

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по диссертации на соискание ученой
степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 17 июня 2020 г. № 20

О присуждении **Шиловой Ольге Николаевне**, гражданке Российской Федерации,
ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Создание адресных противораковых агентов на основе ERBB2-специфичного белка DARPIn 9-29» по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология принята к защите 04 декабря 2019 года (протокол № 23) диссертационным советом Д 002.019.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997 Российская Федерация, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России №75/нк от 15 февраля 2013 года.

Соискатель, Шилова Ольга Николаевна 1991 года рождения, в 2015 году окончила Федеральное государственное образовательное учреждение высшего образования Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова по специальности «биохимия». В 2019 году соискатель окончила аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФГБУН ИБХ РАН). В настоящий момент работает младшим научным сотрудником Лаборатории молекулярной иммунологии в ФГБУН ИБХ РАН. Диссертация выполнена в Лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУН ИБХ РАН.

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор, академик РАН **Деев Сергей Михайлович**, заведующий Лабораторией молекулярной иммунологии ФГБУН ИБХ РАН.

Официальные оппоненты: **Прасолов Владимир Сергеевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий Лабораторией клеточных основ развития злокачественных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, и **Жердев Анатолий Виталиевич**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

лаборатории иммунобиохимии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация **Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук** (ФГБУН ИБГ РАН), Москва в своем *положительном* заключении, подписанном д.б.н. Сащенко Лидией Павловной – заведующей Лабораторией молекулярной иммуногенетики рака Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук и утвержденном д.б.н. академиком РАН Георгиевым Павлом Георгиевичем – директором ФГБУН ИБГ РАН, указала, что диссертационная работа Шиловой О.Н. по своей новизне, актуальности и достоверности соответствует требованиям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Соискатель имеет 16 опубликованных работ, в том числе по теме Диссертации 11 работ объемом 11,1 печ.л., опубликованных в рецензируемых научных изданиях, из перечня, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. Недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах в диссертации отсутствуют. Работы по теме диссертации, в которые Шилова О.Н. внесла основной или значительный вклад:

1. Sokolova E., **Shilova O.**, Kiseleva D., Schulga A., Balalaeva I., Deyev S. HER2-specific targeted toxin DArPin-LoPE: immunogenicity and antitumor effect on intraperitoneal ovarian cancer xenograft model. International Journal of Molecular Sciences. 2019. Т. 20. №10. С. E2399.
2. **Shilova O.**, Shilov E., Lieber A., Deyev S. Disassembling a cancer puzzle: Cell junctions and plasma membrane as targets for anticancer therapy. Journal of Controlled Release. 2018. № 286. С. 125-136.
3. Kuzichkina E., Shilova O., Deyev S. The mechanisms of fluorescence quenching of protein photosensitizers based on miniSOG during internalization of the HER2 receptor. Acta Naturae. 2018. Т. 10. №4. С. 87-94.
4. Прошкина Г., Киселева Д., **Шилова О.**, Рябова А., Шрамова Е., Стрёмовский О., Деев С. Бифункциональный токсин Darp-LoPE на основе HER2-специфичного инновационного модуля неиммуноглобулиновой природы как перспективный агент для тераностики. Молекулярная биология. 2017. Т. 51. №6. С. 997-1007.
5. **Shilova O.**, Shilov E., Deyev S. The effect of trypan blue treatment on autofluorescence of fixed cells. Cytometry part A. 2017. Т. 91. № 9. С. 917-925.

