



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ**  
**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки**  
**Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта**  
**Российской академии наук**  
**(ИМБ РАН)**

119991, ГСП,-1, г.Москва В-334, ул. Вавилова, 32. Для телеграмм: Москва В-334, ИМБ РАН.; л/с 06319001290 в ОФК по ЮЗАО г.Москвы, т.сч. 40503810300001009007, в Отделении №1 Московского ГТУ Банка России г..Москва 705, БИК 044583001, ИНН. БАНКА 7724189956 ОКПО – 02699501, ОКОНХ - 95110 тел. 135-23-11. 135-11-60; факс 135-14-05

05.06.2015 № 12312-2171

На № \_\_\_\_\_



УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора ИМБ РАН

Д.Б.В. Карпов В.Л.

2015

**О Т З Ы В**

**ведущей организации на диссертационную работу**

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

**Актуальность темы диссертации.**

Актуальность разработки новых низкотоксичных подходов к лечению онкологических заболеваний очевидна и определяется, в первую очередь, их чрезвычайной медицинской и социальной значимостью. Несмотря на большое количество исследований и разработок, существующие методы противоопухолевой терапии имеют ряд существенных ограничений и побочных эффектов, которые довольно остро проявляются в случае ряда онкологических заболеваний, в частности GD2-позитивных опухолей. Именно поэтому разработка и оптимизация новых способов адресной терапии с использованием препаратов на основе моноклональных антител

критически необходима и является очень перспективным направлением современной биологии и медицины. Иммунотерапевтические подходы, являющиеся наиболее передовыми методами лечения рака, способны решить существующие проблемы терапии GD2-позитивных опухолей, которые с трудом поддаются классическим методам лечения.

В настоящее время в мировой литературе нет данных по изучению цитотоксических и противоопухолевых эффектов фрагментов GD2-специфичных антител. Таким образом, получение и модификация таких фрагментов, а также изучение их способности к индукции гибели опухолевых клеток, является важной и актуальной задачей, которая позволит приблизить получение нового перспективного препарата для адресной терапии GD2-позитивных опухолей.

### **Научная новизна диссертации**

В работе И.И. Доронина проведен системный анализ цитотоксических эффектов GD2-специфичных антител, а также их производных на различных опухолевых клеточных линиях *in vitro* и на мышинной опухолевой модели *in vivo*. Впервые показана прямая индукция клеточной гибели GD2-позитивных опухолевых клеток под действием фрагментов моноклональных антител. Произведена оценка вклада различных механизмов клеточной гибели в процессы, запускаемые под действием GD2-специфичных индукторов. При помощи иммунизации мышей KLN-модифицированными ганглиозид-мимикрирующими пептидами были получены собственные клоны гибридом, продуцирующие GD2-специфичные антитела, характеризующиеся отсутствием кросс-реактивности с другими ганглиозидами. Помимо этого, сконструированы оригинальные рекомбинантные scFv-фрагменты, способные связывать опухоль-ассоциированный ганглиозид GD2. Впервые для фрагментов GD2-специфичных антител показано, что увеличение времени циркуляции за счет сайт-направленного монопегилирования Fab-фрагментов в мышинной модели ведет к значительному усилению противоопухолевых эффектов по сравнению с немодифицированными аналогами.

### **Достоверность и обоснованность результатов исследования.**

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием в работе обширного комплекса методических подходов: современных высокочувствительных молекулярно-биологических, биохимических и иммунологических методов исследования, тщательным учетом и подробной оценкой результатов с использованием адекватных методов статистической обработки данных. Используемые методы позволили достичь цели исследования и решить поставленные задачи в экспериментах как *in vitro*, так и *in vivo*.

### **Научно-практическая значимость диссертации.**

Теоретические выводы, полученные в работе, позволяют рассматривать фрагменты GD2-специфичных антител в качестве нового низкотоксичного противоопухолевого препарата. Кроме того, полученные GD2-специфичные антитела могут стать основой для разработки высокочувствительных методов диагностики GD2-позитивных онкологических заболеваний, а также эффективных иммунотерапевтических препаратов химерных / гуманизированных GD2-специфичных моноклональных антител. Основные результаты диссертации опубликованы в 6 печатных работах, они неоднократно обсуждались на различных конференциях, в том числе международных, и получили одобрение специалистов в данной области.

### **Общая характеристика работы.**

Диссертационная работа И.И. Доронина, объемом 159 страниц, построена по традиционному плану и состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение и выводы». Работа содержит 53 рисунка и 7 таблиц. Список использованной литературы включает 199 источников.

