



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

01.12.14 № 28-217 1-1001

на № _____ от _____



Отзыв ведущей организации

О теоритической и практической ценности диссертации Яббарова Никиты Григорьевича “Разработка подхода к созданию универсальных систем направленной доставки в опухолевые клетки на основе дендримеров”, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – “молекулярная биология”.

Актуальность работы.

На сегодняшний день опухолевые заболевания являются одной из основных причин смертности среди населения – около 15 % от общего числа зарегистрированных случаев в мире в 2012-2013 годах. Множество факторов способствуют поддержанию такого высокого уровня, в частности, низкая выявляемость заболевания на ранних стадиях, неэффективность хирургических вмешательств и радиотерапии на поздних стадиях при метастазировании опухолевой ткани, низкая эффективность химиотерапии, а также развитие тяжелых системных побочных эффектов, множественной лекарственной устойчивости и многие другие, и, как следствие этих факторов, наблюдается высокая частота смертельных исходов среди больных – средняя пятилетняя выживаемость составляет около 65 %. Вышеуказанные причины несколько десятилетий назад привели к началу ряда исследований, целью которых являлся поиск и создание так называемой “волшебной пули” (П. Эрлих), необходимой для целенаправленного лечения опухолевых заболеваний, на нанося при этом ущерба пациенту.

И хотя уже сегодня мы можем наблюдать результаты этого, еще не завершившегося, поиска, развившиеся в новые подходы к лечению, а также созданию принципиально новых диагностических и химиотерапевтических препаратов со сниженной токсичностью и

повышенным терапевтическим индексом, часть из которых уже является доступной в клинике, проблема онкологических заболеваний все еще далека от решения.

Диссертационная работа Н.Г. Яббарова посвящена решению этой актуальной проблемы и направлена на изучение возможности создания универсальных систем направленной доставки биологически-активных соединений в опухолевые клетки на основе мультифункциональных дендритных полимеров, а также белковых и пептидных векторных молекул. В связи с вышеизложенным, тема диссертационной работы Н.Г. Яббарова “Разработка подхода к созданию универсальных систем направленной доставки в опухолевые клетки на основе дендримеров” безусловно, является актуальной.

Научная новизна работы.

Для решения проблемы описанной выше, автором диссертационного исследования была сформулирована цель работы – исследование эффективности использования рекомбинантного С-концевого домена альфа-фетопротейна человека (rAFP3D), эпидермального фактора роста (EGF) и пептидных лигандов рецептора EGF (MY и YH) в качестве векторных агентов при создании универсальной системы направленной доставки биологически-активных соединений в опухолевые клетки. Для достижения цели был поставлен ряд задач:

- 1) создание штамма-продуцента rAFP3D, экспрессия, очистка, фолдинг и характеристика полученного белка;
- 2) исследование связывания рекомбинантного белка rAFP3D с рецептором AFP, а также EGF и синтетических пептидов (YH и MY) с рецепторами эпидермального фактора роста;
- 3) синтез конъюгатов флуоресцеина и доксорубина с макромолекулярным носителем (РАМАМ дендримеры 2-го поколения) и белковыми и пептидными векторными молекулами (rAFP3D, EGF, YH и MY);
- 4) исследование эффективности интернализации и внутриклеточного распределения конъюгатов в сравнении с интернализацией векторных белков (пептидов), дендримеров и доксорубина;
- 5) исследование возможности преодоления множественной лекарственной устойчивости с помощью синтезированных систем направленного транспорта Dox;
- 6) оценка противоопухолевой эффективности Dox в составе полученных систем направленной доставки *in vitro*.

Диссертационная работа Н.Г. Яббарова построена по традиционному плану и состоит из введения, раздела обоснования целей и задач работы, обзора литературы, раздела использованных в работе материалов и методов, результатов, обсуждения полученных результатов, выводов и списка использованной литературы. При использовании данных, полученных в соавторстве, приведены необходимые ссылки. Работа изложена на 119

страницах машинописного текста и включает 2 таблицы и 50 рисунков.