6. **Шилова О.**, Прошкина Г., Рябова А., Деев С., Петров Р. Цитотоксичность адресных HER2-специфичных фототоксинов на основе флавопротеида miniSOG определяется скоростью их интернализации. Доклады академии наук, 2017. Т 475. №1. С. 106-109.
7. Sokolova E., Proshkina G., Kutova O., **Shilova O.**, Ryabova A., Schulga A., Stremovskiy O., Zdobnova T., Balalaeva I., Deyev S. Recombinant targeted toxin based on HER2-specific DARPIn possesses a strong selective cytotoxic effect *in vitro* and a potent antitumor activity *in vivo*. Journal of Controlled Release. 2016. № 233. С. 48-56.
8. **Шилова О.**, Прошкина Г., Рябова А., Деев С. Анти-HER2-фототоксин на основе флавопротеида miniSOG вызывает окислительный стресс и некроз HER2-положительных раковых клеток. Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. 2016. № 1, С. 17–22.
9. **Shilova O.**, Proshkina G., Lebedenko E., Deyev S. Internalization and Recycling of the HER2 Receptor on Human Breast Adenocarcinoma Cells Treated with Targeted Phototoxic Protein DARPInminiSOG. Acta Naturae. 2015. Т. 7. №3. С. 126-132.
10. Proshkina G., **Shilova O.**, Ryabova A., Stremovskiy O., Deyev S. A new anticancer toxin based on HER2/neu-specific DARPIn and photoactive flavoprotein miniSOG. Biochimie. 2015. №118 С. 116-122.
11. Миронова К., **Черных О.**, Рябова А., Стрёмовский О., Прошкина Г., Деев С. Высокоспецифичный гибридный белок DARPIn-mCherry для флуоресцентной визуализации клеток, гиперэкспрессирующих онкомаркер HER2/neu. Биохимия. 2014. Т. 79. №12. С. 1700-1706.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н. Прасолова В.С. – положительный, содержит замечания о немногочисленных опечатках и чрезмерно мелком шрифте надписей некоторых рисунков в Автореферате.

Отзыв официального оппонента к.б.н. Жердева А.В. – положительный, содержит следующие замечания и вопросы:

1. Учитывая определенное структурное и функциональное сходство белков семейства ERBB, было бы уместно уточнить при постановке задач, в каких случаях для онкодиагностики необходимо выявление клеток с повышенным уровнем именно ERBB2, тогда как для уровня остальных белков этого семейства не наблюдается значимого роста. При описании конструкций на основе DARPIn 9-29 представляет интерес количественная оценка селективности их связывания по отношению к другим белкам семейства ERBB.

2. Важными параметрами, определяющими конкурентный потенциал альтернативных скаффолдов по сравнению с антителами, являются размер их переменного лиганд-связывающего участка и число аминокислот в нем, а также диапазон измеренных аффинностей скаффолдов данного семейства по отношению

к целевым лигандам. Соответствующая оценка дарпинов была бы уместна при обосновании интереса к ним.

3. При рассмотрении вариантов функционализации наночастиц для онкотерапии (стр. 34-35) следовало бы четко разделить варианты связывания с нативными («голыми») металлическими наночастицами и с наночастицами, покрытыми полимерной оболочкой с функциональными группами. В отсутствие этих пояснений некоторые комментарии становятся неоднозначными, см., например «Дарпины и белки на их основе успешно присоединяются к наночастицам при помощи карбодимидной конъюгации».

4. Сравнивали ли величины IC50, определенные в разделе 3.4.1 для дарпиновых конструкторов, и характеристики аналогичных токсинов, интегрированных с антителами к ERBB2?

Отзыв ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук – положительный, принципиальных замечаний не содержит, обращает внимание соискателя на следующее:

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. 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 прочтение рисунка.

Отзыв на автореферат д.х.н. академика РАН профессора Кочеткова Сергея Николаевича – заведующего лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук. Отзыв положительный, без замечаний.

Отзыв на автореферат д.б.н. профессора Филатова Александра Васильевича – заведующего лабораторией №23 иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения Государственный научный центр «Институт иммунологии» федерального медико-биологического агентства России. Отзыв положительный, без замечаний.

