

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию И.И. Доронина

**«Противоопухолевые эффекты модифицированных фрагментов GD2-специфичных антител»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Диссертационная работа Доронина И.И. связана с изучением противоопухолевых эффектов модифицированных фрагментов GD2-специфичных антител. Известно, что для иммунотерапии рака в качестве мишеней могут выступать гликофинголипиды, в частности ганглиозиды. Ганглиозид GD2 гиперэкспрессируется опухолями различного происхождения. GD2-позитивные опухоли составляют около 10% от общего числа онкологических заболеваний. Взаимодействие таких клеток со специфическими антителами к GD2 приводило к гибели этих клеток, что позволяет использовать эти антитела в иммунотерапии рака. Однако при использовании полноразмерных антител были выявлены побочные эффекты, опосредованные действием Fc-фрагмента, который не участвует в связывании с GD2 и последующей индукции клеточной гибели. В данной работе описывается новый подход к исследованию GD2-связывающих фрагментов антител в индукции гибели опухолевых клеток. В связи с вышесказанным актуальность диссертационной работы не вызывает сомнений.

Цель работы сформулирована четко. Основными задачами своей работы диссертант ставит получение GD2-связывающих фрагментов из различных GD2-связывающих антител, изучение их связывающей и цитотоксической активностей по отношению к опухолевым клеткам, сравнение цитотоксических эффектов и механизмов клеточной гибели, индуцированной полноразмерными антителами и их GD2-связывающими фрагментами, проведение химической модификации фрагментов GD2-связывающих антител и изучение противоопухолевой активности этих фрагментов.

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, включающей методы, результаты исследования и их обсуждение, и выводов. Общий объем диссертации составляет 159 страниц машинописного текста, включающего 53 рисунка и 7 таблиц.



Чрезмерно обширный обзор литературы обзор обобщает многочисленные данные по использованию GD2-специфических антител в терапии злокачественных заболеваний. Небольшая глава посвящена обсуждению механизмов цитотоксического действия GD2-специфических антител. Список литературы содержит 199 наименований. Обзор литературы написан четко и соответствует содержанию диссертационной работы, помогая также понять место собственных результатов автора в общей системе знаний об использовании антител в иммунотерапии злокачественных заболеваний.

В методическом разделе экспериментальной части автор подробно описывает использованные экспериментальные процедуры, так что при необходимости они могут быть воспроизведены без привлечения дополнительной литературы. Однако некоторые эксперименты описаны не так подробно со ссылкой на литературный источник, что нежелательно при оформлении диссертационной работы. Использование И.И. Дорониным широкого набора различных молекулярно-биологических, иммунологических и биохимических методик характеризует его как высококвалифицированного специалиста.

Вызывающая наибольший интерес глава «Результаты и их обсуждение» диссертационной работы И.И. Доронина состоит из нескольких частей, логически связанных между собой. Первая часть работы посвящена подтверждению прямой цитотоксической активности GD2-связывающих антител. Диссертант демонстрирует, что используемые антитела взаимодействуют только с GD2-позитивными клетками, и что это взаимодействие приводит к фрагментации ДНК и гибели клеток.

Далее И.И.Доронин переходит к получению GD2-связывающих фрагментов на основе нескольких типов GD2-связывающих антител. Сначала были получены рекомбинантные scFv-фрагменты, сконструированные на основе моноклональных антител 3F8. Был получен продуцент, подобраны условия выделения, очистки и рефолдинга полученных фрагментов. scFv-фрагменты связывались с ганглиозидом GD2.

На следующих этапах исследования автор расширяет панель GD2-связывающих антител, из которых будут получены другие GD2-связывающие фрагменты. Была решена фундаментальная задача получения нового GD2-



связывающего антитела 9P-11. С использованием оригинального подхода по применению KLN-модифицированных GD2-мимикрирующих пептидов была получена собственная линия гибридомы, секретирующая высокоспецифичное GD2-связывающее антитело, не обладающее кросс-реактивностью с другими ганглиозидами. Далее с использованием энзиматического расщепления были получены GD2-связывающие фрагменты антитела 9P-11 и Fab-фрагменты GD2-связывающего антитела ME361, сохраняющие эффекты полноразмерных антител, также способных связываться с GD2-позитивными опухолевыми клетками и индуцировать их гибель. Существенным недостатком этого этапа работы является отсутствие количественной оценки связывания антител и их фрагментов с опухолевыми клетками. Не приведены значения констант связывания с ганглиозидом GD2, которые позволили бы оценить специфичность связывания фрагментов в сравнении с полноразмерными антителами. Результаты окрашивания различных линий опухолевых клеток GD2-специфичными антителами, приведенные в таблице 1, по меньшей мере выглядят удивляюще.