Во введении автором приводится информация о современном состоянии в области терапии онкологических заболеваний, в том числе об основных подходах и используемых методах. Описаны основные факторы, обуславливающие низкую эффективность многих химиотерапевтических препаратов, а также такие последствия их применения, как генерализованные побочные эффекты и развитие множественной лекарственной устойчивости. На основе приведенных данных автором обосновывается практическая значимость и актуальность работы, а именно – разработка новых подходов к терапии злокачественных новообразований, одним из которых является создание систем направленной доставки лекарственных препаратов.

Обзор литературы содержит подробный анализ публикаций по теме работы и говорит о хорошем знании автором данной области. В первой части обзора содержится актуальная информация об общих методах и направлениях процесса разработки препаратов направленного действия, а также обосновывается необходимость разработки препаратов подобного рода. Автором приводится информация о коммерчески-доступных препаратах направленного действия, представляющих собой, в основном, моноклональные антитела. В следующем разделе описаны основные виды носителей, используемых для пассивной доставки лекарственных препаратов, представленных наночастицами (препарат включен в полимерную матрицу), липосомами или дендримерами (препарат может быть как включен в молекулу дендримера, так и конъюгирован с поверхностными группами), которые и были использованы автором в работе. Также отмечены достоинства подобных носителей и их недостатки, на основе которых указывается на необходимость придания такого рода системам ненаправленного действия векторных свойств, за счет присоединения к ним лигандов рецепторов находящихся на поверхности клеток-мишеней. Центральное место в обзоре занимает подробное описание биологических функций, рецепторов и непосредственно векторных молекул использованных в работе, а именно, фрагмента альфа-фетопротейна (AFP) человека, эпидермального фактора роста (EGF) и двух пептидов (YH и MY), взаимодействующих с рецептором EGF. В заключительной части обзора описываются молекулярные механизмы рецептор-опосредованного эндоцитоза, посредством которого возможна транспортировка конъюгатов и комплексов различных биологически-активных соединений с лигандами рецепторов. Отмечено, что использование подобного механизма направленной доставки исследуемых соединений способствует преодолению одной из причин множественной лекарственной устойчивости, а именно – транспорт молекул препарата внутрь клеток минуя действие ABC-транспортеров.

Обзор литературы написан хорошим научным языком. В заключении обзора кратко

обосновывается цель диссертационной работы.

Раздел “Материалы и методы” содержит информацию об использованных при выполнении работы молекулярно-биологических методах. В разделе описаны методы получения рекомбинантного белка в бактериальной системе экспрессии, современные методы конъюгации биологически-активных молекул, методы работ с культурами клеток эукариот. Работа выполнена на высоком методическом уровне, с использованием актуальных методов и современной приборной базы. Эксперименты описаны подробно и могут быть воспроизведены другими исследователями.

В разделах “Результаты” и “Обсуждение” автором изложены и интерпретированы основные данные полученные в ходе выполнения диссертационной работы, которые можно разбить на две отдельные части:

- 1) в первой части описываются и обсуждаются данные связанные с синтезом систем направленной доставки на основе дендримеров и векторных молекул, а также получением компонентов этих систем;
- 2) во второй части описываются и обсуждаются результаты испытаний полученных конъюгатов *in vitro*.

В первой части описан метод ренатурации векторного белка гAFP3D, полученного в виде телец включения, в подвижной фазе с помощью гель-проникающей хроматографии, которая, в отличие от ранее описанных методик для гAFP3D, позволила практически полностью избежать потерь белка в процессе фолдинга. Кроме того, предложенный метод подразумевает использование меньших количеств реагентов при схожем конечном выходе целевого белка, в сравнении с ренатурацией методом разбавления, при этом отсутствует связывание гAFP3D с носителем и изменение свойств последнего как, например, при фолдинге иммобилизованного на аффинном носителе белка. Также, данный метод позволяет провести очистку и ренатурацию гAFP3D в один этап. Приведенные причины делают данный метод экономически-возможным для осуществления в масштабах промышленного биотехнологического производства белка.

Первую часть раздела завершает описание получения конъюгатов полиамидаминовых дендримеров 2-го поколения с рекомбинантными векторными белками гAFP3D, EGF, а также с пептидными лигандандами рецептора EGF, обозначенные автором как MY и YH. Синтезированные конъюгаты далее были использованы в качестве поливалентных носителей для направленной доставки в клетки мишени флуоресцеина и цитотоксического препарата – доксорубицина (Dox). Разработана методика присоединения доксорубицина к молекуле дендримера с помощью кислотолабильного линкера – остатка цис-аконитовой кислоты, при этом показан pH-зависимый профиль высвобождения антибиотика.

