

## **ОТЗЫВ**

Официального оппонента о диссертационной работе Чинак Ольги Александровны «Структура пептида RL2 и механизм его проникновения в опухолевые клетки человека», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 «молекулярная биология».

### **Актуальность темы исследования**

Разработка новых лекарственных средств является одной из ключевых задач современной молекулярной биологии. Современные и актуальные тенденции развития биофармацевтической отрасли касаются улучшения качества жизни пациента и включают два ключевых направления: создание препаратов с направленной доставкой и увеличение стабильности и полужизни биологически активных молекул. Оба подхода направлены на снижения дозы препарата, необходимой для эффективного действия, что в свою очередь позволяет снизить токсичность и прочие побочные эффекты.

При разработке подходов таргетной доставки препаратов ключевой проблемой является преодоление физиологических барьеров, таких как клеточная мембрана, которая является непроницаемой для гидрофильных соединений и макромолекул. В связи с этим, разработка подходов к преодолению фосфолипидного бислоя является перспективным путем для создания инновационных и высокоэффективных лекарственных средств. В частности, одним из активно развивающихся подходов в рамках данного направления является поиск, исследование и разработка способов применения белков и пептидов, способных к преодолению клеточных мембран.

Работа Чинак Ольги Александровны посвящена исследованию нового пептида рекомбинантного аналога лактапина RL2, который интересен своей способностью к преодолению клеточной мембраны. В частности, исследования посвящены изучению структурных особенностей данного пептида, механизму его действия и применимости в качестве платформы для трансмембранной доставки нуклеиновых кислот.

### **Научная и практическая новизна**

В диссертации Чинак О.А. представлены новые и ценные научные результаты. Исследованы структурные особенности рекомбинантного пептида RL2: пептид обладает частично неупорядоченной структурой и склонен к образованию альфа-спиралей. Полученный авторами препарат представляет собой смесь рекомбинантного RL2 в мономерной и стабилизированной межмолекулярной дисульфидной связью димерной форме.

Помимо структурных особенностей, автор исследовал механизм проникновения RL2 через клеточную мембрану, а также показал возможность доставки нуклеиновых кислот через мембрану в составе нековалентных комплексов с RL2. Полученные результаты представляют интерес для дальнейшего продвижения пептида RL2 в качестве платформы для трансмембранной доставки биологических соединений.

### **Структура диссертации**

Диссертационная работа Чинак О.А. имеет традиционную структуру и включает следующие разделы: “Список сокращений”, “Оглавление”, “Введение”, “Обзор литературы”, “Экспериментальная часть”, “Результаты и обсуждение”, “Заключение”, “Выводы”, “Список работ, опубликованных по теме диссертации”, “Список литературы” и “Приложение”. Работа изложена на 135 страницах, включает 41 рисунок, 4 таблицы и приложение с 6 рисунками. Список литературы содержит 202 литературных источника.

Во введении кратко изложена суть научной проблемы, ее актуальность и научная новизна. Сформулирована цель исследования и задачи, решение которых необходимо для ее достижения. Изложены положения, выносимые на защиту, апробация результатов, структура и объем диссертации, а также личный вклад автора.

В обзоре литературы представлены основные сведения о существующих пептидах, способных преодолевать клеточную мембрану (Cell-Penetrating Peptides, CPP). Объяснена актуальность исследования соединений с данной биологической активностью, изложена история открытия и исследований CPP. Описана классификация CPP по физико-химическим свойствам и вторичной структуре. Рассмотрены механизмы проникновения CPP сквозь клеточные мембраны, биологические функции этих пептидов и возможности их применения в медицине, вплоть до примеров препаратов на стадии клинических испытаний. Отдельный раздел посвящен объекту исследования - рекомбинантного аналога лактапина RL2. Описаны проведенные ранее исследования в Институте химической биологии и фундаментальной медицины, в том числе открытие пептида и ряд данных о его биологической активности.

