

Отзыв официального оппонента
на диссертационную работу Бродской Александры Валерьевны
«Разработка противовирусной композиции малых интерферирующих РНК для ингибирования репродукции вируса гриппа А»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

Актуальность темы.

Грипп относится к острым респираторным вирусным инфекциям и представляет собой одну из наиболее значимых проблем, стоящих перед современным здравоохранением. Заболеваемость гриппом обуславливает ряд проблем социального и экономического характера: смертность в группах риска, резкое повышение нагрузки на персонал медучреждений, снижение трудовых ресурсов.

Эпидемиологические особенности гриппа во многом объясняются строением его генома. Высокая степень изменчивости генома в результате накопления отдельных мутаций позволяет вирусу уклоняться от специфического иммунитета, что проявляется в развитии ежегодных эпидемии. Сегментированность генома вируса обуславливает возможность реассортация, которая может приводить к появлению новых вариантов вируса, в том числе наиболее опасных для человеческой популяции пандемических штаммов.

В настоящее время противовирусные средства для лечения гриппа представляют собой крайне ограниченную группу препаратов, при этом для части из них известна лекарственная резистентность. За последние десятилетия в связи с угрозой возникновения новых штаммов вируса гриппа типа А (ВГА), нехарактерных для человеческой популяции, как в случае «птичьего» в 2006 и «свиного» гриппа в 2009, возросла потребность в разработке принципиально новых этиотропных препаратов, способных обойти проблему резистентности вируса, или же противовирусных препаратов широкого спектра действия, обладающих повышенной эффективностью и доступностью в применении. Одним перспективных направлений создания противовирусных препаратов является использование ингибиторов вирусной репродукции на основе малых интерферирующих РНК (миРНК).

Основным препятствием практического применения миРНК по сей день является проблема эффективной и нетоксичной доставки этих молекул в клетки и длительной защиты ее функционально активного состояния. В случае вируса гриппа человека наиболее целесообразной видится система доставки миРНК, подходящая для интраназального введения. Этот путь доставки минимизирует системную потерю миРНК, так как они доставляются непосредственно к месту репликации вируса гриппа – эпителиальным клеткам дыхательных путей. Для этой цели часто используются поликатионные полимеры, способные за счет положительного заряда связывать миРНК и обеспечивать защиту от нуклеаз и хорошую растворимость. В настоящее время существует ряд препаратов на основе молекул миРНК, находящихся на стадии доклинических исследований, при этом проблема оптимальной доставки миРНК для терапии гриппа все еще

не решена, и разрешенный к применению фармацевтический препарат на основе миРНК в настоящее время отсутствует. Таким образом, разработка новых современных подходов к терапии гриппа на основе использования механизма РНК-интерференции и сопутствующее ей решение задачи высокоэффективной и безопасной доставки препарата миРНК в инфицированные клетки, являются чрезвычайно актуальными задачами современной молекулярной и клинической вирусологии.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна.

Обоснованность и достоверность результатов, научных положений и выводов не вызывает сомнений. Исследование выполнено на высоком методическом уровне с использованием современных методов и подходов: вирусологических, серологических, молекулярно-биологических, биохимических, микроскопических и статистических.

В ходе исследования:

- Проведен подбор миРНК, направленных на консервативные области геномных сегментов PA и NP ВГА человека;
- Выбраны наиболее перспективные миРНК по результатам *in vitro* скрининга их противовирусной активности при внутриклеточной доставке с использованием липофектамина;
- Выбран наиболее эффективный носитель для миРНК по результатам сравнения эффективности внутриклеточной доставки и противовирусной активности миРНК в комплексе с полиэтиленимином, производными хитозана, липофектамина и гибридными полиэлектролитными микрокапсулами;
- Оценен противовирусный потенциал композиции выбранных миРНК и носителя в отношении ВГА *in vitro*;
- Проведено исследование противовирусного действия разработанной композиции *in vitro* в отношении вируса гриппа тип А разных подтипов.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.

Выполненная работа представляет собой фундаментальное научное исследование, посвященное проблеме внутриклеточной доставки противовирусных миРНК в клетки, обладающее, помимо теоретической значимости, выраженным прикладным потенциалом.