В начале второй части раздела представлен анализ поглощения клетками-мишенями

синтезированных конъюгатов, который был дополнен анализом внутриклеточного распределения. Так, высокие уровни поглощения конъюгатов целевыми клетками, несущими рецепторы указанных лигандов, совместно с данными внутриклеточного распределения при коротких временах инкубации (до 4-х часов), в том числе данные исследования колокализации конъюгатов с маркером лизосом LAMP2, говорят о рецептор-опосредованном характере эндоцитоза синтезированных комплексов. Следует также отметить, что высокие уровни поглощения конъюгата rAFP3D-G2-Dox наблюдались также в случае резистентной к доксорубину линии клеток SKVLB, что свидетельствует о преодолении множественной лекарственной устойчивости при применении доксорубина в составе указанного выше конъюгата. Селективность действия конъюгатов была подтверждена в экспериментах с контрольными клетками, на поверхности которых отсутствуют рецепторы AFP или EGF, соответственно. Нельзя не обратить внимания на тот факт, что высвобождение доксорубина из конъюгата, имеющего в составе фрагмент AFP, и появления его флуоресценции в ядрах клеток наблюдается уже после 4 ч инкубации, в то время как для конъюгатов с лигандами EGFR требовалось больше времени.

В последней части раздела приведены данные исследования цитотоксической активности конъюгатов. В целом, можно сказать, что полученные конъюгаты, несущие векторные молекулы, на линиях клеток чувствительных к доксорубину показывали токсичность немного меньшую, либо сопоставимую с активностью свободного антибиотика. Но при этом нельзя не отметить следующие факты:

- 1) цитотоксическая активность конъюгата rAFP3D-G2-Dox, имеющего в составе фрагмент AFP, для резистентной к линии клеток SKVLB была близка к активности того же конъюгата в отношении чувствительной к антибиотику линии клеток SKOV3, что говорит о полном обращении множественной лекарственной устойчивости. Аналогичными, но выраженными в меньшей степени, свойствами обладали конъюгаты, содержащие лиганды EGFR, что по всей видимости связано с особенностями эндоцитоза и рециклирования рецептора;
- 2) все синтезированные конъюгаты, содержащие векторные молекулы, были малотоксичными для контрольных клеток, не достигая значений IC50 в исследованных диапазонах концентраций.
- 3) В целом диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне, а получены данные представляют интерес для области разработки средств направленной доставки.

Практическая значимость работы обусловлена разработкой оптимального и экономичного метода фолдинга рекомбинантного белка rAFP3D содержащего 6 дисульфидных связей.

Полученные же конъюгаты векторных белков и дендримеров представляют интерес не только для доставки противоопухолевых препаратов, но и широко ряда соединений – от небольших молекул до пептидов и генетических конструкций, в зависимости от задач исследователя, тем более, что разработанные ранее, и широко применяемые сегодня для конъюгирования биологических молекул, реагенты для так называемой “клик-химии” позволяют существенно упростить процесс синтеза подобного рода систем направленной доставки.

Все шесть выводов диссертационной работы логично вытекают из полученных данных и полностью соответствуют представленным результатам.

Список литературы содержит ссылки на ... публикаций.

Материалы диссертационной работы широко представлены в отечественных и международных научных изданиях.

Вопросы и замечания.

Несмотря на высокий методический научный уровень, работа не лишена определенных недостатков:

1. В работе имеется некоторое количество опечаток и неудачных выражений;
2. Отсутствуют данные о влиянии на жизнеспособность клеток векторных белков и пептидов. Как известно, EGF – сильнейший митоген, не влияет ли это на эффективность конструкций, содержащих в качестве вектора EGF или его пептидных фрагментов? Данные о влиянии на пролиферативную активность клеток AFP довольно противоречивы. А как влияет на выживаемость его рекомбинантный фрагмент?
3. Были ли проведены испытания конъюгатов на животных?