Экспериментальная часть диссертации описывает использованные материалы, оборудование и методики: наработка, выделение и очистка рекомбинантного пептида, аналитические методы такие как спектрометрия динамического светорассеяния, атомно-силовая микроскопия, спектроскопии кругового дихроизма, флуоресцентная микроскопия и проточная цитофлуориметрия. Описаны методы синтеза конъюгата RL2 с флуоресцентной меткой и получения нековалентных комплексов RL2 с нуклеиновыми кислотами.

В разделе “Результаты и обсуждение” автор представляет полученные результаты исследований в соответствии с поставленными целями и задачами. Первый подраздел результатов посвящен исследованию структурных особенностей пептида RL2. Показано, что полученный препарат пептида представляет собой смесь стабилизированного за счет дисульфидной связи гомодимера RL2 и мономерной формы – аддукта с  $\beta$ -меркаптоэтанолом. Показано, что RL2 является частично упорядоченным пептидом, установлен участок, склонный к образованию альфа-спиралей. Показана склонность RL2 к образованию коллоидных частиц, исследован их размер и форма.

Второй подраздел результатов посвящен исследованию способности RL2 к проникновению внутрь клеток. Описано получение конъюгата RL2 с флуоресцентной меткой. Показана возможность и исследован механизм преодоления пептидом мембраны клеток человека.

Третий подраздел результатов посвящен исследованию применимости RL2 для трансмембранного транспорта нуклеиновых кислот. Автор смог разработать подходы RL2-опосредованной внутриклеточной доставки плазмидной ДНК, а также коротких одно- и двухцепочечных РНК.

Выводы соответствуют поставленным целям и задачам. Полученные результаты подтверждены экспериментальными данными и не вызывают сомнений. Список работ, опубликованных по результатам исследований включает статьи, опубликованные в журналах *Molecules* (IF= 4.927, Q2 WoS) и *Frontiers in Pharmacology* (IF=5.988, Q1 WoS). Список литературы включает 202 источника, в том числе множество современных публикаций, полностью отражающих современное состояние исследований по теме диссертации на данный момент. Приложение содержит шесть вспомогательных иллюстраций.

### **Оценка содержания диссертационной работы**

Работе Чинак О.А. представляет собой целостное исследование пептида RL2 как перспективной и инновационной платформы для трансмембранного транспорта биологически активных соединений. Значительным преимуществом рассматриваемого исследования является комплексный подход в постановке и решении задач: проведены исследования от структуры пептида и его механизма проникновения сквозь мембрану до демонстрации применимости RL2 для трансмембранного транспорта на примере нуклеиновых кислот. Также хочется отметить очень высокий технический уровень работы: исследование было выполнено с использованием широкого многообразия актуальных и современных методов и оборудования.

При этом, к работе Чинак О.А. есть ряд вопросов дискуссионного характера, раскрытие которых могло бы быть полезным для развития тематики диссертационного исследования. Так, автор в литературном обзоре фокусируется в первую очередь на многообразии существующих CPP, уделяя меньшее внимание непосредственно объекту исследования и его ближайшим структурным аналогам. Исследуемый пептид RL2 является фрагментом-производным к-казеина человека с С-концевой аффинной меткой His-tag. Так как работа автора посвящена исследованию структуры и механизма действия пептида RL2, аналогичная информация о к-казеине является крайне важной, особенно в контексте сравнения свойств искусственного пептида и природного белка. Например, автор в результатах обсуждает склонность к-казеина и RL2 к образованию коллоидных частиц, но желательно чтобы этот аспект был также детально обсужден в литературном обзоре. Помимо этого, есть еще ряд других вопросов, ответы на которых могут более полно раскрыть структурные результаты диссертационной работы:

- 1) В диссертации представлены результаты исследования вторичной структуры RL2, в том числе определен участок склонный к образованию альфа-спиралей. Есть ли аналогичные данные для соответствующего участка к-казеина человека? Если да, то как они согласуются с полученными результатами. Вторичная структура RL2 аналогична природному к-казеину или есть значительные отличия?
- 2) Автор показал, что RL2 в основном представляет собой гомодимер, стабилизированный за счет межмолекулярной дисульфидной связи. Аминокислотная последовательность RL2 содержит неспаренный остаток цистеина. Какую роль данный остаток играет в природном к-казеине?
- 3) По какой причине дизайн пептидов RL1 и RL2 был осуществлен на основе интрон-экзонной организации гена к-казеина человека, а не на аминокислотной последовательности, вторичной структуры или продуктов трипсинолиза к-казеина?
- 4) В соответствии с обсуждением особенностей аминокислотной последовательности RL2, положительно заряженные аминокислоты играют ключевую роль в механизме действия CPP. В связи с этим очень интересно для обсуждения возможное влияние аффинной метки His-tag (6 положительно заряженных остатков гистидина) на биологическую активность RL2. Этот вопрос является менее актуальным если рассматривать RL2 в качестве конечной фармацевтической субстанции для разработки конъюгатов, но может быть интересным и полезным для возможной разработки гибридных белков на

основе RL2. В частности, в качестве потенциально очень интересного направления для дальнейших исследований можно предложить создание гибридных конструкций RL2 с пептидами, которые могли бы обеспечить тканеспецифичную доставку молекулы.

Помимо интересных деталей, носящих в большей степени фундаментально-научное значение, хотелось бы отметить один важный аспект более прикладного характера. В соответствии с представленными результатами, исследованный препарат представляет собой смесь димерной и мономерной формы. Значительный интерес представляет возможное различие биологической активности мономерной и димерной формы. Поэтому, получение и исследование биологической активности препарата либо строго в мономерной, либо в димерной форме может быть очень интересным направлением для дальнейшего развития тематики диссертации. Подобные исследования могут быть очень ценными для дальнейшей разработки и стандартизации лекарственных препаратов на основе RL2.

Помимо замечаний по материалу исследований, еще стоит отметить, что текст диссертации и представленные рисунки содержат ряд незначительных неточностей технического характера, никак не влияющих на суть излагаемой работы и результатов.

В заключение следует подчеркнуть, работа Чинак О.А. представляет собой целостное, комплексное и научно значимое исследование. Изложенные вопросы в большей степени представляют собой технические замечания и потенциально интересные направления для дальнейших исследований и развития тематики.

### **Достоверность полученных результатов**

Результаты работы Чинак О.А. не вызывают сомнений, так как получены с применением современных аналитических методов, в том числе спектрометрии динамического светорассеяния, атомно-силовая микроскопии, спектроскопии кругового дихроизма, флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. В пользу достоверности осуществлённых исследований и значимости полученных результатов свидетельствует тот факт, что материалы диссертации прошли рецензирование и опубликованы в журналах с высоким импакт-фактором ( $IF > 5$ ), в том числе первого квартала WoS.

### **Заключение**

Таким образом, по актуальности темы, объёму, новизне и обоснованности полученных данных представленная диссертационная работа полностью соответствует критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в

Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, и оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Таким образом, Ольга Александровна Чинак, без сомнения, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Рук. лаб. Биофармацевтических технологий

ФГБУН Институт биоорганической химии

им. Академиков М.М. Шемякина и

Ю.А. Овчинникова РАН

Доктор химических наук

Есипов Роман Станиславович

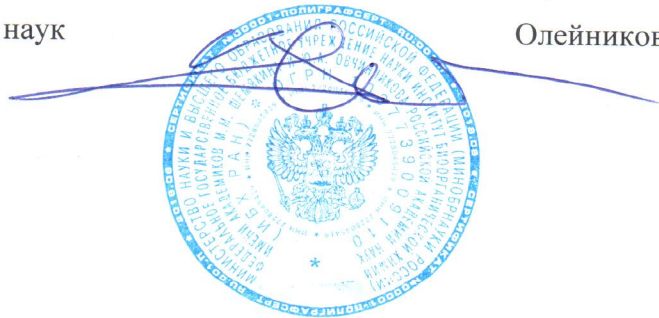
Адрес: 117997, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук  
Эл. адрес: esipov@ibch.ru

Подпись Есипова Р.С. заверяю

Учёный секретарь ФГБУН Институт биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Доктор физ.-мат. наук

Олейников В. А.



25.08.2023