

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу **Бишани Али** «Влияние химических модификаций и липидных средств доставки на биологическую активность иммуностимулирующей РНК *in vitro* и *in vivo*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология»

Актуальность темы исследования. Иммуноterapia является одним из современных быстро развивающихся и многообещающих направлений молекулярной биологии и фундаментальной медицины. Широкий интерес и большие ожидания, связанные с этим направлением, обусловлены разработкой принципиально новых лекарственных средств, использующих врожденные защитные механизмы, такие как иммунная система, для контроля и управления патологическими процессами в широком спектре нозологий – от аутоиммунных до инфекционных. Первые успехи в этом направлении связаны с появлением противораковых лекарственных препаратов на основе специфической (моноклональные антитела) и неспецифической (цитокины) иммунотерапии. Перспективным классом биотерапевтических средств являются нуклеиновые кислоты, которые обладают низкой токсичностью и высокой селективностью в отношении молекулярных мишеней, активирующих определенные сигнальные каскады. Вместе с тем, продвижение подобных иммунопрепаратов в клинику часто осложняется появлением побочных иммунотропных эффектов, которые могут привести к нежелательным последствиям. С целью преодоления этого недостатка, был предложен подход, основанный на неспецифической активации иммунной системы иммуностимулирующими нуклеиновыми кислотами (исНК), который может применяться на широком круге патологий. Основными проблемами, которые требуют решения в рамках данного подхода, являются доставка исНК в клетки-мишени, устойчивость к ферментной деградации, специфичность действия и безопасность применения. Диссертационная работа Бишани Али, посвященная решению этих общих проблем на примере короткой дцРНК (исРНК), является, безусловно актуальной. Выбор исРНК в качестве объекта исследования связан с данными о том, что она является индуктором неспецифического ответа врожденного иммунитета, который может проявляться в широком диапазоне терапевтических эффектов, включая иммуностимулирующий, интерферон-

индуцирующий, антипролиферативный, противоопухолевый и противовирусный. Непосредственной целью автора работы являлось изучение влияния химических модификаций и липидных средств доставки на биологическую активность иммуностимулирующей РНК *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна результатов диссертационной работы Бишани Али не вызывает сомнения. В ней впервые изучено влияние исРНК на развитие тяжелого воспалительного процесса в легких, осложненного фиброзом, и показано, что профилактическое введение исРНК в комплексе с липосомами может предотвращать развитие фибротических изменений, вызванных ЛПС. Автор впервые изучил влияние систем доставки на биологическую активность исРНК и показал, что состав катионных липосом принципиально важен для интерферогенного, антипролиферативного и противоопухолевого действия исРНК. Также впервые изучено влияние химических модификаций рибозы, фосфата, а также 3' и 5' концов в составе исРНК на ее интерферон-индуцирующую и антипролиферативную функции. Определена переносимость этих модификаций в зависимости от их положения и выбраны лидерные дуплексы с улучшенными свойствами.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты диссертационной работы Бишани Али представляют интерес как для фундаментальной, так и прикладной науки. В частности показана перспективность липосом, использованных в работе, для доставки широкого спектра терапевтических нуклеиновых кислот, предназначенных для различных целей. Среди них выявлены липосомы, которые могут усиливать или ингибировать специфические функции нуклеиновых кислот. Важное фундаментальное и практическое значение имеют данные о влиянии химических модификаций в составе исРНК, которые не только повышают эффективность и специфичность действия исРНК, но и способны блокировать нецелевую иммунную активацию, вызванную препаратами на основе siРНК и мРНК вакцин. В результате изучения влияния исРНК на моделируемые патологические процессы у животных, установлено, что исРНК не вызывает видимых побочных эффектов, что позволяет квалифицировать ее как безопасный и эффективный прототип препарата для иммунотерапии.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа Бишани Али изложена на 135 страницах, включает 24 рисунка и 10 таблиц, список литературы содержит 421 библиографический источник. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы.

Во введении автор обосновывает актуальность выбранного направления исследования, на основании чего четко формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, практическую значимость полученных результатов, основные положения, выносимые на защиту.

