

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук
(ИБГ РАН)

Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334

Тел.: +8(499)135-60-89, +8(499)135-98-84 Факс: +8(499)135-41-05

e-mail: info@genebiology.ru; <http://www.genebiology.ru>

ОКПО 00244660 ОГРН 1027739618037 ИНН/ КПП 7736020369/773601001

25.02.2018 г. № 12318-69

На № 209-2171-56 от 23.01.2020



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИБГ РАН

академик РАН

Георгиев П.Г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию **Шиловой Ольги Николаевны**

«Создание адресных противораковых агентов на основе ERBB2-специфичного белка DARPIn 9-29», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Актуальность.

Разработка препаратов для таргетной терапии рака имеет большое практическое значение, так как адресные агенты позволяют не только увеличить эффективность традиционной терапии, но и способствуют развитию персонализированной медицины. Тем не менее, существование хорошо отработанной технологии получения терапевтических моноклональных антител предъявляет серьезные требования к новым адресным модулям, они должны обладать не меньшей аффинностью и селективностью по отношению к своей мишени, и иметь какие-либо преимущества перед антителами. Названными свойствами обладают дарпины, искусственные белки, сочетающие в себе способность избирательно связываться с терапевтическими мишенями с малым размером и простотой наработки в бактериальных системах экспрессии. Диссертационная работа Шиловой О.Н. посвящена использованию белка DARPIn 9-29 в адресных противораковых агентах.

Научная новизна.

В ходе исследования Шилова О.Н. впервые показала, что DARPIn 9-29 специфически связывается с рецептором ERBB2 и легко включается в белки слияния, которые затем эффективно нарабатываются в цитоплазме *Escherichia coli*. Автором работы был выделен и охарактеризован ряд функционально активных белков, специфически связывающихся с мишенью на поверхности клеток. В качестве эффекторных модулей автором были использованы белки различных типов: флуоресцентный белок mCherry, фототенсибилизатор miniSOG и два варианта ингибиторов трансляции на основе экзотоксина *A Pseudomonas aeruginosa*.

Для исследования свойств полученных агентов были использованы современные методы, соответствующие поставленным задачам. Так, анализ токсичности противораковых белков включал в себя не только количественные характеристики, но и изучение механизма клеточной гибели, что важно для применения полученных препаратов *in vivo*. Для двух наиболее эффективных противораковых белков DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE было проведено сравнительное исследование неспецифической токсичности и иммуногенности, наиболее сильно ограничивающих применение белков на основе псевдомонадного экзотоксина в противораковой терапии. Также была впервые изучена скорость интернализации комплекса ERBB2 с DARPIn-miniSOG, что позволяет предсказать эффективность интернализации других белков на основе DARPIn 9-29 и использовать эти свойства для внутриклеточной доставки токсинов.

Практическая значимость.

Данный белок связывается с рецептором ERBB2, также известным как HER2, важным опухолевым маркером, который используется как в диагностике рака молочной железы, яичника, желудка и других, так и в лечении данных заболеваний в качестве мишени для адресной терапии. Разработка ERBB2-специфических препаратов имеет большую практическую значимость, так как рецептор ERBB2 избыточно экспрессируется на перечисленных типах опухолей и опосредует их агрессивные свойства. Эти опухоли являются одними из наиболее распространенных типов первично выявляемых онкологических заболеваний и, несмотря на успехи уже существующей таргетной терапии, являются причиной значительной доли летальных исходов, поэтому актуальность работы не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Шиловой О.Н. имеет традиционную структуру и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, список сокращений и список литературы, включающий 194 источника. Работа изложена на 109 страницах, содержит 34 рисунка и 1 таблицу.

Во введении Шилова О.Н. обосновывает выбор научной проблемы, которой посвящена данная работа, уделяя внимание актуальности и практической значимости вопроса. Обзор литературы посвящен более подробному обсуждению проблем таргетной терапии ERBB2-положительного рака и возможностям их решения за счет использования альтернативных адресных модулей, к которым относятся дарпины. В обзоре освещены преимущества и недостатки дарпинов и примеры их использования как в исследовательской, так и в клинической практике. Материал изложен последовательно и логично, обзор не только суммирует ранее полученные результаты, но и освещает некоторые дискуссионные проблемы таргетной терапии.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны все использованные методики, включающие наработку белков в бактериях, очистку препаратов, работу с культурами клеток млекопитающих и проверку активности и токсичности полученных агентов в лабораторных животных. Все подробности исследования приведены точно и достаточны для их воспроизведения.

Наиболее интересен раздел «Результаты и обсуждение», в котором изложены полученные в работе экспериментальные данные, их анализ и сопоставление с ранее полученными результатами.