Отзыв на автореферат к.б.н. Поташниковой Дарьи Марковны – научного сотрудника кафедры клеточной биологии и гистологии Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Отзыв положительный, без замечаний.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается наличием у них значительного опыта исследовательской работы в областях, близких к тематике диссертационной работы, что подтверждается их публикациями в ведущих российских и международных журналах. Тематика научных исследований официального оппонента Прасолова В.С. касается идентификации опухолевых антигенов для таргетной терапии, преодоления устойчивости опухолей к ингибиторам протеинкиназ и изучения противоопухолевых препаратов. Работы официального оппонента Жердева А.В. посвящены разработке аффинных рекомбинантных белков и сенсоров на их основе. Ведущая организация, Институт биологии гена Российской академии наук, является признанным лидером в области инженерии рекомбинантных белков и терапевтических систем на их основе. Высокая квалификация, а также большой опыт исследовательской работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяют им объективно оценить научную новизну диссертационной работы, теоретическую и практическую значимость полученных результатов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработаны новые адресные противораковые агенты DARPin-miniSOG, DARPin-PE40 и DARPin-LoPE, протестированные в экспериментальных моделях опухолей *in vitro* и *in vivo*. Доказана совместимость адресного белка DARPin 9-29 с белковыми эффекторными модулями и высокая избирательная токсичность исследованных белков в отношении ERBB2-гиперэксперессирующих культивируемых клеток. Впервые показано уменьшение иммуногенности и неспецифической токсичности белка DARPin-PE40 при замене эффекторного модуля на LoPE. Для двух последних белков было впервые изучено противораковое действие *in vivo* в ксенографтных моделях перевиваемых опухолей.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что была доказана важность мембранной локализации фототосенсбилизатора miniSOG для реализации токсического эффекта. Кроме того, использование флуоресцентных свойств флавопротеина miniSOG позволило изучить скорость интернализации ERBB2 в

комплексе с DARPin-miniSOG и динамику рециклизации данного рецептора, которую следует учитывать при разработке систем внутриклеточной доставки лекарств. В целом, было показано, что при создании белковых адресных агентов следует подбирать направляющий модуль с учетом не только его аффинности, но и взаимодействия с мишенью. Результаты работы были использованы при создании противораковых агентов, попадающих в цитоплазму благодаря эффективной интернализации ERBB2, а именно белков DARPin-PE40 и DARPin-LoPE.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики заключается в том, что в ходе работы были разработаны новые адресные противораковые агенты, специфичные к значимому опухолевому антигену ERBB2, вызывающие гибель раковых клеток *in vitro* и подавляющие рост опухолей в ксенографтных моделях.

Оценка результатов исследования выявила, что достоверность экспериментальных данных не вызывает сомнений, поскольку измерения проводились с использованием сертифицированного оборудования, неоднократно воспроизводились и были правильно статистически обработаны. Выбранные методы исследования адекватны поставленным задачам и соответствуют современному уровню научных исследований.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов, в анализе полученных результатов. Все экспериментальные данные получены автором лично за исключением следующих: исследование внутриклеточной локализации белка DARPin-miniSOG при помощи конфокальной микроскопии было выполнено к.ф.-м.н. А.В. Рябовой (Институт общей физики им. Прохорова РАН), измерение констант аффинности белков было проведено сотрудником лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН Стрёмовским О.А., изучение противораковой активности белков DARPin-PE40 и DARPin-LoPE проводилось совместно с сотрудниками Лаборатории оптической тераностики Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета имени Н.И. Лобачевского. Автор лично представляла результаты работы на международных конференциях и принимала активное участие в написании и подготовке к публикации научных статей.

На основании вышеизложенного диссертационный совет заключает, что диссертация Шиловой О.Н. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой вносят вклад в развитие молекулярной биологии и тераностики,

имеют важное значение для развития персонализированной медицины. Работа написана автором самостоятельно и содержит новые и актуальные научные результаты. Таким образом, диссертационная работа Шиловой Ольги Николаевны «Создание адресных противораковых агентов на основе ERBB2-специфичного белка DARPIn 9-29», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология, соответствует всем требованиям (в том числе п.9), предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено положением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650).

На заседании 17 июня 2020 г. диссертационный совет принял решение присудить Шиловой О.Н. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 7 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 03.01.03 - молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 23, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета



д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

18 июня 2020 г.