Основной целью данной работы являлась исследование влияния химических модификаций и липидных средств доставки на биологическую активность иммуностимулирующей РНК *in vitro* и *in vivo*. Исходя из этого, соискателем сформулированы пять конкретных задач, которые были логично связаны с поставленной целью и последовательно решались в процессе работы. Полученные результаты нашли отражение в выводах.

Обзор литературы содержит характеристику терапевтических нуклеиновых кислот, как перспективных средств иммунотерапии. Автор раскрывает особенности их взаимодействия с рецепторным аппаратом клетки, в том числе внутриклеточными рецепторами из класса геликаз, показывает влияние различных иммуностимулирующих паттернов в структуре ТНК на целевую активность. Отдельно рассматриваются вопросы, связанные с передачей сигналов от активированных, под воздействием нуклеиновых кислот, TLR в сигнальных путях клетки, приводящих к синтезу цитокинов или интерферонов. Особое внимание уделяется описанию свойств и эффективности различных систем доставки, как вирусных, так и невирусных, в том числе материалов, которые инкапсулируют РНК. Содержание литературного обзора показывает связь материала с задачами, которые заявлены в работе, и свидетельствует о достаточной теоретической подготовке соискателя.

В разделе «Экспериментальная часть» Бишани Али представлены материалы, оборудование, клеточные культуры и лабораторные животные, использованные в работе. Описание молекулярных и клеточных методов

исследования (в том числе процедуры приготовления комплексов исРНК/липосом, метода трансфекции исРНК в клетки донорской крови, анализа цитокинов в биоматериалах, полученных от животных, метода профилирования цитокинов с помощью флуоцитометрии, биохимических методов для оценки пролиферации) сделано достаточно подробно и не вызывает вопросов. В то же время, в описании экспериментов *in vivo* содержатся неточности и нестандартные термины, указанные в конце отзыва. В целом, данный раздел работы показывает, что соискателем использован широкий спектр современных молекулярно-биологических методов и методов клеточной биологии. Существенная и принципиально важная часть работы выполнена в экспериментах на лабораторных животных. Методологические подходы полностью адекватны поставленной цели и задачам.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из трех самостоятельных разделов, содержащих подразделы, посвященные решению конкретных задач.

В первом разделе, посвященном исследованию влияния исРНК на развитие фиброза легких у мышей, индуцированного блеомицином и липополисахаридом, Бишани Али установил, что профилактическое введение исРНК было более эффективно при фиброзе, вызванном LPS, чем при фиброзе, вызванном BLM. Выявленные различия, скорее всего, связаны со спецификой патологического процесса, присущей каждому из индукторов в наблюдаемые сроки. С этим же, по-видимому, связано и отсутствие значимых различий в показателях контрольной и опытных группах, которые проявились лишь на уровне тенденции. Вместе с тем, полученные результаты свидетельствуют о том, что применение исРНК можно считать безопасным при воспалительных процессах в легких, осложненных фиброзом.

Во втором разделе, посвященном изучению влияния состава катионных липосом на эффективность доставки ими в клетки исРНК, Бишани Али исследовал влияние различных систем доставки на цитокин-индуцирующую, антипролиферативную и противоопухолевую активность исРНК. Липидные системы были сконструированы на основе липосом 2X3-DOPE, с модификацией их поверхности полиэтиленгликолем (PEG) и липоконъюгатом с фолатом (F12). В состав липосом вводились липоконъюгаты, содержащие PEG, с различной

молекулярной массой (800, 1500 или 2000 Да) и структурой. Дополнительно были получены 2 серии липосом, содержащих PEG разной длины с присоединением якорной группы.

В результате экспериментов, проведенных *in vitro* и *in vivo*, автором установлено, что продукция цитокинов MCP-1 и INF- α , - β и - γ у мышей CBA возрастает под действием комплексов исРНК с липосомами, содержащими липоконъюгаты с длинными цепями ПЭГ. При этом активация MCP-1 и INF- γ , но не INF- α или β , наблюдается и под действием липоплексов исРНК, содержащих липоконъюгаты с короткими цепями ПЭГ.

