

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКОВ М.М.ШЕМЯКИНА И Ю.А.ОВЧИННИКОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИБХ РАН)

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН

24 июня 2015 года

Защита диссертации

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Дорониным Игорем Игоревичем

«Противоопухолевые эффекты модифицированных фрагментов GD2-специфичных
антител»

по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Москва

2015 г.

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН

24 июня 2015 года

Председатель диссертационного совета
академик РАН

В.Т. Иванов

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 5.

1. Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2. Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
3. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
4. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
5. Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(03.01.06)
6. Член-корр. РАН	Деев Сергей Михайлович	(03.01.03)
7. Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(02.00.10)
8. Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
9. Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
10. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
11. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
12. Академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
13. Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
14. Академик РАН	Гришин Евгений Васильевич	(02.00.10)
15. Д.х.н.	Молотковский Юлиан Георгиевич	(02.00.10)
16. Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
17. Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
18. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
19. Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
20. Д.х.н.	Формановский Андрей Альфредович	(02.00.10)
21. Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)

В.Т. Иванов:

Доронин Игорь Игоревич защищает диссертацию на тему "Противоопухолевые эффекты модифицированных фрагментов GD2-специфичных антител" на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Разрешите предоставить слово учёному секретарю.

В.А. Олейников:

(зачитывает документы из личного дела соискателя; отмечает, что объявление о защите диссертации размещено на сайте ВАК вовремя, все необходимые документы в деле есть).

В.Т. Иванов:

Похоже все формальные требования выполнены. Есть вопросы к учёному секретарю? Тогда разрешите предоставить слово диссертанту. Пожалуйста, двадцать минут в вашем распоряжении.

И.И. Доронин:

(излагает основные положения диссертационной работы).

В.Т. Иванов:

Спасибо за доклад. Переходим к обсуждению. У кого возникли вопросы?

Л.И. Патрушев:

Скажите пожалуйста, каковы ваши дальнейшие планы относительно данных антител?

И.И. Доронин:

Сейчас мы работаем над тем, чтобы подобрать оптимальный формат конечной молекулы. С одной стороны известно, что scFv-фрагменты являются молекулами наименьшего формата производных моноклональных антител и в основном используются для диагностики в силу того, что они достаточно быстро выводятся из организма. Однако, после определенных модификаций например, пегилирования, или получения мультимерных или бивалентных форм, они будут соответственно больше, будут стабильнее и будут интереснее с терапевтической точки зрения. Помимо этого, мы предполагаем получение панели рекомбинантных форм наших антител, дальше будем смотреть их эффективность. Как только мы точно определимся с их эффективностью, разберемся с механизмом, мы надеемся что в конечном итоге, при достаточных условиях получится сделать эффективный противоопухолевый препарат.

Л.И. Патрушев:

Насчет иммуногенности у человека у Вас есть какие-то представления?

И.И. Доронин:

Что касается иммуногенности данных антител, вся терапия GD2-позитивных опухолей развивается уже довольно давно, практически тридцать лет, на самом деле только в марте этого года FDA одобрило первый эффективный препарат химерных GD2-специфичных антител, причем в составе комплексной терапии. Основной механизм действия этого препарата - ADCC, там был получен довольно большой комплекс и только для терапии нейробластомы. Исследования начинались с

мышинными антителами, понятно, что они были безумно иммуногенны, затем иммуногенность снижали путем химеризации. При этом антитела, одобренные FDA – это химерные антитела, но клинические испытания также проходят гуманизированные молекулы. Всё зависит от требований регулятора, то есть, если химерные антитела были разрешены, то этот факт несколько упрощает процесс и потенциальная иммуногенность будет ниже.

Л.И. Патрушев:

То есть прежде всего Вы предполагаете использовать данные антитела прежде всего в плане диагностики?

И.И. Доронин:

Мы планируем развивать и диагностику, и терапию, потому что методы определения GD2 существуют, но они очень сложные, и они далеко не везде представлены. Терапия – это намного дольше, это понятно. Диагностику можно сделать намного быстрее. Будем работать над этой проблемой.

Л.И. Патрушев:

Спасибо!

