

## ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Черникова Ивана Вячеславовича «Влияние структуры липофильных конъюгатов малых интерферирующих РНК на их накопление в клетках и биологическую активность *in vitro* и *in vivo*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Малые интерферирующие РНК (siРНК) являются наиболее перспективным видом терапевтических олигонуклеотидных препаратов действующих на мРНК, поскольку механизм их функционирования является каталитическим и каждая молекула siРНК способна инактивировать несколько молекул мРНК-мишеней. Со времени открытия явления РНК-интерференции в 1998 Эндрю Файером и Крейгом Мелло и разработки первых siРНК, запускающих процесс РНК-интерференции в клетках млекопитающих, был достигнут существенный прогресс в разработке терапевтических siРНК. Были разработаны химические модификации РНК, модулирующие их активность и стабилизирующие их в биологических средах, однако, доставка siРНК в клетки-мишени *in vitro* и, особенно, *in vivo* остаётся в настоящее время наиболее сложной и актуальной задачей, решение которой необходимо для внедрения результатов биомедицинских исследований в клиническую практику.

В отличие от других подходов прямое конъюгирование siРНК с молекулами-доставщиками является наиболее практичной технологией доставки siРНК. Потому целью работы Ивана Вячеславовича являлось исследование влияния структуры холестеринового конъюгата siРНК на его накопление и биологическую активность в опухолевых клетках различного происхождения и определение накопления и биологической активности выбранного конъюгата *in vivo*. Таким образом, цель данной работы является актуальной для разработки препаратов направленного подавления экспрессии генов.

Диссертация Черникова И.В. имеет традиционную структуру. Во введении охарактеризовано состояние проблемы направленного подавления экспрессии генов, обоснована актуальность исследования и сформулированы его цель и задачи.

Обзор литературы (Глава 1) написан очень подробно, ясно и логично и включает в себя описание механизма РНК-интерференции; основное внимание уделено химическим модификациям, используемым для стабилизации siРНК, а так же исчерпывающе описаны опубликованные к настоящему времени биоконъюгаты siРНК. В целом, обзор литературы

дает полную картину состояния проблемы, связанной с поставленными в работе целью и задачами, и позволяет оценить значимость полученных автором данных для решения проблемы в целом.

**Экспериментальная часть** содержит детальное, четкое и воспроизводимое описание современных подходов и методов, использованных в работе. Полнота этой главы диссертации свидетельствует о том, что работа выполнена с использованием современных методов молекулярной биологии и не оставляет сомнений в достоверности полученных результатов и адекватности их анализа.

**Глава 3** содержит представленные четко и последовательно результаты, которые хорошо иллюстрированы, что убеждает в полноте проведенного исследования и достоверности полученных результатов, а подробное обсуждение результатов диссертационной работы позволяет в полной мере оценить её значимость.

Особое внимание в этой главе автор уделил структурно-функциональным закономерностям. Он показал, что природа липофильной молекулы, место присоединения и длина, но не стабильность линкера в составе конъюгата siРНК влияют на её взаимодействие с клетками различного происхождения *in vitro* и *ex vivo* при доставке в клетки без трансфекционного агента. Данные параметры важны для выбора наиболее эффективного биоконъюгата.

Гемопозитические клетки считаются наиболее сложными для доставки в них siРНК, при этом разработка систем доставки siРНК в данные клетки впоследствии может способствовать значительному увеличению эффективности антиретровирусной терапии и эффективности лечения опухолевых заболеваний крови. Поэтому автором было уделено особое внимание оценке возможности использования биоконъюгатов для доставки siРНК в гемопозитические клетки. Он показал, что, несмотря на высокую эффективность накопления Ch6-siРНК в опухолевых клетках гемопозитического происхождения, конъюгат не обладал в них биологической активностью, в то время как в клетках карциномы KB-3-1 и KB-8-5, в том числе в лекарственно устойчивых клетках (KB-8-5) конъюгат был активен. Для установления причин такого отличия был изучен механизм накопления флуорофор-меченого Ch6-siРНК в клетках KB-3-1 и K562. Иваном Вячеславовичем было установлено, что его накопление происходит по нескольким механизмам, однако, использованные в работе ингибиторы разных типов эндоцитоза не снижали биологическую активность конъюгата без флуоресцентной метки. Данный факт указывает на то, что большая часть конъюгата накапливается в клетках «непродуктивно» и не участвует в РНК-интерференции. Поэтому, к сожалению, полученные данные пока не позволяют использовать siРНК для применения в гемопозитических клетках. Однако,

исследование «продуктивного» способа проникновения siРНК в клетки-мишени может способствовать разработке биоконъюгатов siРНК более эффективно накапливающихся в различных типах клеток.

