

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА
Д 001.001.XX (24.1.184.01), НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ»
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК**

Аттестационное дело №

Решение диссертационного совета от 19 октября 2023 года № 10
О присуждении Кнауэр Надежде Юрьевне, гражданке РФ, ученой степени
кандидата медицинских наук.

Диссертация **«Иммуномодулирующие и противоопухолевые свойства катионных дендритных молекул и их комплексов с микроРНК»** по специальности 3.2.7. Иммунология принята к защите 06 июля 2023 года, протокол №8, диссертационным советом Д 001.001.XX (24.1.184.01), на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ), почтовый индекс 630099, адрес организации: г Новосибирск, ул. Ядринцевская, дом 14, действующего на основании приказа Минобрнауки РФ №209/нк от 14.02.2023 года.

Соискатель Кнауэр Надежда Юрьевна, 03 февраля 1990 года рождения, окончила в 2012 году Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский Национальный Исследовательский Государственный Университет» (НГУ) по специальности «Лечебное дело» с присуждением квалификации «Врач». С 2012 по 2014 год проходила обучение в ординатуре НИИ клинической иммунологии СО РАМН по специальности «Аллергология и иммунология». В 2014-2022 гг. работала в лаборатории клинической иммунопатологии НИИФКИ в должности младшего научного сотрудника (до

2017 г), инженера-исследователя (после 2017 г). В 2014-2020 работала в Научно-консультативном отделении Клиники иммунопатологии НИИФКИ в должности врача-аллерголога-иммунолога. В 2015-2023 гг. проходила обучение в аспирантуре НИИФКИ (до 2020 – очная форма, после 2020 – заочная форма).

Диссертация выполнена в лаборатории клинической иммунопатологии НИИФКИ.

Научный руководитель – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель НИИФКИ, заведующий лабораторией клинической иммунопатологии НИИФКИ Козлов Владимир Александрович.

Официальные оппоненты:

Козлов Иван Генрихович – доктор медицинских наук, профессор кафедры организации и управления в сфере обращения лекарственных средств Федерального Государственного Автономного Образовательного Учреждения Высшего Образования «Первый Московский Государственный Медицинский Университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Карпенко Лариса Ивановна – доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией рекомбинантных вакцин Федерального Бюджетного Учреждения Науки «Государственный Научный Центр Вирусологии и Биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России в своем положительном отзыве, составленном и подписанном 14.09.2023 (протокол №2), указывает, что диссертация является самостоятельной завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком уровне и представляющим интерес для решения задач современной иммунотерапии опухолевых заболеваний. Получены новые знания о

биологических свойствах катионных дендримеров на иммунокомпетентные и опухолевые клетки. Впервые исследован эффект катионных дендримеров 3 поколения и их комплексов с иммуномодулирующими микроРНК на жизнеспособность МНК ПК условно здоровых доноров, произведена оценка IC50 исследуемых дендримеров. Впервые было проведено исследование интернализации комплексов катионных дендримеров 3 поколения с микроРНК в иммунокомпетентные и опухолевые клетки. Впервые был исследован эффект дендриплексов на основе катионных дендримеров и микроРНК с иммуномодулирующими свойствами на относительное количество клеток различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток и их пролиферативной активности; экспрессию поверхностных маркеров CD25, HLA-DR, PD-1; секрецию перфорина и гранзима В; продукцию цитокинов в культуре МНК ПК. Впервые было проведено исследование цитотоксической активности дендримеров и их комплексов с микроРНК, обладающими противоопухолевыми свойствами (miR-34, amiR-21), в отношении различных опухолевых культур. Впервые были получены данные о влиянии дендримеров и их комплексов на относительное количество опухолевых клеток, экспрессирующих маркеры, характеризующих взаимодействие опухолевых клеток с иммунным микроокружением. Данная работа представляет собой первое доклиническое исследование, в рамках которого были изучены биологические свойства катионных дендримеров и их комплексов с иммуномодулирующими и противоопухолевыми микроРНК. Полученные результаты являются основанием для проведения следующих этапов доклинических исследований исследуемых субстанций.

В заключении отмечено, что диссертация Кнауэр Н.Ю. полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года в редакции постановления Правительства РФ от октября 2018 г №1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени

кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

Основные результаты диссертации опубликованы в 5 печатных работах в журналах, индексирующихся в базе Scopus и Web of Science и рекомендованных для публикации материалов диссертационных работ:

1. Knauer, N.; Meschaninova, M.; Muhammad, S.; Hänggi, D.; Majoral, J.-P.; Kahlert, U.D.; Kozlov, V.; Apartsin, E.K. Effects of dendrimer-microRNA nanoformulations against glioblastoma stem cells. *Pharmaceutics* 2023, 15, 968, doi:10.3390/pharmaceutics15030968.
2. Knauer, N.; Pashkina, E.; Aktanova, A.; Boeva, O.; Arkhipova, V.; Barkovskaya, M.; Meschaninova, M.; Karpus, A.; Majoral, J.-P.; Kozlov, V.; et al. Effects of cationic dendrimers and their complexes with microRNAs on immunocompetent cells. *Pharmaceutics* 2023, 15, 148, doi:10.3390/pharmaceutics15010148.
3. Knauer, N.; Arkhipova, V.; Li, G; Hewera M.; Pashkina E.; Nguyen P-H.; Meschaninova, M.M.; Kozlov V.; Zhang W.; Croner R.S. et al. In vitro validation of the therapeutic potential of dendrimer-based nanoformulations against tumor stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 5691, doi:10.3390/ijms23105691.
4. Knauer, N.; Pashkina, E.; Apartsin, E. Topological aspects of the design of nanocarriers for therapeutic peptides and proteins. *Pharmaceutics* 2019, 11, 91, doi:10.3390/pharmaceutics11020091.
5. Апарцин, Е.К.; Кнауэр, Н.Ю. Методы доставки генетического материала в клетки и возможности их применения в генной терапии. *Гены и клетки*. 2016, 11, 32–41.

Все основные результаты, вынесенные на защиту, опубликованы в виде статей в рецензируемых изданиях и широко обсуждены в виде докладов на международных конгрессах. Все экспериментальные результаты получены

при непосредственном участии автора, статистическая обработка результатов выполнена автором лично.

На автореферат поступило 7 отзывов от:

1. Директора Центра иммунологии и клеточных биотехнологий, профессора кафедры фундаментальной медицины ОНК «Институт медицины и наук о жизни (МЕДБИО)» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», доктора медицинских наук **Литвиновой Ларисы Сергеевны**, г.Калининград,
2. Руководителя лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» профессора, доктора биологических наук **Гуляевой Людмилы Федоровны**, г.Новосибирск,
3. Старшего научного сотрудника лаборатории химии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, кандидата химических наук **Маляренко Олеси Сергеевны**, г.Владивосток,
4. Старшего научного сотрудника лаборатории биолюминисцентных и экологических технологий Федерального государственного бюджетного научного учреждения Федеральный исследовательский центр Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук Обособленное подразделение Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук, кандидата биологических наук **Башмаковой Евгении Евгеньевны**, г. Красноярск,
5. Профессора кафедры общей биофизики факультета биологии и охраны окружающей среды Лодзинского университета, доктора биологических наук **Ионова Максима Владимировича**, г. Лодзь, Польша,

6. Заведующего лабораторией синтетической биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины старшего научного сотрудника, кандидата химических наук **Довыденко Ильи Сергеевича**, г. Новосибирск,

7. Руководителя Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федерального исследовательского центра Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, доктора медицинских наук, **Королева Максима Александровича**, г. Новосибирск.

Во всех отзывах отмечается высокая актуальность темы диссертационного исследования, научная и практическая значимость, высокий методический уровень работы. Все отзывы положительные, критических замечаний не содержит.

Выбор ведущей организации обосновывается тем, что **Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России** является одним из ведущих научно-исследовательских институтов в России, осуществляющих комплексное решение фундаментальных и практических проблем современной иммунологии. Указанное направление отражено в многочисленных публикациях сотрудников института.

Выбор официального оппонента, доктора медицинских наук **Козлова Ивана Генриховича**, обуславливается его работами в области иммунофармакологии, онкофармакологии.

Выбор официального оппонента, доктора биологических наук **Карпенко Ларисы Ивановны**, обосновывается ее трудами в области разработки вакцин на основе терапевтических олигонуклеотидов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Доказано, что свободные дендримеры AE2G3 и BDEF33 в средних и высоких дозах (3 мкмоль/л и более) обладают токсическим действием в отношении иммунокомпетентных клеток, что проявляется в стимуляции гибели клеток в культуре МНК ПК условно здоровых доноров после внесения исследуемых дендримеров; данный эффект был более выражен для фосфорного дендримера AE2G3, чем для BDEF33.

Доказано, что катионные дендримеры эффективно доставляют микроРНК в иммунокомпетентные клетки, что проявляется в виде возрастания доли FAM-позитивных клеток при культивировании МНК ПК в присутствии комплексов катионных дендримеров с флуоресцентно меченной микроРНК amiR-155-FAM; эффект был более выражен для BDEF33, чем для AE2G3. Данный результат свидетельствует о том, что при этом BDEF33 является более эффективным транспортером, чем AE2G3.

Доказано, что комплексы катионных дендримеров AE2G3 и BDEF33 и микроРНК с иммуномодулирующими свойствами обладают низкой токсичностью в отношении иммунокомпетентных клеток *in vitro*: внесение исследуемых комплексов в культуру МНК ПК не приводило к достоверному снижению жизнеспособности клеток и не изменяло активности ЛДГ.

Доказано, что комплексы катионных дендримеров и микроРНК с иммуномодулирующими свойствами обладают иммуностимулирующими свойствами, что проявляется в повышении доли клеток, экспрессирующих HLA-DR, PD-1 (CD4+HLA-DR+, CD4+PD1+, CD8+HLA-DR+, CD19+PD1+), умеренном повышении продукции IL-4 после культивирования МНК ПК с указанными комплексами.

