

## ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертацию Светланы Константиновны Гапоновой на тему: «Сиквенс-специфические олигонуклеотид-пептидные конъюгаты и N-(метансульфонил)фосфорамидные аналоги антисмысловых олигонуклеотидов как ингибиторы онкогенных ми-РНК *in vitro* и *in vivo*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Создание антисмысловых олигонуклеотидных конструкций для лечения злокачественных опухолей является одним из современных, активно развивающихся направлений таргетной терапии. Успехи в развитии данного направления тесно связаны с получением новых знаний о молекулярных процессах канцерогенеза и внутриклеточных механизмах, поддерживающих и регулирующих стабильность генома и, в целом, жизнедеятельность клетки. Одной из таких систем, оказавшихся в последнее время в фокусе внимания исследователей, является пул микро-РНК (ми-РНК) – некодирующих РНК-транскриптов, контролирующих процессинг мРНК, через образование с ней комплиментарного комплекса и блокирования трансляции. Установлено, что часть из этих транскриптов имеет онкогенный потенциал и, следовательно, может рассматриваться как мишень для лекарственных препаратов. Целью диссертационной работы С.К. Гапоновой являлась разработка и исследование биологической активности двух типов миРНК-таргетных агентов – олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих новую N-(метансульфонил)фосфорамидную ( $\mu$ ) модификацию. Создание искусственных РНКаз с адресующим антисмысловым олигонуклеотидом считается наиболее перспективным подходом за счет необратимого каталитического расщепления мишени, однако целевая активность

таких конструкций в биологических объектах, в том числе в организме, остро нуждается в экспериментальном подтверждении. То же самое касается и изучения биологических свойств новых ингибиторов онкогенных ми-РНК на основе модифицированных дезоксирибонуклеотидов. Диссертационная работа С.К. Гапоновой, направленная на решение этих проблем, имеет высокую научную значимость и актуальность.

### **Оценка содержания диссертации и ее завершенности в целом.**

Диссертация Светланы Константиновны представляет собой исследование двух методологически различных, но логически взаимосвязанных задач: (1) разработки молекулярного дизайна новых типов миРНК-направленных агентов с улучшенными гибридизационными и рибонуклеазными свойствами и (2) исследование их биологической активности на широком круге моделей, в том числе на лабораторных животных.

При получении перспективных сиквенс-специфических конструкций автор пошел путем создания искусственных рибонуклеаз (иРНКаз) на основе конъюгатов адресующего олигодезоксинуклеотида и пептидного фрагмента, несущего каталитическую активность. В результате предварительного отбора олигонуклеотидов, автору удалось получить новые металл-независимые иРНКазы - конъюгаты шпилечных олигонуклеотидов, таргетных к онкогенной миРНК-21, и каталитического пептида  $[(\text{LeuArg})_2\text{Gly}]_2$ , который эффективно расщепляет мишень в реакции трансэтерификации. Преимуществом разработанных иРНКаз является высокая устойчивость к действию сывороточных нуклеаз, что обеспечивается как шпилечной структурой олигонуклеотидного домена, так и пептидной компонентой. Высокая эффективность новых агентов в расщеплении мишени связана с

каталитическим режимом работы пептида, что в условиях избытка субстрата не характерно для большинства известных иРНКаз.

Вторым типом миРНК-таргетных ингибиторов, представленных в работе С.К. Гапоновой, являются антисмысловые олигонуклеотиды с ранее не встречавшейся N-(метансульфонил)фосфорамидной модификацией ( $\mu$ -модификация) межнуклеотидных связей. В настоящее время модификация нуклеиновых кислот используется при разработке лекарственных препаратов на основе антисмысловых нуклеотидов, как прием для повышения их аффинности к мишени, биодоступности и устойчивости к нуклеазам биологических сред. Наиболее успешным в этом плане можно считать использование фосфотиоатов (PS), однако невысокая специфичность и токсичность снижает их привлекательность как фармацевтических агентов. Предложенная соискателем  $\mu$ -модификация в несколько раз повышает нуклеазоустойчивость и гибридизационную способность олигонуклеотидов по сравнению с PS-модификацией. Автором было показано, что  $\mu$ -модификация способствует образованию гетеродуплексов мезильных олигонуклеотидов с РНК, который является субстратом РНК-азы H, что ускоряет расщепление миРНК по сравнению с ДНК и PS-аналогами.

Существенная и принципиально важная часть диссертационной работы С.К. Гапоновой касается углубленного изучения биологической активности впервые полученных олигонуклеотид-содержащих миРНК-направленных конструкторов. Автором решались задачи определения у данных агентов таких показателей, как устойчивость к нуклеазам в ростовой среде и сыворотке крови, цитотоксическая и антипролиферативная активность на культурах опухолевых линий меланомы B16,

лимфосаркомы RLS<sub>40</sub> и эпидермоидной карциномы человека KB-8-5. Противоопухолевый потенциал соединений оценивался в тестах *in vitro* по способности связывания с внутриклеточной онкогенной мишенью (миРНК-21) с определением концентрационных и кинетических параметров процесса, по апоптоз-индуцирующей активности, по миграционным свойствам в тесте «заращение царапины». Показано, что разработанные автором миРНКазы демонстрируют 50% ингибирование инвазии, 40-55% подавление миграции, 50-75% снижение клеточной пролиферации и индуцируют апоптоз у 28% опухолевых клеток. Обнаруженные эффекты миРНК-направленных конъюгатов не уступают или превосходят таковые у известных в настоящее время ингибиторов миРНК-21. Полученные результаты объясняются выявленным синергизмом в действии миРНКаз и внутриклеточной РНКазой H, что способствует усилению внутриклеточной активности конъюгатов и подтверждается данными, отмеченными выше. Аналогичные по значимости результаты были получены С.К. Гапоновой в отношении  $\mu$ -модифицированных олигонуклеотидных ингибиторов миРНК на клетках меланомы B16, лимфосаркомы RLS<sub>40</sub>.