Следует отметить, что наиболее простым и распространённым в лабораторной практике методом изучения локализации и накопления siРНК в клетках является ведение флуоресцентных меток в их состав. Однако, в данной работе автором впервые было показано, что конъюгирование флуорофоров с холестерин-содержащими siРНК может влиять на их накопление и биологическую активность при доставке без трансфекционного агента.

Исследования на животных моделях являются важной частью оценки терапевтического потенциала препарата, поэтому для исследования биораспределения и биологической активности холестеринового производного анти-*MDR1* siРНК выбранной структуры автор использовал лекарственно-устойчивой опухолевую модель клеток человека KB-8-5 привитые иммунодефицитным мышам линии SCID. При переходе от культуры клеток к воздействию на организм первоочередной задачей является обеспечение эффективного накопления препарата в органах-мишенях. Поэтому, исключительно важным является обнаруженный автором факт, что присоединение холестерина к siРНК обеспечивает её эффективное накопление в печени и в опухоли и уменьшает её выведение почками после i.v. инъекции. Другим важным параметром является эффективность биологического действия, то есть способность подавлять экспрессию гена-мишени. Автором было установлено, что эффективное подавление гена-мишени и снижение уровня Р-гликопротеина в привитой ксенографтной опухоли наблюдается после внутривенной, интраперитонеальной или перитуморальной инъекции Ch6-siРНК.

Таким образом, представленная к защите работа Черникова Ивана Вячеславовича «Влияние структуры липофильных конъюгатов малых интерферирующих РНК на их накопление в клетках и биологическую активность *in vitro* и *in vivo*», представляет собой законченное исследование, в котором впервые проведено систематическое изучение влияния структуры siРНК на их интерферирующую активность и был разработан ингибитор экспрессии Р-гликопротеина, показавший свою эффективность действия *in vivo*, который может рассматриваться как потенциальный терапевтический препарат для преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолей.

Тем не менее, у меня есть несколько замечаний. Имеет место путаница в использовании русских и латинских терминов, например, AlexaFluor 488 и Алекса 488. На страницах 47 и 49 в таблице биоконъюгатов siРНК не приведена схема химической

модификации DMВ и её расшифровка. В главе 3.4 при исследовании влияния ингибиторов эндоцитоза на накопление холестерин-содержащей siРНК *in vitro* вместо метода проточной цитофлуорометрии и использования флуорофор-меченых siРНК корректнее было бы использовать stem-loop ПЦР и siРНК без флуорофора, поскольку гидрофильный флуорофор AlexaFluor-488 мог повлиять на внутриклеточный транспорт конъюгата, как описано в главе 3.5.

Однако эти замечания носят технический характер и ни в коей мере не умаляют достоинств диссертационной работы.

Диссертационная работа Ивана Вячеславовича является научно-квалификационной работой, выполненной на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях, и представляет собой законченное исследование влияния структуры липофильных конъюгатов малых интерферирующих РНК на их накопление в клетках и биологическую активность.

Содержание автореферата хорошо отражает содержание работы, иллюстрирует основные положения диссертации, выносимые на защиту, и выводы диссертации.

Работа изложена на 162 страницах, содержит 38 рисунков и 7 таблиц, библиография содержит 400 литературных источников. Результаты работы апробированы на 9 международных конференциях, опубликованы в 6 статьях в ведущих зарубежных и российских изданиях и могут представлять интерес для Института биоорганической химии РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Института Цитологии и Генетики СО РАН, Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и других организаций, изучающих управляемую регуляцию экспрессии генов и доставку нуклеиновых кислот в клетки-мишени.

Таким образом, по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.03 «молекулярная биология» (биологические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации, Черников Иван Вячеславович, без сомнения, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 «молекулярная биология» (биологические науки).

19 ноября 2019

д.б.н., профессор, г.н.с., Прасолов Владимир Сергеевич  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН  
/Прасолов В.С./

Почтовый адрес: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32,

E-mail: [prassolov45@mail.ru](mailto:prassolov45@mail.ru)

Телефон: +79161464167; +7(499)135-98-49

Подпись д.б.н. проф. Прасолова В.С. заверяю:

Ученые секретарь ФГБНУ

«Институт молекулярной биологии им.

В.А. Энгельгардта» РАН

кандидат ветеринарных наук

Бочаров Александр Анатольевич

ГСП-1, 119991, г. Москва,

ул. Вавилова, д. 32; телефон: 8(499) 135-23-11

E-mail: [isinfo@eirnb.ru](mailto:isinfo@eirnb.ru)

