

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу в виде научного доклада

**Рихтера Владимира Александровича**

### **ЛАКТАПТИН – ОНКТОКСИЧЕСКИЙ ПЕПТИД МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА**

представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

#### **Актуальность исследования**

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенным женским онкологическим заболеванием не только в РФ, но и в развитых странах мира. В 2021 году доля этой нозологии в РФ составляла 22,1% от всех злокачественных новообразований у женщин, а в структуре смертности женщин от злокачественных новообразований РМЖ также занимает первое место. Несмотря на успехи в диагностике и лечении РМЖ, достигнутые в последние годы, уровень 5-летней выживаемости россиянок с РМЖ оставляет желать лучшего и не превышает 60%. Кроме того, весьма высок процент осложнений, связанных с агрессивными протоколами лечения РМЖ, которые включают наряду с таргетными препаратами, такими как тамоксифен, трастузумаб, лапатиниб, бевацизумаб, классические цитостатики, так как использование только таргетных препаратов не обеспечивают полного вылечивания пациента. Следует отметить, что большинство таргетных препаратов представляет собой моноклональные антитела, тогда как другие препараты белковой или пептидной природы пока не нашли широкого применения в практической онкологии.

В связи со всем вышесказанным, поставленная в диссертационной работе В.А. Рихтера научная проблема, а именно разработка новых оригинальных противоопухолевых препаратов для терапии РМЖ и подавления метастазирования является актуальной и важнейшей задачей, лежащей на стыке молекулярной биологии, онкологии и фармацевтики

#### **Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов**

Диссертационная работа В.А. Рихтера, в основу которой положено научное открытие, выполнена на стыке молекулярной биологии, биохимии, молекулярной онкологии и фармацевтики. Началом данной работы послужило обнаружение в составе пептидов молока человека, цитотоксического пептида, который индуцировал апоптоз опухолевых клеток разного происхождения. Начиная с обнаружения пептида ко всем результатам, полученным в ходе выполнения данной диссертационной работы можно добавить слово впервые:

- в молоке человека обнаружен цитотоксический пептид, который является фрагментом каппа-казеина и получены его рекомбинантные аналоги, включая RL2;
- изучен механизм цитотоксического действия RL2,
- на основе RL2 разработан противоопухолевый лекарственный препарат «Лактаптин» и проведены его доклинические исследования.

Следует отметить, что исследования, результаты которых представлены в диссертационной работе Рихтера В.А. были выполнены в период с начала двухтысячных по 2019 г. (дата последней публикации). В настоящее время аналоги RL2 используются в ряде российских и зарубежных лаборатории как модельные молекулы при изучении механизмов клеточной гибели. Кроме того, про-апоптотический потенциал RL2 был реализован при создании противоопухолевого препарата нового поколения на основе рекомбинантного штамма вируса осповакцины, несущего ген RL2 в своём геноме VV-GMCSF-Lact. Сегодня VV-GMCSF-Lact является первым в России противоопухолевым вирусным препаратом, получившим разрешение Министерства здравоохранения РФ на проведение клинических испытаний в качестве лекарства для терапии рака молочной железы. Результаты этих исследований, выполненных после 2019 г., не входят в диссертационную работу В.А. Рихтера, но однозначно показывают научную и научно-практическую значимость выполненных им исследований.

### **Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключения диссертации**

Достоверность полученных результатов, положений выносим на защиту, выводов и заключения определяется 1) объемом представленных экспериментальных данных; 2) использованием комплекса современных физико-химических, молекулярно-биологических и биохимических методов исследования; 3) дизайном проведенного комплексного исследования, который соответствует поставленной цели диссертационной работы. Все вместе это позволило обоснованно решить поставленные задачи исследования, сформулировать положения, выносимые на защиту, заключение и выводы, а также дать рекомендации по дальнейшему применению полученных результатов.

Результаты, представленные в диссертационной работе В.А. Рихтера, были представлены в виде докладов на многочисленных международных и российских научных конференциях. Основные научные результаты диссертации изложены в 22 статьях и в 9 российских и евразийских патентах. Таким образом, научные результаты, представленные в диссертации В.А. Рихтера, прошли многократную независимую экспертизу специалистов в данной области исследования.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертация В.А. Рихтера написана в виде научного доклада по совокупности опубликованных статей, поэтому не одержит таких традиционных разделов как Введение, Обзор литературы, Материалы и методы исследования и Список цитированной литературы. Результаты собственных исследований в разделе Содержание работы представлены в сокращенном виде, тем не менее позволяющем оценить объем в качестве проведенной экспериментальной работы.

