

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию И.И. Доронина

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

Диссертационная работа И.И. Доронина посвящена актуальной проблеме разработки подходов к созданию новых адресных и высокоэффективных противоопухолевых препаратов, обладающих минимальными побочными эффектами. Среди всех онкологических заболеваний можно выделить довольно обширную группу опухолей, экспрессирующих на поверхности клеток онкоассоциированные ганглиозиды, которые могут быть использованы в качестве мишени для противоопухолевой терапии. В качестве наиболее перспективной мишени многие исследователи рассматривают ганглиозид GD2 из-за высокого различия в экспрессии между злокачественными клетками, включая раковые стволовые, и нормальными нетрансформированными клетками. Ганглиозид GD2 экспрессируется опухолями, для которых эффективность классических методов лечения находится на довольно низком уровне, что еще больше увеличивает актуальность исследования. В настоящее время ведется активная разработка иммунотерапевтических подходов к лечению GD2-позитивных опухолей. Применение антител к GD2 дало существенный эффект, выраженный в подавлении опухолевых клеток в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Препарат на основе GD2-специфических моноклональных антител недавно был одобрен FDA для клинического использования. Вероятно, в ближайшем будущем появятся новые препараты, направленные на опухолеассоциированный ганглиозид GD2.

В то же время, в ходе клинических исследований препаратов на основе моноклональных антител выявлены побочные эффекты, вызванные, в частности, гиперактивацией иммунной системы, что во многом опосредуется Fc-фрагментом этих молекул. Кроме того, большинство GD2-позитивных новообразований представляют собой солидные опухоли, для которых характерна невысокая противоопухолевая эффективность моноклональных антител, что обусловлено низкой проникающей способностью полноразмерных иммуноглобулинов,

характеризующихся большими размерами.

Таким образом, разработка небольших стабильных GD2-специфичных молекул, способных эффективно индуцировать гибель опухолевых клеток является действительно актуальной задачей молекулярной биологии и онкологии. В настоящее время ганглиозид GD2 рассматривается исключительно как молекула-маркер некоторых опухолевых клеток, а основными механизмами действия GD2-специфических препаратов моноклональных антител принято считать активацию классического иммунного ответа через комплементзависимую цитотоксичность и антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность. Собственная функциональная активность ганглиозида GD2 остается вне основного фокуса исследований, несмотря на то, что прямой цитотоксический эффект GD2-связывающих антител был показан в ряде работ. Представленная работа частично восполняет этот пробел.

Диссертационная работа является логическим продолжением проводимых в лаборатории исследований и построена традиционным образом. Текст диссертации, включая список литературы, изложен на 159 страницах, содержит 53 рисунка и 7 таблиц. В структуру диссертации входят: введение; обзор литературы; описание материалов и методов исследования; изложение собственных результатов и их обсуждение; заключение и выводы. Список литературы содержит 199 источников. Актуальность, цели, задачи, новизна, научно-практическая значимость работы доступным образом изложены во введении. Обзор литературы занимает значительный объем диссертации, подробно отражает современное состояние проблемы, существующие направления развития технологий и обосновывает используемые подходы. Он написан хорошим языком и содержит много иллюстраций.

Для решения поставленных задач диссертант выбрал большое число адекватных, современных экспериментальных подходов. Их описание в разделе «Материалы и методы» позволяет другим исследователям повторить используемые в работе методики.

Представленные автором в разделе «Результаты и их обсуждение» данные отличаются научной новизной. Показана прямая индукция клеточной гибели GD2-позитивных опухолевых клеток под действием различных фрагментов

моноклональных антител, включая оригинальные рекомбинантные scFv-фрагменты. Произведена сравнительная оценка вклада различных механизмов клеточной гибели в процессы, запускаемые под действием полноразмерных антител и их GD2-специфичных производных. Впервые для фрагментов GD2-специфичных антител показано, что увеличение времени циркуляции за счет монопегилирования Fab-фрагментов в мышинной модели приводит к существенному усилению противоопухолевого эффекта по сравнению с немодифицированными аналогами.