В ходе выполнения работы впервые подобраны миРНК, направленные на «выключение» экспрессии генов ВГА, кодирующих белки NP, PA, PA-N155, PA-N182 и PA-X, и обладающие противовирусной активностью *in vitro*. Впервые проведено сравнительное исследование эффективности внутриклеточной доставки и противовирусного в отношении ВГА действия препаратов миРНК с различными невирусными носителями: полиплексами, липосомами и микрокапсулами. Впервые продемонстрировано эффективное применение упакованных в гибридные микрокапсулы миРНК для

эффективного подавления репродукции ВГА *in vitro*. Разработана не имеющая прямых аналогов противовирусная композиция для подавления экспрессии генов PA, NP и NS ВГА, представляющая собой комбинацию из трех направленных на эти гены миРНК, инкапсулированных в гибридные полиэлектролитные микрокапсулы с поверхностью, модифицированной частицами SiO₂.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.

При выполнении работы продемонстрирована возможность успешного применения инкапсулированных терапевтических миРНК, направленных на подавление экспрессии нескольких генов ВГА, в опытах *in vitro* в отношении штаммов ВГА различных подтипов. Полученные результаты исследования противовирусного потенциала миРНК могут быть использованы для разработки фармакологической формы препарата на основе миРНК, предназначенного для профилактики и лечения вирусной инфекции, вызванной ВГА человека. Предложенные подходы по эффективной внутриклеточной доставке миРНК с помощью гибридных микрокапсул, поверхность которых может быть при необходимости модифицирована с целью достижения большей биосовместимости, биodeградируемости, эффективности и таргетности доставки, может быть использована при разработке новых фармацевтических препаратов различного действия.

Содержание диссертации.

Диссертационная работа Бродской Александры Валерьевны имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Изложение диссертационной работы осуществлено по монографическому типу, объем работы составляет 115 страниц, включает 35 рисунков, 8 таблиц, 130 библиографических ссылок (из них 119 – работы зарубежных авторов).

Во введении автор лаконично излагает актуальность темы, степень ее разработанности, цели и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, методологию и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробации результатов.

В Обзоре литературы содержится структурированный материал о вирусе гриппа, и более подробно – о вирусе гриппа А – его строении, «жизненному циклу» вируса, антигенной изменчивости вируса гепатита А. Отдельный раздел обзора посвящен РНК-интерференции. В этом разделе приведена модель механизма РНК интерференции, анализ научных источников, посвященных возможности применения РНК-интерференции в качестве противовирусной терапии. Необходимо отметить указанные автором преимущества противовирусных миРНК перед традиционными препаратами: миРНК обладают высокой специфичностью; высокотехнологичны – что позволяет в случае изменения вируса быстро

приготовить новый специфичный препарат; возможность использования комплекса препаратов миРНК - что позволяет обеспечить эффективность лечения; стабильны при хранении и могут быть введены интраназально; могут применяться как для профилактики, так и для терапии заболевания.

Автором проводится анализ результатов применения миРНК для подавления вируса гриппа А, при этом отмечено, что эффективно функционирующие противогриппозные миРНК как правило направлены на консервативные вирусные гены, имеющие более низкую скорость мутации, чем HA и NA.

Так же в этом разделе представлен анализ литературы, посвященной механизмам и способам доставки миРНК в клетки. Анализ имеющихся по теме работы литературы позволил автору сформулировать критерии, которым должна отвечать терапевтическая миРНК. Имеющиеся системы доставки миРНК не отвечают большинству сформулированных критериев. Платформа, предлагаемая автором работы, является наиболее современной и отвечающей критерием терапевтическим миРНК. Публикации о перспективности такой платформы появились два года назад, это еще раз свидетельствует об актуальности работы.

В разделе «Материалы и методы» содержит информацию об использованных в работе вирусах, линиях клеток, методах. Необходимо отметить многообразие методов, которые были использованы Александрой Валерьевной при выполнении работы. Учитывая, как конкретно описаны все использованные методы нет сомнения, что соискатель не только владеет ими, но и самостоятельно получила представленные в работе результаты. Исследование выполнено на высоком методическом уровне с использованием современных методов и подходов: вирусологических, серологических, молекулярно-биологических, биохимических, микроскопических и статистических. Использованные методологические подходы адекватны поставленным задачам.

