебном процессе высших учебных медицинских и фармацевтических заведений. Полученные автором результаты имеют большое значение для фармацевтической науки, и в будущем могут быть использованы и внедрены в медицинскую практику.

Полученные в процессе работы данные и сформулированные Фроловой А.Ю. выводы могут служить основой для дальнейших исследований в данной области сотрудниками медицинских научно-исследовательских институтов, таких как Факультет фундаментальной медицины МГУ, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова.

Степень достоверности результатов

На основе полученных данных опубликовано 3 статьи в рецензируемых международных журналах, в которых диссертант является первым автором, что подтверждает его основную роль. Достоверность полученных результатов также гарантируется комплексностью работы и воспроизводимостью результатов. Материалы диссертации представлены на пяти российских и международных конференциях.

Общая характеристика работы

Диссертация изложена на 123 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения,

выводов, списка используемой литературы, включающего 244 источника, и приложения. Работа содержит 38 рисунков и 5 таблиц.

Раздел «Введение» содержит обоснования актуальности выполненного исследования, научная новизны, теоретической и практической значимости полученных результатов. В данном разделе обозначены цели и задачи работы и определены основные положения, выносимые на защиту, приведены сведения о личном вкладе автора, апробации результатов исследования.

В разделе «Литературный обзор» последовательно изложен материал о причинах и механизмах закисления возникновения опухолевого ацидоза, а также представлены современные сведения о методах воздействия и нацеливания на кислотное микроокружение опухоли. Значительная часть литературного обзора посвящена обсуждению вариаций применения пептидов рНЛIP при нацеливании на опухоль или попыток ее терапии со ссылками на публикации последних лет, что позволяет оценить современное состояние данного научной области и ее актуальность.

В главе «Материалы и методы» представлены реактивы и методы, используемые при выполнении работы. Стоит отметить, что некоторые методики были впервые разработаны автором диссертации.

В разделе «Результаты и их обсуждение» последовательно изложены результаты работы. Настоящая работа была посвящена изучению вопросов совместимости рНЛIP-технологии с высокомолекулярными белковыми компонентами. В ходе данного исследования были получены десятки гибридных конструкций вида белок-рНЛIP и проведено их подробное систематичное изучение. В качестве белковых молекул были выбраны именно флуоресцентные белки, поскольку их использование позволяло визуализировать целевые конструкции в ходе их изучения, а также позволяло оценить степень фолдирования белкового компонента в составе гибридной молекулы. Установлено, что гибридные конструкции на основе различных пептидов рНЛIP обладают разной эффективностью связывания при понижении рН. Обнаружено влияние последовательности пептидов рНЛIP на фолдирование белкового компонента в составе гибридной конструкции. Было выявлено влияние линкерных последовательностей, соединяющих белковый и рН-чувствительный компоненты,

на эффективность рН-зависимого связывания таких конструкций. Потенциал применения рНЛIP-технологии в сочетании с белковыми молекулами был продемонстрирован на моделях *in vivo* и *in vitro*. Понимание свойств гибридных рН-чувствительных конструкций было дополнено исследованиями с использованием гидрофобных синтетических флуоресцентных меток, конъюгация которых влияла на рН-чувствительное связывание целевых конструкций. Помимо этого, на основе выявленных закономерностей были предложены стратегии для получения гибридных конструкций, сочетающих белки и пептиды рНЛIP, которые позволили бы обеспечить их высокую рН-чувствительность, а также сохранить первоначальные свойства белкового компонента.

В разделе «Заключение» резюмируются итоги выполненного исследования, формулируются основные результаты работы.

Завершают работу общие выводы, список сокращений и условных обозначений, список цитируемой литературы и приложения с иллюстративным материалом.

Диссертационная работа является подробным и обстоятельным исследованием, построена стройно и логично, выполнена на высоком экспериментальном уровне. Выводы конкретны и полностью отражают результаты, обладающие несомненной новизной. Диссертация написана хорошим языком и позволяет заинтересованному читателю быстро войти в круг обсуждаемых проблем. Все эксперименты автора хорошо продуманы. Результаты их должным образом обсуждаются, правильность интерпретации подтверждается постановкой необходимых контрольных экспериментов. Не возникает сомнений в достоверности выводов диссертации, а также в приоритетности полученных результатов, которые восполняют пробелы в данной инновационной области.

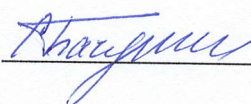
Рассматриваемая диссертация представляет собой логичное, фундаментально и практически важное исследование. **Имеющиеся замечания – о необходимости указания источников использованных в работе клеточных линий и о том, что автор не избежал пропуска ряда опечаток, пунктуационных и стилистических ошибок - не носят принципиального характера и не снижают ценности проделанной работы.** Работа безусловно является важным и оригинальным научным исследованием, выполненном на высоком методическом уровне.

Заключение

Актуальность и новизна полученных данных, высокий методический уровень работы и практическая значимость полученных результатов позволяют сделать заключение о том, что диссертация Фроловой Анастасии Юрьевны «Мультифункциональные гибридные структуры для тераностики раковых заболеваний» является законченным научным исследованием и удовлетворяет требованиям ВАК РФ. Диссертационная работа Фроловой Анастасии Юрьевны соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539; 26.09.2022 № 1690; 26.01.2023 №101), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия».

Диссертационная работа была обсуждена на расширенном семинаре Отдела медицинской и биологической химии обособленного структурного подразделения Института физиологически активных веществ ФГБУН ФИЦ ПХФ и МХ РАН, протокол №23 от 28.10.2024.

Научный руководитель ИФАВ
РАН, руководитель Отдела
медицинской и биологической
химии ИФАВ РАН, академик
РАН, д.х.н.

 Бачурин Сергей Олегович

Подпись академика РАН  О. Бачурина «ЗАВЕРЯЮ»

Ученый секретарь ИФАВ
РАН, канд. биол. наук



 Аникина Лада Владимировна

« 07 » ноября 2024 г.

142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, 1,
Обособленное структурное подразделение Институт физиологически активных
веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федерального исследовательского центра проблем химической физики и
медицинской химии Российской академии наук (ИФАВ РАН), 1, тел:
+7(496)5242650, e-mail: bachurin@ipac.ac.ru