Представлены результаты большой по объёму работы с различными GD2-позитивными и GD2-негативными клеточными линиями. С использованием оригинального подхода были получены GD2-специфичные антитела и их фрагменты, включая рекомбинантные scFv-фрагменты. Полученные экспериментальные результаты хорошо иллюстрированы. Статистическая обработка представленных данных проведена на должном методическом уровне. Несмотря на то, что, на мой взгляд, в данном разделе недостаточно внимания уделяется обсуждению результатов в контексте мировой научной литературы, в целом он производит крайне благоприятное впечатление из-за качества и объема проделанной работы.

В разделе «Заключение и выводы» фактически представлены только выводы. Они хорошо сформулированы, полностью соответствуют поставленным задачам и полученным результатам. Однако помимо выводов из заключения хотелось бы узнать мнение автора о перспективах дальнейших исследований, практического использования результатов его работы и, возможно, получить рекомендации на эту тему.

В итоге, в своей диссертационной работе автором экспериментально доказано, что индукция клеточной гибели GD2-специфичными антителами является общим и специфичным свойством, характерным для GD2-позитивных опухолевых линий. Данный вывод в некоторой степени повторяет данные, полученные в других лабораториях, однако проведенная экспериментальная работа значительно расширяет полученные ранее сведения. Существенной заслугой автора является получение линии клеток гибридомы, продуцирующей GD2-специфичные антитела, обладающие хорошими показателями связывающей

способности. Индукция иммунного ответа на молекулы липидов сама по себе является весьма нетривиальной задачей и получение антител, не проявляющих кросс-реактивности с близкими по структуре ганглиозидами является действительно сложной задачей. По результатам изотипирования были получены молекулы антител IgM-класса, что осложняет их возможное применение в клинике за счёт существенных размеров данных молекул, однако не является препятствием в достижении цели и решении задач исследования. В ходе работы получены различные GD2-связывающие фрагменты на основе нескольких типов GD2-специфичных антител. Для всех полученных фрагментов была проанализирована цитотоксичность на опухолевых клеточных линиях. Для модификации фрагментов антител, которая требовалась в связи с невысоким по сравнению с полноразмерными антителами временем циркуляции молекул в организме, была выбрана методика сайт-направленного пегилирования. Интересно было бы изучить противоопухолевый эффект пегилированных scFv-фрагментов, так как они являются наименьшими стабильными фрагментами антител. Поскольку пегилирование приводит к усилению противоопухолевой активности Fab-фрагментов за счет увеличения времени их циркуляции в организме можно предположить, что данные закономерности будут сохраняться и для пегилированных scFv-фрагментов.

Кроме того, хотелось бы увидеть результаты экспериментов по определению констант связывания полученных фрагментов антител, а также более глубокий анализ их противоопухолевой активности *in vivo*. Однако, приведенные данные достаточно наглядно демонстрируют общие закономерности и не вызывают сомнений.

По теме диссертационной работы опубликовано 6 статей в рецензируемых научных изданиях, одна из них в международном журнале. Кроме того, основные материалы работы были представлены и обсуждены на 9 национальных и международных конференциях. Все положения, выносимые на защиту, обоснованы, сделанные автором выводы адекватны полученным результатам, а автореферат диссертации целиком отражает ее основное содержание.

Диссертационная работа И.И. Доронина «Противоопухолевые эффекты модифицированных фрагментов GD2-специфичных антител» является научно-

квалификационной работой, имеющей существенное значение для расширения знаний о фундаментальных свойствах опухолеассоциированных ганглиозидов и развития методов терапии GD2-позитивных онкологических заболеваний. Таким образом, диссертационная работа соответствует всем критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - Молекулярная биология.

Ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии отдела персонализированной медицины Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ), к.б.н.

Лупатов Алексей Юрьевич

119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, д. 10,
стр. 8.

Тел. +7 (499) 246-86-22.

E-mail: alupatov@mail.ru

Подпись

Лупатов А.Ю.

заверяю

Ученый секретарь ИБМХ к.х.н. Карпова Е.А.

