

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

Существующая таргетная терапия новообразований основывается в первую очередь на использовании антител к биомаркерам опухолевых клеток, служащих средством направленной доставки фармпрепаратов внутри организма. Однако в последние годы спектр молекул, которые можно использовать для направленной доставки лекарств, существенно расширился благодаря выявлению альтернативных скаффолдов: аффибоди, антикалинов, дарпинов и других. Отличия таких рецепторных молекул от иммуноглобулинов по физико-химическим свойствам обуславливают их конкурентные преимущества как терапевтических средств. Диссертационная работа Шиловой О.Н. посвящена созданию и изучению адресных агентов на основе искусственных белков неиммуноглобулиновой природы – дарпинов (DARPin), а именно, на основе ERBB2-специфичного белка DARPin 9-29.

Актуальность выбранной темы обусловлена распространённостью онкозаболеваний, ассоциированных с гиперэкспрессией рецептора ERBB2 (HER2) и выражающихся в злокачественных новообразованиях молочной железы, яичника, простаты, поджелудочной железы, желудка и легких, а также востребованностью новых терапевтических решений в онкотерапии с длительным действием и минимизацией побочных негативных воздействий.

Диссертационная работа изложена на 109 страницах, содержащих 34 рисунка и одну таблицу, и имеет традиционную структуру. Во «Введении» обосновывается выбор цели исследования и задач, решению которых посвящена работа, обсуждаются актуальность и практическая значимость полученных результатов. В этом разделе приведены краткое обобщенное описание использованных методов и основные результаты исследования в виде положений, выносимых на защиту. Завершается введение информацией об апробации результатов и об изданиях, в которых они были опубликованы.

Обзор литературы начинается с обсуждения успехов и ограничений современных стратегий адресной терапии ERBB2-положительных опухолей. Далее автор переходит к описанию дарпинов, которые могут стать основой для новых адресных противораковых агентов. Разнообразие областей применения молекул этого класса и наличие препаратов, находящихся на разных стадиях клинических испытаний, убедительно доказывают

востребованность дарпинов в биотехнологии и терапии. Обзор обеспечивает достаточно полное рассмотрение существующего уровня исследований по тематике диссертационной работы, включает ключевые публикации последних лет и подтверждает высокий профессиональный уровень диссертанта.

В разделе «Материалы и методы» описаны проведенные в ходе работы эксперименты; детальность изложения обеспечивает читателей всей необходимой информацией для их оценки и воспроизведения исследования. О.Н. Шиловой применены современные методы характеристики полученных белков, адекватные задачам работы. Эксперименты выполнены с необходимым количеством повторностей и набором контролей, описываемые закономерности статистически подтверждены. В связи с этим достоверность полученных диссертантом результатов не вызывает сомнений.

В главе «Результаты и обсуждение» суммированы данные о наработке, очистке и характеристике белков DARPin, DARPin-mCherry, DARPin-miniSOG, DARPin-LoPE и DARPin-PE40. Сначала О.Н. Шиловой были получены белок DARPin 9-29 и содержащий его конструктор DARPin-mCherry, позволяющие отследить связывание дарпина с ERBB2 на поверхности раковых клеток и подтвердить сохранение аффинности адресного модуля в составе рекомбинантного белка. Исследование белка DARPin-miniSOG имеет скорее фундаментальное значение, поскольку его флуоресцентные свойства позволили отследить интернализацию адресного белка в комплексе с мишенью и получить данные о рециклизации ERBB2. Кроме того, была подтверждена гипотеза о важности локализации фотосенсибилизатора для реализации токсического действия генетически кодируемых фототоксинов на основе miniSOG. Отметим, что сведения о способности DARPin 9-29 вызывать интернализацию ERBB2 были учтены при создании следующей серии адресных агентов, содержащих фрагменты экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa*.

Наибольшую практическую значимость представляет исследование белков DARPin-PE40 и DARPin-LoPE, обладающих исключительно высокой токсичностью *in vitro* (0,1 пМ и 16 пМ соответственно) и достоверным противораковым действием *in vivo*. В ходе работы для этих белков были также получены данные о неспецифической токсичности и иммуногенности.

При прочтении диссертации возникли некоторые замечания:

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 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 варибельного 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 в обзоре литературы 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 карбодиимидной конъюгации».

4. Сравнивали ли величины IC_{50} , определенные в разделе 3.4.1 для дарпиновых конструкторов, и характеристики аналогичных токсинов, интегрированных с антителами к ERBB2?

Однако данные замечания являются частными, не снижающими общую положительную оценку диссертационной работы О.Н. Шиловой и не оспаривающими ее выводы и положения, выносимые на защиту.

Содержание диссертационной работы Шиловой О.Н. соответствует специальности 03.01.03 – Молекулярная биология и полностью представлено научному сообществу в виде статей и выступлений. По результатам исследования опубликовано 11 статей в рецензируемых научных журналах, представлено 12 докладов на научных конференциях. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам работы, полно и адекватно отражает результаты исследования.

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 согласно Постановлениям Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; от 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

Жердев Анатолий Виталиевич,
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиохимии
Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук

27 апреля 2020 г.

Контактные данные:

Телефон: 8 (916) 113-80-61

E-mail: zherdev@inbi.ras.ru

Почтовый адрес: 119071 г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2