Раздел *Содержание работы* начинается с описания структуры исследования и краткого описания методологических подходов, использованных на разных этапах проведения работы, что позволяет сразу же оценить уровень проводимых исследований. Раздел *Содержание работы* состоит из 10 подразделов, в которых отражены 6

направлений исследования. Следует отметить, что исследования по разным направлениям развивались параллельно и дополняли друг друга.

В *подразделе 1*, приведены результаты, касающиеся открытия цитотоксического пептида в плазме человеческого молока, который методами масс-спектрометрического анализа был идентифицирован как фрагмент каппа-казеина человека. Следует отметить, что такой цитотоксический пептид был обнаружен впервые и учитывая его происхождение получил название лактаптин.

*Подраздел 2* посвящен получению рекомбинантных аналогов лактаптина, так как его выделение из человеческого молока является проблематичным в виду недоступности источников сырья, низкого выхода целевого продукта и сложностей стандартизации таких препаратов. В результате проведенной работы были получены 7 клонированных пептидов (4 - в *E. coli*, и 3 - в эукариотических клетках), сравнение цитотоксических свойств которых с лактаптином, показало, что пептид RL2 наиболее близок природному аналогу и именно с этим пептидом проводилась вся дальнейшая работа.

В *подразделе 3* приведены результаты физико-химического исследования первичной и вторичной структуры RL2 и показано, что RL2 представляет собой фрагмент к-казеина человека с 23 по 134 а.о. Это пролин богатый пептид, обогащенный положительно заряженными и гидрофобными аминокислотными остатками. Анализ вторичной структуры RL2 позволил сделать вывод, что RL2 является нестрого упорядоченным пептидом, способным в определенных условиях образовывать  $\alpha$ -спираль(и) в районах с 9 по 12 и/или с 35 по 42 а.о.

Наиболее значимые результаты диссертации, собственно показавшие перспективность изучения RL2 как прототипа противоопухолевого препарата, относятся к анализу цитотоксической активности, противоопухолевого и антиметастатического действия RL2 на культурах опухолевых клеток различного гистогенеза *in vitro* и моделях опухолей животных и человека *in vivo*. Описанию результатов этих исследований посвящены *подраздел 4 (in vitro)* и *подраздел 5 (in vivo)* диссертации.

В экспериментах *in vitro* было убедительно показано, что RL2 подавляет жизнеспособность опухолевых клеток человека различного гистогенеза и не влияет на жизнеспособность немалигнизированных клеток. Еще более впечатляющие результаты были получены на первичных культурах клеток молочной железы человека: оказалось, что RL2 подавляет жизнеспособность клеток, выделенных из злокачественных и доброкачественных опухолей, но не влияет на жизнеспособность "здоровых" клеток молочной железы человека. Эти данные однозначно доказывали селективность действия пептида RL2 в отношении малиглизированных клеток.

Ввиду того, что при исследованиях *in vivo* работа с опухолевыми клетками человека имеет существенные ограничения, был проведен поиск опухолевых клеток мыши 1) чувствительных к цитотоксическому действию RL2 *in vitro* и 2) способных формировать солидные и асцитные опухоли, а также метастазировать *in vivo*. По результатам проведенного скрининга клетками, удовлетворяющими этим критериям, оказались клетки гепатокарциномы А1 мыши (НА-1), которая формирует солидные опухоли при подкожной

и внутримышечной трансплантации, асцитную опухоль при трансплантации в брюшную полость и активно метастазирует в печень.

В экспериментах *in vivo* противоопухолевая активность RL2 была оценена по двум основным параметрам: увеличение продолжительности жизни животного-опухоленосителя и изменение динамики роста опухоли/размера опухоли на момент окончания эксперимента. Было убедительно показано, что RL2 эффективно тормозит развитие гепатокарциномы HA-1 мыши различной локализации (подкожная, внутримышечная, внутрибрюшинная) при различных способах введения препарата (в/в, в/бр), а диапазон терапевтических доз препарата RL2 без проявления токсических эффектов составляет 12,5 – 40 мг/кг.

Антиметастатическая активность RL2 была изучена на нескольких метастатических моделях, а именно модели спонтанного метастазирования, на модели послеоперационных метастазов с удалением первичного опухолевого узла и на модели без формирования первичного опухолевого узла. В этих экспериментах оценивали и эффективность RL2 в подавлении процесса метастазирования, и влияние терапии на продолжительность жизни экспериментальных животных. Весь комплекс проведенных исследований убедительно доказывает, что RL2 не только тормозит рост первичного опухолевого узла, но и трехкратно уменьшает площадь, занимаемую метастазами гепатомы HA-1 в печени. При этом наблюдается увеличение средней продолжительности жизни животных в группе, получавшей RL2. Весь массив данных, полученных в экспериментах *in vivo*, позволил Рихтеру В.А. сделать вывод о том, что RL2 по критериям оценки ингибирующего эффекта относится к категории препаратов умеренной эффективности и что эффект терапии RL2 проявляется при его введении на ранней стадии развития опухолевого процесса. Таким образом, полученные данные показывают, что RL2 может рассматриваться в качестве прототипа для разработки противоопухолевых лекарственных средств.