Глава «Результаты» включает несколько глав. На первом этапе автор убедительно доказывает специфичность связывания DARPin 9-29 с клетками, гиперэкспрессирующими рецептор ERBB2. Более того, было установлено, что специфичность связывания с рецептором сохраняется после соединения DARPin с флуоресцентным белком mCherry. Это позволило автору получать соединения, включающие DARPin и фрагменты белковых токсинов, и исследовать DARPin 9-29 в качестве агрессивного агента для доставки к опухолевым клеткам токсинов с разным механизмом действия.

Сначала в качестве агрессивного компонента использовали фототоксичный белок miniSOG, который под действием синего света генерирует активные формы кислорода, приводящие к гибели клеток. Диссертантом было установлено, что под действием фототоксина DARPin-miniSOG опухолевые клетки, несущие на поверхности ERBB2

рецептор, гибнут по пути некроптоза. Однако, цитотоксичность значительно снижалась из-за быстрой интернализации фототоксина в комплексе с рецептором ERBB2. Клетки гибли по пути некроза вследствие повреждения цитоплазматической мембраны. Включение фототоксина во внутриклеточные экзосомы резко снижало цитотоксичность.

Далее автор предположил, что обусловленная связыванием с DARPIn 9-29 интернализация рецептора, может оказаться перспективной при адресной доставке токсинов, для цитотоксического действия которых необходимо попадание в экзосому. Исследовались два варианта рекомбинантных белков на основе DARPIn 9-29: DARPIn-PE40, содержащий фрагмент экзотоксина *A Pseudomonas aeruginosa* с молекулярной массой 40кД, и DARPIn-LoPE, содержащий иммунодоминантные эпитопы экзотоксина. Оба белка проявляли специфическую цитотоксичность в отношении ERBB2-гиперэкспрессирующих клеток и убивали клетки по пути апоптоза.

На последнем этапе работы исследовались противораковая активность вышеупомянутых соединений. Оба исследуемых белка достоверно снижали скорость роста опухоли. Также исследовалась неспецифичная токсичность этих соединений с целью выявить побочные эффекты и иммуногенность. Белок DARPInLoPE обладал меньшей токсичностью и меньшей иммуногенностью и его можно рассматривать как кандидата при создании лекарственных соединений для борьбы с раковыми клетками, на поверхности которых гиперэкспрессирован рецептор ERBB2.

Изложение сопровождается иллюстрациями, схемами и графиками. Автором была проведена грамотная обработка и интерпретация полученных данных, их достоверность не вызывает сомнений. Выводы обоснованно следуют из полученных результатов и кратко их резюмируют. Изложенные в работе исследования были опубликованы в 11 статьях в рецензируемых научных журналах, в том числе в высокорейтинговых, относящихся к первому квартилю, таких как *Journal of controlled release*, *Biochimie*, *Cytometry Part A*, *International journal of molecular sciences*, что показывает значимость полученных результатов и заинтересованность в них научного сообщества.

Автореферат диссертации Шиловой О.Н. содержит все необходимые данные о поставленной научной задаче, ее актуальности и ее решении в рамках работы. В тексте автореферата кратко изложены результаты, оценена их новизна, приведены выводы и список публикаций по теме работы.

Тем не менее, к тексту диссертационной работы можно высказать некоторые замечания:

1. При изучении неспецифической токсичности препаратов принято указывать тип исследуемой токсичности (острая или хроническая). В разделах, посвященных сравнению белков DARPin-LoPE и DARPin-PE40, это не уточняется.
2. В обзоре литературы излагается история получения и использования укороченных вариантов псевдомонадного экзотоксина, использованных в данной работе, однако описание модификаций остается довольно кратким. Поскольку изменения, внесенные в последовательность белка, были выбраны на основе данных о структуре белка и его иммунодоминантных эпитопах и тесно связаны, как с активностью токсина, так и с его иммуногенностью, хотелось бы увидеть в тексте обзора последовательности PE, PE40 и LoPE, чтобы можно было понять, что именно модифицировали в каждом случае.
3. Подписи к некоторым рисункам выполнены небрежно, слишком мелкий шрифт затрудняет чтение рисунка.

Однако указанные замечания относятся не к существу работы, а к форме изложения, и не умаляют ценности диссертационной работы Шиловой О.Н. По своей новизне, актуальности и достоверности работа соответствует требованиям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней", «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям, выдвигаемым на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре лаборатории молекулярной иммуногенетики рака Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук 20.02.2020 г.

Заведующая лабораторией молекулярной иммуногенетики рака
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биологии гена Российской академии наук
д.б.н., профессор



Сащенко Лидия Павловна

Адрес: г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5
Тел: (499) 135 97 63
E-mail: sashchenko@genebiology.ru