

ОТЗЫВ

Официального оппонента на работу **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 темы выполненной работы

Смертность от онкологических заболеваний занимает второе место после сердечно-сосудистых заболеваний. В последние годы отмечается рост числа злокачественных заболеваний, поэтому во многих ведущих научных центрах развитых стран интенсивно ведется разработка новых эффективных противо-раковых соединений. Большинство существующих противо-раковых препаратов обладают цитотоксической активностью, в связи с чем остро стоит задача их селективной адресной доставки в злокачественные клетки, оставляя нетронутыми нормальные здоровые клетки. Для решения этой задачи необходимо а) выявление молекул онкомаркеров, присущих злокачественным клеткам того или иного типа и отсутствующих или представленных в гораздо меньшей степени в нормальных клетках, и б) что не менее важно, получение соединений специфически связывающихся с онкомаркерами. Такие соединения-адаптеры способны адресно доставлять терапевтические цитотоксические соединения в раковые клетки, не причиняя вреда здоровым клеткам.

В лаборатории академика С.М.Деева давно ведутся работы, направленные на разработку эффективных подходов борьбы с широко распространенным онкологическим заболеванием, раком молочной железы, - самой частой причины смерти от рака среди женщин. Диссертационная работа Шиловой О. Н., выполненная в этой лаборатории, посвящена разработке адресных противораковых агентов на основе альтернативных связывающих белков дарпинов (designed ankyrin repeat proteins). Исследованные в работе рекомбинантные белки содержат в своем составе адресный модуль (дарпин) DARPIn 9-29, избирательно связывающийся с молекулой ERBB2. Для раковых клеток молочной железы характерен высокий уровень экспрессии рецепторной тирозинкиназы ERBB2 (второй рецептор фактора роста эпидермиса), известной также, как HER2. Гиперэкспрессия ERBB2 обнаружена в 25-30% опухолей молочной железы, в то же время гиперэкспрессия ERBB2 отмечена и в опухолях других типов, таких как рак желудка, простаты, легких, яичников и, как правило, она ассоциирована с неблагоприятным прогнозом для пациента. Таким образом, актуальность работы и ее прикладная значимость не вызывают сомнения.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа Шиловой О.Н. изложена по традиционному плану, изложена на 109 страницах, включающих 34 рисунка и 1 таблицу. «Введение» посвящено краткому описанию работы, обоснованию ее актуальности и значимости полученных результатов. Эта глава включает также сведения об апробации результатов. Обзор литературы начинается с экскурса в историю развития адресной терапии рака и с описания эффективности и недостатков применяемых на сегодня в клинической практике препаратов трастузумаб, пертузумаб, трастузумаб-эмтазин, лапатиниб и нератиниб. В первых двух разделах автор описывает применяемую терапию и обозначает проблемы, для решения которых могут быть использованы альтернативные связывающие белки, в том числе дарпины. Следующие семь разделов посвящены структуре дарпинов и суммируют результаты их использования в различных конструкциях: мультидоменных дарпинах, адресных токсинах, наночастицах, онколитических вирусах и лимфоцитах с химерными антигенными рецепторами. В заключительной части обзора кратко перечисляются преимущества дарпинов перед моноклональными антителами и рассматриваются перспективы их включения в набор инструментов таргетной терапии и персонализированной медицины. Обзор литературы написан достаточно подробно и позволяет заинтересованному читателю быстро войти в круг решаемых в диссертационной работе проблем.

Глава «Материалы и методы» подробно описывает использованные в работе реактивы, оборудование и протоколы проведения экспериментов. В работе задействован широкий спектр молекулярно-биологических и физико-химических методов, включающих в себя выделение и очистку белков, работу с культурами эукариотических клеток, проточную цитометрию, иммуноферментный анализ, исследование противораковой активности и токсичности белков на животных и другие. Выбранные Шиловой О.Н. методы исследования адекватны поставленным задачам, описания экспериментов достаточно подробны и могут служить руководством для их воспроизведения.

Глава «Результаты и обсуждение» хорошо структурирована, изложение результатов следует логике исследования. Сначала Шилова О.Н. показывает возможность эффективной наработки белка DARPin 9-29 в цитоплазме бактерий и сохранение адресных свойств DARPin 9-29 в составе белка слияния с флуоресцентным модулем mCherry. Затем автор переходит к выделению и характеристике противораковых агентов с различными механизмами действия. Следует отметить, что помимо изучения свойств этих

препаратов, имеющих очевидное прикладное значение, работа также включает исследование фундаментальных вопросов, таких как скорость интернализации белка DARPIn-miniSOG в комплексе с рецептором и причины снижения интенсивности флуоресценции DARPIn-miniSOG в эндосоме.

Наибольший интерес с клинической точки зрения представляют разделы диссертационной работы, посвященные противораковой активности белков на основе псевдомонадного экзотоксина DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE. Оба агента обладают избирательной токсичностью в отношении ERBB2-положительных клеток, которая проявляется в пиколярном диапазоне концентраций и реализуется по механизму апоптоза, наиболее предпочтительному с точки зрения терапии. Активность DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE была показана не только *in vitro*, но и в ксенографтных моделях опухолей *in vivo*. Сравнение белков было завершено изучением их неспецифической токсичности и иммуногенности, серьезно ограничивающих применение противораковых агентов на основе экзотоксина А. В свете этого особый интерес представляет DARPIn-LoPE, у которого в экзотоксиновом модуле удален домен, определяющий его иммуногенность.

Научная новизна и практическая значимость работы

Диссертационная работа Шиловой О.Н. является исследованием нового класса связывающих белков, предназначенных для противораковой терапии, включающим всестороннее изучение свойств модуля DARPIn 9-29. Впервые исследована совместимость адресного белка DARPIn 9-29 с токсинами с различным механизмом действия и установлено влияние скорости интернализации на эффективность их работы.

Достоверность и обоснованность результатов

Работа выполнена на высоком методическом уровне, включающем широкий арсенал современных методов, грамотное планирование экспериментов и тщательную статистическую обработку полученных данных, поэтому достоверность изложенных результатов не вызывает сомнений. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, нашли отражение в составе 11 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, в том числе в таких известных, как Journal of controlled release, Biochimie, International journal of molecular sciences, и 11 тезисных сообщений, представленных на российских и международных конференциях.

Работа как по самой сути, так и по оформлению заслуживает самой высокой оценки. Замечания могут вызвать немногочисленные опечатки и чрезмерно мелкий шрифт


надписей в некоторых рисунках в Автореферате, затрудняющий их прочтение. Однако эти замечания не носят принципиального характера и нисколько не уменьшают ценности работы в целом.

Заключение

Исходя из актуальности, научной новизны и практической значимости, присущих данной работе, можно заключить, что диссертация Шиловой Ольги Николаевны является законченной научно-квалификационной работой, соответствующей всем требованиям (в частности п.9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением 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), а сам диссертант Шилова Ольга Николаевна заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Официальный оппонент

Прасолов Владимир Сергеевич,

доктор биологических наук, профессор, 
главный научный сотрудник лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний

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

Контактные данные:

Телефон: 8(499)135-23-11

E-mail: prassolov45@mail.ru

Почтовый адрес: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Подпись д.б. н., Прасолова В.С. заверяю:

Ученый секретарь ИМБ РАН

кандидат ветеринарных наук

Бочаров Александр Анатольевич

Дата 07.02.2020