Собственные результаты исследования и их обсуждение представлены в отдельном разделе. Раздел «Результаты исследования и их обсуждение» включает данные от дизайна миРНК, направленных на выключение экспрессии генов PA и NP вируса гриппа, выбор носителей для доставки миРНК в клетки, оценке противовирусного действия композиций. При разработке миРНК нуклеотидные последовательности генов PA и NP ВГА человека (по данным Genbank) были подвергнуты множественному выравниванию в программе MAFFT и дополнительно в программе ClustalX 8500. Автором были получены консенсусные нуклеотидные последовательности двух выбранных генов ВГА с вероятностью встречаемости нуклеотидов более 75%. На основе этих последовательностей были подобраны 11 ранее не описанных в литературе миРНК, направленных на гены PA (анти-PA) и NP (анти-NP). У подобранных миРНК отсутствовала гомология с генами человека и ВГА с целью исключения возможности их влияния на экспрессию нецелевых генов. В качестве препаратов сравнения (положительного контроля) были выбрано несколько миРНК, противовирусная активность которых в отношении ВГА была ранее описана в литературе. В качестве отрицательного контроля была выбрана миРНК, не имеющую мишеней среди генов человека и ВГА.

Для первичного скрининга противовирусной активности выбранных миРНК автором был использован традиционно применяемый для доставки молекул нуклеиновых кислот в клетки реагент – липофектамин ЛФ-RNAi. Было определено предельно допустимое разведение ЛФ-RNAi, конечные концентрации миРНК, противовирусная активность *in vitro* на клетках A549 зараженных вирусом A/PR/8/34 (H1N1). В результате проведенного скрининга были выбраны миРНК PA-1630 и NP717, обладающие наибольшей противовирусной активностью, которая была сопоставима или превышала таковую для миРНК, ранее описанных в литературе. При выборе носителей для доставки миРНК в клетки был проведен скрининг поликатионных молекул, таких, как полиэтиленимин (ПЭИ), метилгликоль хитозан (МГХ), кватернизированный хитозан (КХ), олиголактат хитозана (ОЛХ), гидрохлорид хитозана (ГХХ), а также гибридные микрокапсулы (SiO₂ – МК). В качестве препаратов сравнения автором использовались липоплексные реагенты ЛФ и ЛФ-RNAi. Был подобран оптимальный диапазон капсул – от 5 до 20 – на клетку, который обеспечивает захват клеткой SiO₂ – МК и трансфекцию. Обработка миРНК в составе SiO₂-МК РНКазой с последующим электрофоретическим разделением в агарозном геле позволили установить, что SiO₂-МК эффективно защищают миРНК от деградации под действием РНКазы.

С использованием конфокальной и электронной микроскопии и проточной цитометрии проведено изучение эффективности захвата SiO₂-МК клетками A549 автором установлено, что капсулы локализуются в цитоплазме абсолютного большинства (до 92%) клеток в исследованный интервал времени (4-24 ч). При этом через 24 ч после введения наблюдается частичное освобождение ROX-миРНК из капсул и их диффузное перераспределение по цитоплазме.

При сравнительном исследовании эффективности внутриклеточной доставки и противовирусной активности *in vitro* миРНК в комплексах с МГХ, КХ, ПЭИ и SiO₂-МК, ЛФ показано, что доставка миРНК происходит при использовании SiO₂-МК. После 24 ч инкубации клеток A549 с миРНК методом конфокальной микроскопии установлено, что эффективность внутриклеточной доставки ROX-миРНК в клетки A549 с помощью SiO₂-МК значительно превосходит эффективность доставки с помощью ПЭИ (на 70%), ЛФ (на 45%), ЛФ-RNAi (на 30%). Средняя интенсивность флуоресценции поглощения ROX-миРНК наблюдалась в следующем порядке: SiO₂-МК > ЛФ-RNAi > ЛФ > ПЭИ > ROX-миРНК без носителя.