При разработке новых лекарственных препаратов необходимым условием их успешного продвижения является понимание механизма их действия на клетки/ткани мишени. Поэтому для дальнейшего продвижения RL2 в качестве противоопухолевого лекарства важно было установить механизм его онкотоксического действия. Этому посвящен *подраздел 6* диссертации Рихтера В.А.

Для лактапина, выделенного из молока человека, было показано, что пептид индуцирует гибель клеток MCF-7, сопровождающуюся морфологическими изменениями, характерными для апоптоза. При исследовании механизма цитотоксического действия RL2 на клетки MCF-7 был проведен анализ основных биохимических маркеров апоптоза клеток и по совокупности полученных сделан вывод о том, что RL2 индуцирует апоптоз опухолевых клеток как по рецептор-опосредованному, так и по митохондриальному пути. При этом регистрируются следующие признаки апоптотического процесса, индуцируемого RL2 в клетках MCF7: транслокация фосфатидилсерина на внешнюю поверхность цитоплазматической мембраны, диссипация трансмембранного потенциала митохондрий, активация инициаторных каспаз-8 и -9 и эффекторной каспазы-7, олигонуклеосомная фрагментация ДНК. Кроме того, принимая во внимание тот факт, что

на фоне низкой активации каспазы-7 происходит масштабная экспозиция фосфатитилсерина автор работы предполагает, что эффекторные каспазы вносят незначительный вклад в апоптотические изменения клеток MCF-7 под действием RL2.

Подраздел 7 диссертационной работы Рихтера В.А. посвящен идентификации белков-мишеней RL2 в опухолевых клетках. На первом этапе был изучен процесс проникновения RL2 в клетки человека. Для этого был использован конъюгат RL2 с 5(6)-карбокситетраметилпроламином, а проникновение и накопление в клетках такого конъюгата было исследовано методом флуоресцентной микроскопии. Оказалось, что пептид накапливается с приблизительно одинаковой эффективностью в опухолевых и немалигнизированных клетках и локализуется преимущественно вдоль цитоскелета клеток, что доказывает, что цитотоксическая активность RL2 не связана с его избирательным проникновением в опухолевые клетки. Для ответа на вопрос каким путем RL2 проникает в клетку была проведена серия экспериментов с использованием различных ингибиторов эндоцитоза, в которых убедительно было показано, что 1). только нистатин и метил- $\beta$ -циклодекстрин (ингибиторы путей эндоцитоза, опосредованных липидными рафтами) существенно, но не полностью снижают уровень накопления RL2-Rho в клетках; 2) даже блокировка всех путей эндоцитоза под действием азида натрия не блокирует накопление RL2 в клетках, что указывает на существование механизма проникновения RL2 в клетки отличного от эндоцитоза. Диссертант на основании сопоставления первичной структуры RL2 с последовательностями известных CPP (cell penetrating peptides) делает предположение о том, что RL2 обладает свойствами CPP и проникает в клетку не только по пути эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, но и прямым проникновением через плазматическую мембрану.

Внутриклеточные белки – мишени RL2 были выделены с помощью аффинной хроматографии на колонке с иммобилизованным RL2 с последующей идентификацией выделенных белков протеомными методами. Эти белки были достоверно идентифицированы как фрагменты  $\alpha$  и  $\beta$  цепей тубулина и  $\alpha$ -актинина-1 человека, последний из которых является структурным компонентом белком актиновых филаментов и играет важную роль в формировании цитоскелета клетки. Полученные данные позволили предположить, что при проникновении в клетку RL2 связывается с белками цитоскелета, что препятствует формированию микротрубочек и тем самым, индуцирует апоптоз в опухолевых клетках. Следует отметить, что эти результаты хорошо согласуются с результатами флуоресцентной микроскопии,

В *подразделе 8* суммированы данные о механизмах, лежащих в основе цитотоксического действия RL2 на опухолевые клетки и предложена последовательность событий, приводящая к гибели опухолевой клетки. Кратко это выглядит так: RL2 проникает в цитоплазму клетки и взаимодействует с белками цитоскелета  $\alpha$ ,  $\beta$ - тубулином и  $\alpha$ -актинином-1. Взаимодействие RL2 с  $\alpha$ -актинином-1 приводит к дестабилизации и диссоциации адгезивных комплексов, в результате чего происходит активация инициаторной каспазы-8. Связывание RL2 с  $\alpha$ ,  $\beta$ -тубулином в составе микротрубочек

приводит к высвобождению митохондриального проапоптотического фактора Bim в цитоплазму клетки. Накопление данного фактора в цитоплазме приводит к формированию митохондриальных пор и активации инициаторной каспазы-9. Далее инициаторные каспазы-8 и 9 активируют эффекторную каспазу-7, опосредующую апоптотическую гибель клетки. Таким образом, развитие апоптоза происходит как по рецептор-опосредованному, так и по митохондриальному пути.