На следующем этапе И.И. Доронин проводит сравнение механизмов гибели GD2-позитивных опухолевых клеток, индуцированных антителом ME361 и его Fab-фрагментами. Автор демонстрирует, что и полноразмерное антитело, и его фрагменты могут вызывать клеточную гибель как с апоптотическими, так и с некротическими характеристиками, но под действием фрагментов преобладает смерть клеток по пути каспазо-зависимого апоптоза. Недостатком описания этого этапа работы является вялое обсуждение автором полученных результатов. Не ясны мотивы автора при выборе временных интервалов для оценки типа клеточной смерти. Хотелось бы узнать, что думает автор, как клетки одной популяции могут погибать под действием одного вещества одновременно по апоптотическому и некротическому пути.

На заключительном этапе работы автор проводит сайт-направленное пегилирование Fab-фрагментов. Полученные модифицированные производные сохраняли способность связывать GD2-ганглиозид и индуцировать гибель клеток. Также они обладали значимыми противоопухолевыми эффектами в мышинной сингенной модели рака.

Выводы диссертационной работы адекватно отражают суть исследования и



соответствуют поставленным задачам.

Работа не лишена недостатков, к упомянутым выше можно добавить неудачные выражения и недостаточно объяснение некоторых положений. Так, трудно называть классическим некрозом клеточную смерть, развивающуюся под действием GD2-связывающего антитела через 24 часа. Без дополнительных объяснений трудно понять, как неспецифические гидролазы специфически расщепляют молекулу антитела.

Все замеченные недостатки не снижают общего очень благоприятного впечатления от работы. Все результаты достоверны, и работа является оригинальным хорошо продуманным исследованием, вносящим существенный вклад в понимание противоопухолевого иммунитета.

Новизна диссертационной работы И.И. Доронина состоит, главным образом, в подтверждении способности моноклональных GD2-связывающих антител и их фрагментов напрямую убивать опухолевые клетки без участия дополнительных молекул.

Полученные в работе результаты имеют теоретическое и практическое значение. С одной стороны, они расширяют представление о механизмах иммунного ответа, показывая, что фрагменты GD2-связывающих антител могут выполнять цитотоксические функции полноразмерной молекулы. С другой стороны, полученные диссертантом антитела и их фрагменты могут быть применены в иммунотерапии рака.

Материалы диссертации были представлены на международных и Российских научных форумах. Автореферат и 6 опубликованных работ полностью отражают содержание диссертации.

### **Заключение**

Диссертация является законченным квалификационным научно-исследовательским трудом, выполненным автором на высоком уровне под руководством к.б.н. Р.В. Холоденко. Полученные результаты достоверны, выводы полностью обоснованы. Работа написана грамотным научным языком и хорошо иллюстрирована. Автореферат достаточно полно отражает основное содержание диссертации. Диссертационная работа И.И. Доронина «Противоопухолевые эффекты модифицированных фрагментов GD2-специфичных антител» является



научно-квалификационной работой, имеющей существенное значение для развития методов терапии GD2-позитивных онкологических заболеваний. Таким образом, диссертационная работа соответствует всем критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а сам автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Заведующий лабораторией молекулярной иммуногенетики рака Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), доктор биологических наук, профессор

*Сащенко* Сащенко Лидия Павловна

119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

Тел. +7 (499) 135-97-63.

E-mail: sashchenko@genebiology.ru

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ	
Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)	
Подпись лица	<i>Л. П. Сащенко</i>
заверяю .	
Ученый секретарь	
Института	Г.В.Мансурова