Комплексы исРНК с непегилированными липосомами оказывают выраженное антипролиферативное действие на клетки меланомы B16 *in vitro*, а также противоопухолевое и гепатопротекторное действие *in vivo*, тогда как комплексы, содержащие липоконъюгаты с длинноцепочечными ПЭГ, в этом отношении неактивны. Обнаружено, что противоопухолевая активность исРНК коррелирует с эффективностью ее накопления в клетках и не зависит от активации продукции цитокинов и интерферона. Таким образом, структура системы доставки играет важную роль в характере ответной реакции иммунной системы на исРНК.

В заключительном разделе главы «Результаты и обсуждение» приводятся данные о влиянии химических модификаций на интерферон-индуцирующее и антипролиферативное действие исРНК.

Автором показано, что химические модификации в составе исРНК по-разному влияют на ее отдельные функции, такие как интерферон-индуцирующий и антипролиферативный эффекты. Эффект модификаций зависит не только от их типа, но также от их местоположения и окружающего контекста модификаций. Проведенное исследование позволяет выявить лидерные паттерны модификаций, усиливающие свойства исРНК. Эти модификации могут позволить улучшить фармакокинетические и фармакодинамические свойства, а также повысить специфичность действия исРНК для получения иммунотерапевтического эффекта.

В разделе «Заключение» обобщаются все экспериментальные данные и подводится итог, свидетельствующий о том, что исРНК и систему ее доставки можно рассматривать как кандидаты для доклинических испытаний в качестве терапевтического средства для лечения вирусных и опухолевых заболеваний.

В разделе «Выводы» сформулированы 3 основных вывода, которые являются обоснованными, подтверждаются изложенными в работе результатами и полностью соответствуют поставленным цели и задачам исследования.

По результатам диссертации опубликовано 4 работы в рецензируемых научных журналах. Основные результаты работы были представлены на 5-ти международных конференциях. Автореферат соответствует содержанию диссертации и дает представление об основных полученных результатах.

Замечания. В тексте диссертации в описании экспериментов *in vivo* выявлены неточности и стилистические погрешности:

1. В пункте 2.2.2 терапевтическая схема введения изучаемых соединений и индукторов не совпадает с описанными в главе «Результаты и обсуждение» и в автореферате.
2. Способ умерщвления животных в конце эксперимента должен соответствовать более точному определению процедуры и вспомогательного вещества.
3. В пункте 2.2.8 в описании эксперимента вместо выражения «Противоопухолевое действие ...оценивали на опухолях...» следовало писать «Противоопухолевое действие ...оценивали на животных с перевиваемыми опухолями...». Также неприемлемо выражение «...опухоли были инициированы...», правильно - «...опухоли были трансплантированы...».
4. В рамках экспериментальных исследований на животных не применяется выражение «лечение животных», которое обычно заменяется на «воздействие на животных» или «введение животным».

Впрочем, в тексте автореферата автор избежал повторения большинства ошибок, что позволяет отнести указанные выше замечания к небрежности в оформлении рукописи диссертационной работы.

Знакомство с работой вызвало следующие вопросы к соискателю, которые требуют ответов:

1. Имеется ли ссылка на источник с описанием модели фиброза легких?
2. В работе не указано, как определялась «интенсивность фиброзных изменений»: по количеству очагов фиброза, по площади очагов фиброза или «на глаз»? По

каким критериям определялся балл воспалительных и фиброзных изменений в легких мышей?

3. На рис. 8 Б и 9 Б назвать показатель по оси ординат. Что означает показатель «содержание клетчатки»?

Возникшие при прочтении вопросы и замечания носят дискуссионный или технический характер и не снижают значимости диссертационной работы и высокой оценки выполненного исследования.

Заключение. Работа Бишани Али соответствует требованиям, установленным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте Химической Биологии и Фундаментальной Медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Таким образом, соискатель Бишани Али заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 — молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, доктор биологических наук (03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология)

 Сорокина Ирина Васильевна

Адрес: 630090, г. Новосибирск,
проспект Академика Лаврентьева, дом 9
Тел.: 8 (383) 330-36-63
e-mail: benzol@nioch.nsc.ru

Подпись Сорокиной И.В. заверяю
Ученый секретарь НИОХ СО РАН
кандидат химических наук



Бредихин Р.А.

Дата отзыва: «20» сентября 2024 г.