Доказано, что свободные дендримеры AE2G3 и BDEF33 обладают противоопухолевой активностью: внесение катионных дендримеров AE2G3 и BDEF33 в культуры опухолевых клеток линий лейкемии (Jurkat) и глиобластомы (BTSC233, JNH520, NCH644, GBM1, U87) приводит к гибели опухолевых клеток). Значения IC50 свободных дендримеров для опухолевых клеток были сопоставимы или ниже значений IC50 для неопухолевых клеток.

Доказано, что свободные дендримеры изменяют экспрессию поверхностных маркеров опухолевых клеток, связанных с их взаимодействием с иммунным микроокружением: внесение свободных дендримеров повышало относительное количество опухолевых клеток, экспрессирующих PD-L1, TIM3, CD47, в культурах линий Jurkat (оба дендримера), NCH644 (AE2G3).

Доказано, что катионные дендримеры проникают в опухолевые клетки и эффективно доставляют в них микроРНК, что проявлялось в возрастании доли FAM-позитивных клеток при внесении комплексов катионных дендримеров с флуоресцентно меченной микроРНК amiR-155-FAM в культуры опухолевых клеток; эффект был более выражен для BDEF33, чем для AE2G3 в модели лейкемии; в модели глиобластомы AE2G3/amiR-155-FAM активнее проникали в клетки.

Доказано, что комплексы катионных дендримеров и антитуморогенных микроРНК обладают противоопухолевыми свойствами в отношении различных опухолевых моделей (Т-клеточная лейкемия, глиобластома), при этом использование синтетических ингибиторов микроРНК дает более выраженный эффект: культивирование опухолевых клеток в присутствии комплексов приводило к гибели клеток. Дендриплексы на основе BDEF33 были более токсичны, чем комплексы AE2G3, а использование amiR21 оказалось более эффективным для снижения жизнеспособности опухолевых клеток, чем miR34.

Теоретическая и практическая значимость исследования обоснована тем, что расширены представления о возможности использования терапевтических олигонуклеотидов для задач иммунотерапии опухолевых заболеваний. Данная работа представляет собой первое доклиническое исследование биологических свойств катионных дендримеров и их комплексов с иммуномодулирующими и противоопухолевыми микроРНК. Полученные результаты являются основанием для проведения последующих этапов доклинических исследований данных субстанций.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что

Исследованы эффекты катионных дендримеров и их комплексов с микроРНК в отношении иммунокомпетентных и опухолевых клеток.

Показана возможность использования катионных дендримеров для доставки микроРНК в клетки различного происхождения.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что научные положения, выносимые на защиту, и выводы основываются на изучении большого объема экспериментальных данных, полученных с использованием современных методических приемов и высокоинформативных методов исследования, проведенных *in vitro* на сертифицированном оборудовании и с использованием сертифицированных реагентов; адекватно подобранными методами статистической обработки и детальным анализом результатов исследования.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном выполнении экспериментальных исследований, обеспечивших получение исходных данных, их статистической обработке и интерпретации; в проведении анализа имеющейся научной информации по теме исследования. Научные положения и выводы, сделанные в диссертационной работе, сформулированы автором. Подготовка основных публикаций, отражающих результаты диссертационного исследования, проведена лично автором или при его непосредственном участии.

Диссертация Кнауэр Н.Ю. «Иммуномодулирующие и противоопухолевые свойства катионных дендритных молекул и их комплексов с микроРНК» по актуальности избранной темы, методическому уровню, поставленным задачам, новизне и значимости полученных результатов, обоснованности научных выводов полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, изложенным в пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября

2013 года в редакции постановления Правительства РФ от октября 2018 г №1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7 – Иммунология. На заседании 19 октября 2023 года диссертационный совет принял решение о присуждении ученой степени кандидата медицинских наук.

Заседание диссертационного совета Д 001.001.XX (24.1.184.01) проходило в очном режиме с присутствием 15 человек из 17 человек, входящих в состав диссертационного совета.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 15 человек, из них 7 докторов наук по профилю рассматриваемой работы по специальности 3.2.7. Иммунология, участвовавших в заседании из 17 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение ученой степени – 15, против присуждения ученой степени – 0, воздержались – 0.

Председатель диссертационного совета Д 001.001.XX (24.1.184.01), Академик РАН, профессор, доктор медицинских наук

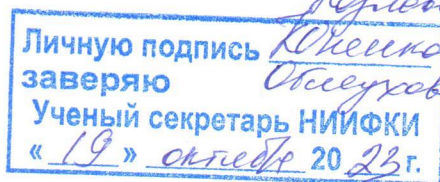
Козлов
Владимир
Александрович

Заместитель председателя диссертационного совета Д 001.001.XX (24.1.184.01), Председатель заседания №10 от 19.10.2023 г, Академик РАН, профессор, доктор медицинских наук

Коненков
Владимир
Иосифович

Ученый секретарь диссертационного совета Д 001.001.XX (24.1.184.01), кандидат биологических наук
19 октября 2023 года

Облеухова
Ирина
Александровна



Жукова В.А.
Коненков В.Ч.
Облеухова И.А.



Евдокимов Е.А.