В разделе «Введение» кратко описана проблема и существующие подходы к иммунотерапии онкологических заболеваний, обоснована актуальность, поставлены цель и задачи работы, а также приведены положения, выносимые на защиту.

Раздел «Обзор литературы» содержит сведения о современном состоянии научных исследований по различным направлениям терапии GD2-позитивных опухолей. Отдельные главы посвящены рассмотрению известных механизмов цитотоксической активности GD2-специфичных антител. В заключительной части обзора описано применение модифицированных фрагментов моноклональных антител в клинике.

В разделе «Материалы и методы» приведены данные об экспериментальных подходах, использованных для получения различных фрагментов GD2-специфичных моноклональных антител, а также подходах по их модификации и изучению противоопухолевой активности как *in vitro*, так и *in vivo*.

Раздел «Результаты и их обсуждение» содержит последовательное описание серий проведенных экспериментов по выбору клеточных моделей для изучения цитотоксических эффектов, по созданию и экспрессии рекомбинантного scFv-фрагмента, созданию собственной гибридомы, продуцирующей GD2-специфичные антитела класса IgM, а также по энзиматическому получению и модификации различных фрагментов GD2-специфичных антител. В последнем пункте раздела проведен анализ противоопухолевых эффектов Fab-фрагментов GD2-специфичных антител, а также их пегилированных аналогов *in vivo*. Обсуждение содержит обобщающие рисунки и графики, на которых сведены результаты серий независимых экспериментов. Полученные автором результаты обсуждены в сопоставлении с отечественными и международными современными исследованиями, подробно и на хорошем уровне.

Выводы диссертации отражают и резюмируют полученные автором экспериментальные результаты, соответствуют поставленным в работе задачам, являются обоснованными и достоверными.

#### **Замечания.**

В диссертации встречаются довольно смешные конструкции русского языка, включая образование новых слов, например:

На стр. 61 «с использованием флуоресцентно активированных клеток (FACs) сортировой селекцией»

На стр. 72 «белок был введен ксенотрансплантированным нейробластомой безтимусным мышам с быстрой очисткой от несвязавшегося белка»

На стр. 78 «отмывку проводили на автоматическом вошере»

Подписи к рисункам бывают не совсем точными:

«Рисунок 28. Прямой ИФА, на подложке ганглиозид GD2 (250нг/лунка)»

Рисунок 53 изображает вскрытую брюшную полость мыши. Подпись к рисунку «Общий вид лабораторных животных ...»

Несколько раз повторяется слово «метастаз» вместо «метастазов».

На стр. 65 и стр.71 – повторы двух строчек

На стр. 130

«По-видимому, индукция увеличения потенциала митохондрий является первым событием в клетках, происходящим после добавления к ним анти-GD2-мАт ME361 и их Fab-фрагментов».

Эта фраза вызывает сомнения в том, что именно имеет в виду автор.

На стр. 141. Представлен раздел «Заключение и выводы», однако заключения нет.

### **Заключение.**

Диссертационная работа И.И. Доронина «Противоопухолевые эффекты модифицированных фрагментов GD2-специфичных антител» является законченной квалификационной научно-исследовательской работой, и содержит интересные данные, отражающие новый перспективный подход к решению важной научной задачи по разработке эффективных таргетных противоопухолевых препаратов, имеющих большое значение для фундаментальной биологии и практической медицины. Исследование характеризуется высокой актуальностью, научной новизной, корректностью использования методов, что позволило обеспечить объективность и достоверность полученных результатов.

Научная и практическая значимость работы, ее высокий методический уровень, несомненная новизна позволяют сделать вывод о том, что диссертация И.И. Доронина «Противоопухолевые эффекты модифицированных фрагментов GD2-специфичных антител» соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а сам диссертант, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.03 -Молекулярная биология.

Отзыв на диссертацию и автореферат обсуждены и одобрены на заседании коллоквиума лаборатории "Клеточных основ развития злокачественных заболеваний" 2 июня 2015 г., протокол № 15.

Зав. Лабораторией  
Д.б.н., проф. В.С. Прасолов

В.н.с., д.б.н., проф. Е.Е. Егоров

Контактная информация:

119991, Москва, ул. Вавилова д. 32, ИМБ РАН,  
тел. 499- 135-98-49, 499-135-98-06,  
prassolov45@mail.ru,  
yegorov58@gmail.com