При сравнении противовирусной активности миРНК в комплексе с производными хитозана, ПЭИ и SiO₂-МК вирус-ингибирующее действие препаратов миРНК с носителями исследовали для штамма A/PR/8/34 на клетках A549 и MDCK. Полученные автором результаты свидетельствуют, что SiO₂-МК являются наиболее оптимальным и эффективным из всех исследуемых способов доставки противовирусных миРНК. Поэтому заключительная часть работы содержит результаты исследований по разработке противовирусного препарата на основе синтетических миРНК использовали SiO₂-МК.

Была установлена дозовая зависимость эффективности подавления экспрессии гена NP и вирус-ингибирующей способности анти-NP миРНК, инкапсулированных в SiO₂-МК. Трансфецирование проводили на клеточных линиях MDCK и A549. Для обеих клеточных линий, трансфецированных анти-NP миРНК (NP-1496, NP-717 и NP-1155) в диапазоне концентраций 0,1–10 мкМ за 24 часа до заражения штаммом A/PR/8/34 (0,01 MOI), была обнаружена тенденция к снижению титра реплицирующегося вируса по РГА и уровню NP в клетках.

Высокая ёмкость SiO₂-МК позволяют проводить инкапсуляцию *in situ* одновременно нескольких разных миРНК. Автором была продемонстрирована возможность ингибирования репродукции вируса вируса A/PR/8/34 в клетках A549 при использовании коктейля противовирусных миРНК и при воздействии отдельных миРНК. В состав коктейля вошли три миРНК PA-1630, NP-717 и NS-777, направленные на подавление экспрессии генов PA, NP и NS ВГА. Установлено, что при введении препарата за 24 часа до заражения клеток уровень NP по данным ИФА достоверно снижался для каждой из использованных противовирусных миРНК к 72 часу после заражения. При этом комбинация трех миРНК обладала существенно большей эффективностью по сравнению с монопрепаратами и положительным контролем - действием озельтамивира. Результаты ПЦР в реальном времени (определения уровня мРНК M1 ВГА) подтверждают данные, полученные в ИФА.

В разделе «Заключение» автор проводит обсуждение собственных результатов с известными литературными данными, проводит анализ материалов в соответствии с задачами работы.

Анализируя научный труд Бродской Александры Валерьевны можно заключить, что все поставленные задачи были успешно решены, все это позволило достигнуть заявленной цели исследования в полном объеме.

Работа написана доступным грамотным языком, в достаточной степени иллюстрирована экспериментальными данными, полученными лично или при участии автора.

Поскольку подобранные соискателем миРНК направлены на наиболее консервативные участки генов, предположительно, что эти препараты должны обладать противовирусной активностью в отношении ВГА разных подтипов. В работе была исследована эффективность ингибирования репликации вирусов A/PR/8/34 (H1N1), A/California/7/09 (H1N1pdm09), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), A/Anhui/1/13 (H7N9) и B/Malaysia/2506/2004 с помощью комбинации из трёх инкапсулированных миРНК. Предварительное введение (за 24 часа до заражения) в клетки «коктейля» миРНК вызывает специфический противовирусный эффект для ВГА подтипов H1N1, H1N1pdm09, H5N2 и H7N9, приводя к снижению репликации вируса на 2-4 lgТЦД₅₀/мл.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах.

Результаты диссертации отражены в 17 печатных работах, в том числе 7 статей, из них 4 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы и изложен на 24 страницах.

Замечания.

Список сокращений и условных обозначений было бы уместно расположить перед введением, а не в конце работы. В работе присутствуют незначительное число опечаток и «неудачных» формулировок. Отмеченные недостатки не ставят под сомнение научную ценность и практическую значимость работы в целом.

Выполненная работа по своей теоретической и практической значимости, новизне и актуальности соответствует требованиям п.9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства 24.09.2013 г. № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04. 2016 г. № 335), предъявляемых к кандидатским диссертациям, а автор представленной диссертации Бродская Александра Валерьевна заслуживает присвоения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Заместитель директора по производству
ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»
д.м.н., профессор

Г.М. Игнатьев

Почтовый адрес: 108819, Россия, Москва, поселение Московский,
Поселок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1.
Тел.: +7 495 8419002
E-mail: ignatjev_gm@chumakovs.su

Подпись Игнатьева Г.М. заверяю

Начальник отдела кадров



Матюшина О.В.