В работе также были получены ценные данные о противоопухолевых свойствах олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и  $\mu$ -модифицированных олигонуклеотидов *in vivo* на мышах с перевиваемыми опухолями RLS<sub>40</sub> и KB-8-5, резистентными к противоопухолевым препаратам (винкалкалоидам). В данном случае изучаемые ингибиторы миРНК-21 вводились до трансплантации путем трансфекции в перевиваемые опухолевые клетки. Автором установлено, что в этих условиях, даже однократная обработка клеток нуклеотид-пептидным конъюгатом способствовала 94%-му торможению роста опухолевого узла. Удвоение роста

опухоли увеличилось в 5 раз относительно контроля. Подобный противоопухолевый эффект наблюдался и у миРНК-21-направленных  $\mu$ -нуклеотидов. При этом оба ингибитора не оказывали токсического действия на мышей. Полученные результаты имеют приоритетный характер, так как большинство разработанных до сих пор мишень-направленных нуклеаз имеют подтвержденную активность лишь в отношении синтетических РНК-субстратов или модельных природных аналогов, в то время как для биологически значимых мишеней подобных исследований в мире практически не проводилось.

Следует отметить, что большинство результатов исследования получены впервые, имеют фундаментальный характер и соответствуют мировому уровню. Достоверность данных не вызывают сомнений, так как подтверждается использованием большого арсенала современных молекулярно-биологических, биохимических и культуральных методов исследования, таких как ПЦР, проточная цитофлуорометрия, ИФА, флуоресцентные методы визуализации, Вестерн блот гибридизация и другие. В качестве объектов биологических испытаний использовались клеточные культуры, лабораторные животные, биологический материал (кровь, внутренние органы лабораторных животных). Статистическая обработка данных соответствует современным требованиям. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Работа С.К. Гапоновой выполнена на достаточном объеме исследуемого материала, оформлена надлежащим образом, содержит 13 таблиц, 33 рисунка и приложение, список цитированной литературы включает 294 источника, общий объем - 170 страниц. Структура диссертации содержит традиционные разделы, в том числе достаточно подробный обзор литературы, обширный раздел материалов

и методов, изложение результатов собственной работы и их обсуждение, заключение и выводы. С точки зрения раскрытия темы и реализации поставленных соискателем задач структура и объем диссертации представляются адекватными заявленным целям, выводы соответствуют содержанию. Результаты исследования прошли апробацию на 10 всероссийских и международных научных конференциях, материалы диссертации опубликованы в 6 печатных работах в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и SCOPUS.

Результаты имеют теоретическое значение, связанное с разработкой принципов рационального дизайна миРНК-направленных олигонуклеотид-пептидных конъюгатов на основе немодифицированной ДНК и 2'-ОМe-олигонуклеотидов. Практическая значимость определяется возможностью использования N-(метансульфонил)фосфорамидных антисмысловых олигонуклеотидов и олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, направленных к онкогенной миРНК-21, в качестве прототипов лекарственных препаратов для лечения миРНК-зависимых заболеваний, в том числе онкологических.  $\mu$ -Модификация межнуклеотидных связей нуклеиновых кислот может использоваться как альтернатива фосфотиоатной модификации при создании гапмерных и полностью модифицированных олигонуклеотидных конструкций.

**Замечания.** Принципиальных замечаний к работе нет. Отмечены несколько опечаток и неточность в описании условий введения олигонуклеотид-пептидных конъюгатов в экспериментах на мышах с перевиваемыми опухолями (п. 2.2.17 на стр.59 и п. 3.1.1.8 на стр. 92). Более корректно писать: «В качестве перевивочного материала использовались клетки асцита, которые трансфецировались *ex vivo* липосомальной формой олигонуклеотид-пептидных конъюгатов...». Также прошу

ответить на вопрос, каким путем и в какой лекарственной форме целесообразнее вводить в организм олигонуклеотиды и их пептидные конъюгаты на этапе разработки лекарственных препаратов.

**Заключение.** Диссертационная работа Светланы Константиновны Гапоновой «Сиквенс-специфические олигонуклеотид-пептидные конъюгаты и N-(метансульфонил)фосфорамидные аналоги антисмысловых олигонуклеотидов как ингибиторы онкогенных ми-РНК *in vitro* и *in vivo*», является законченным исследованием, которое по своему содержанию, актуальности выбранной темы, научной новизне и практической значимости соответствует требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а её автор, Гапонова Светлана Константиновна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия".

**Официальный оппонент:**

ведущий научный сотрудник лаборатории  
фармакологических исследований  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Новосибирский институт  
органической химии им. Н.Н.Ворожцова  
Сибирского отделения Российской академии наук  
доктор биологических наук

 Сорокина Ирина Васильевна

Адрес учреждения:

630090, г. Новосибирск, проспект Академика  
Лаврентьева, 9. Тел. (383)330 07 31,  
e-mail: [sorokina@nioch.nsc.ru](mailto:sorokina@nioch.nsc.ru)

« 03 » марта 2020 г.

Подпись Сорокиной И.В. заверяю  
Ученый секретарь НИОХ СО РАН  
К.Х.Н.





Бредихин Р.А.