В *подразделе 9* диссертации представлены результаты по разработке лекарственного препарата «Лактаптин» на основе пептида RL2 и проведение его доклинических исследований, в результате которых было показано, что 1) период полувыведения препарата составляет 15,75 минут, что характерно для многих пептидных и белковых препаратов, 2) препарат равномерно распределяется по органам и тканям, с повышенным накоплением в почках; 3) «лактаптин» является безопасным при однократном и многократном внутривенном введении животным. Таким образом, в доклинических исследованиях было показано, что несмотря на достаточно высокую противоопухолевую и антиметастатическую эффективность, RL2, как и большинство пептидных препаратов, имеет два существенных недостатка – короткий период полужизни в организме и равномерное распределение по органам и тканям, а для улучшения его фармакологических свойств необходимо использовать или высокие дозы препарата или увеличить его таргетность в отношении опухолевых клеток.

Решение проблемы повышения таргетности лактаптина предложено в *подразделе 10* диссертации. Для этого методом фагового дисплея были найдены опухоль-адресующие пептиды и генно-инженерными методами получены рекомбинантные белки, содержащие фьюжн RL2 с опухоль-адресующими пептидами. В экспериментах *in vivo* было показано, что тропность к опухоли таких рекомбинантных белков в 2 - 5 раз выше, чем RL2, при этом не наблюдалось снижения цитотоксической активности RL2. Препаратом – лидером стал слитый пептид T3-RL2, для которого индекс торможения роста опухоли составил 80% против 37% для RL2. Подход повышения таргетности белковых препаратов, предложенный в диссертации Рихтера В.А. показал свою жизнеспособность и может быть использован для повышения противоопухолевой эффективности других белковых препаратов.

Завершают диссертационную работу в виде научного доклада такие разделы как Заключение, Выводы и Список публикаций, в которых изложены результаты исследований. В «Заключении» автором представлено полное обобщение полученных результатов и их обсуждение с позиций современных представлений. Сформулированные выводы полностью соответствующих цели, поставленным задачам, и адекватно отражены в положениях, выносимых на защиту. В целом, диссертационная работа Рихтера В.А. в виде научного доклада хорошо написана и иллюстрирована, в достаточной степени отражает весь массив полученных данных и дает представление об основных положениях работы. Существенных замечаний по диссертации В.А. Рихтера нет.


## Заключение

Диссертационная работа Рихтера Владимира Александровича «Лактаптин – онкотоксический пептид молока человека», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, является цельным завершенным научным исследованием, в котором решена крупная научная проблема - разработка противоопухолевого препарата на основе цитотоксического пептида человеческого молока, включающая все стадии от открытия ранее неизвестного онкотоксического пептида до создания на его основе противоопухолевого препарата «Лактаптин» и проведения доклинических исследований разработанного препарата. Актуальность поставленных и решенных в диссертационной работе задач, большой объем экспериментальных данных, значимость и достоверность полученных научных результатов, имеющих важное народно-хозяйственное значение, обоснованность научных положений и выводов не вызывают сомнений. Это позволяет заключить, что представленная диссертационная работа в виде научного доклада соответствует требованиям и критериям, установленным пп. 2.1.-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, утвержденного Приказом от 10 октября 2019 г. № 55 (г. Новосибирск) предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени доктора биологических наук. Тема диссертации и ее содержание, а также основные положения и сформулированные выводы, соответствуют паспорту специальности 1.5.3 - Молекулярная биология. Автор диссертации Рихтер В.А. несомненно заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по указанной специальности.

## Официальный оппонент

Заведующая лабораторией биохимии нуклеиновых кислот  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН

Зенкова Марина Аркадьевна



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8  
Телефон: (383)363-51-60  
Эл. почта: [marzen@niboch.nsc.ru](mailto:marzen@niboch.nsc.ru)

Подпись Зенковой Марины Аркадьевны заверяю  
ученый секретарь ФГБУН Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН  
к.б.н. Логашенко Е.Б.



«20» февраля 2024 г.