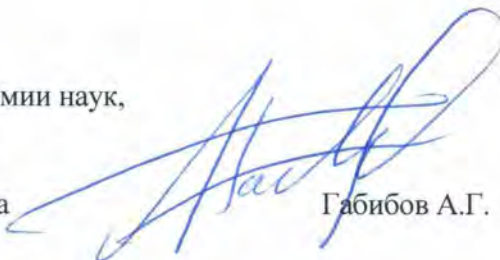
Перечисленные замечания не снижают общую положительную оценку работы.

Заключение.

Диссертация Яббарова Никиты Григорьевича “Разработка подхода к созданию универсальных систем направленной доставки в опухолевые клетки на основе дендримеров”, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в которой предлагается и исследуется один из подходов к решению важнейшей проблемы не только молекулярной онкологии, но всей области связанной с направленной доставкой биологически-активных веществ. Диссертация удовлетворяет требованиям п. 9 “Положения о порядке присуждения ученых степеней”, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Яббаров Н.Г. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – “Молекулярная биология”.

Работа рассмотрена и обсуждена на семинаре лаборатории биокатализа ФГБУН Институт
Биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
(протокол № 21 от 2 декабря 2014г.).

Член-корреспондент Российской академии наук,
доктор химических наук, профессор,
заведующий лабораторией биокатализа



Габибов А.Г.

Подпись А.Г.Габибова заверяю
Ученый секретарь ИБХ РАН д.ф-м.наук



В.А.Олейников

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Адрес: 117997, Российская Федерация, Москва ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

Веб-сайт: www.ibch.ru

E-mail: office@ibch.ru

Телефон: +7 (495) 335-01-00

Факс: +7 (495) 335-08-12

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Fomich M.A., Kvach M.V., Navakouski M.J., Weise C., Baranovsky A.V., Korshun V.A., Shmanai V.V. Azide phosphoramidite in direct synthesis of azide-modified oligonucleotides // *Org. Lett.* 2014. V. 16. Iss. 17. P. 4590-4593.
2. Osterman I.A., Ustinov A.V., Evdokimov D.V., Korshun V.A., Sergiev P.V., Serebryakova M.V., Demina I.A., Galyamina M.A., Govorun V.M., Dontsova O.A. A nascent proteome study combining click chemistry with 2DE // *Proteomics* 2013. V. 13. Iss. 1. P. 17-21.
3. Ustinov A.V., Stepanova I.A., Dubniakova V.V., Zatsepin T.S., Nozhevnikova E.V., Korshun V.A. Modification of nucleic acids using [3+2] dipolar cycloaddition of azides and alkynes // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2010. V. 36. Iss. 4. P. 401-445.
4. Iaroslavov A.A., Kaplan I.V., Erokhina T.N., Morozov S.I.u., Solovev A.G., Leshchiner A.D., Riakhnianskaia A.A., Malinin A.C., Stepanova L.A., Kiselev O.I., Atabekov I.G. A new method of producing biologically active nanocomplexes by non-covalent conjugation of proteins with viral particles // *Bioorg. Khim.* 2009. V. 37. Iss. 4. P. 496-503.
5. Demina T., ZaytsevaZotova D., Yablokov M., Gilman A., Akopova T., Markvicheva E., Zelenetskii A. DC discharge plasma modification of chitosan/gelatin/PLLA films: Surface properties, chemical structure and cell affinity // *Surf. Coating Tech.* 2012. V. 27. P. 508-516.
6. Selina O.E., Markvicheva E.A., Belov S.Y.u., Vlasova N.N., Balysheva V.I., Churin A.I., Bartkowiak A., Sukhorukov G.B. Biodegradable microcapsules with entrapped DNA for development of DNA vaccines // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2009. V. 35. Iss. 1. P. 103-110.
7. ZaytsevaZotova D.S., Udartseva O.O., Andreeva E.R., Bartkowiak A., Bezdetsnaya L.N., Guillemin F., Goergen J.L., Markvicheva E.A. Polyelectrolyte microcapsules with entrapped multicellular tumor spheroids as a novel tool to study the effects of photodynamic therapy // *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials.* 2011. V. 97. Iss. 2. P. 255-262.