Д.А. Долгих:

На самом деле у меня два вопроса, если можно. Первый вопрос: константа взаимодействия. Вы ничего о них, никаких данных не привели. Каковы константы взаимодействия для Ваших полноразмерных антител, фрагментов? На сколько Вы там потеряли, на графике МТТ было на самом деле видно, что Вы явно там потеряли. А Вы сравнивали свои антитела по этому параметру с тем, что было получено в мире с тем, что было получено у Вас?

И.И. Доронин:

Спасибо за вопрос! Что касается констант – конкретно в наших данных условиях можно было использовать методы конкурентного иммуноферментного анализа, но к сожалению, в силу природы этого антигена, использование этих методов очень сильно затруднено. Непосредственно константу мы не измеряли, т.к. сейчас только подходим к решению этой задачи.

Д.А. Долгих:

А поверхностный плазмонный резонанс?

И.И. Доронин:

Вот как раз поверхностный плазмонный резонанс мы и планируем использовать в ближайшем будущем. Но пока что, к сожалению, константу мы не определили. Но мы этим занимаемся.

Д.А. Долгих:

Второй вопрос: действительно, тридцать лет изучают... Первый вывод у Вас говорят о том, что в мире недостаточное количество клеточных линий было протестировано, у Вас их двадцать, поэтому Вы делаете вывод о том, что это общее свойство. Можно все-таки сказать, исследование скольких клеточных линий в мире было проведено? Уже и клиника там идет, а все таки...? Это было сделано давно...

И.И. Доронин:

Это было сделано действительно достаточно давно. Основными механизмами считаются ADCC и CDC, т.е. на клеточных линиях все работы были довольно разрозненными. Если говорить о каком-то конкретном количестве, то на одну статью может быть одна линия, могут быть две. При этом это было скорее было не основной целью исследования. Такие исследования проводились, но так чтобы обобщать или сделать какое-то более серьезное исследование по механизму прямой цитотоксической активности самих антител без вовлечения общих механизмов иммунной системы, таких исследований в мире не проводилось.

Д.А. Долгих:

Спасибо!

В.Т. Иванов:

Вы упомянули, что первоначального генерирования антител Вы иммунизировали животных пептидами, имитирующими ганглиозиды, конъюгированные с гемоцианином. Что за пептиды? Откуда они взялись?

И.И. Доронин:

На самом деле данные по пептидам были получены из литературных источников. GD2-мимикрирующие пептиды были получены методами (насколько я помню), рентгеноструктурного анализа комплексов GD2- антитело.

В.Т. Иванов:

Пептид имитирует ганглиозид...по своей структуре или по своей специфичности он имитирует ганглиозид? Вряд ли он своей структуре может имитировать ганглиозид.

И.И. Доронин:

По пространственному расположению, т.е. по своей конформации.

В.Т. Иванов:

Понятно, я удивлен. Но ладно... Еще вопросы есть? Прошу Вас.

С.М. Деев:

В первой части своего доклада Вы применили совершенно адекватный подход: для увеличения времени циркуляции ваших мини-антител в крови. Известно, что они все очень отличаются размером, в процессе клубочковой фильтрации, когда размеры пор 6.5 нм, что разрешает проницаемость порядка 60 кДа, в то же время Вы в Вашем 25 кДа мини-антителам, Вы присоединяли к нему еще 5-10 кДа, почему Вы не взяли больший продукт – 20 кДа?

И.И. Доронин:

Спасибо за вопрос. В данном случае мы пока подходили к вопросам модификации и на самом деле, в нашем распоряжении их было два типа полиэтиленгликоля. В будущем мы посмотрим более крупные молекулы, без сомнения. Но пока что для отработки самой реакции, которая в общем довольно специфическая, и проходит сайт-направленно, мы решили, что молекулы меньшего размера будут оптимальными. Но, разумеется, мы будем проводить работу и с более крупными молекулами, потому что в этом действительно есть смысл, спасибо.

В.Т. Иванов:

Есть еще вопросы? Николай Владимирович!

Н.В. Бовин:

Мне хотелось бы знать более точно итоговую специфичность данных моноклональных антител. Дело в том, что те свойства, которые Вы здесь описываете, которые интересны для диагностических и для практических целей, они в очень значительной степени определяются только специфичностью. То, что я увидел на слайде - это Вы посмотрели перекрест с тремя ганглиозидами, а мне хотелось бы знать, было ли что то сделано больше, ну, в частности, то, что напрашивается с ходу, это - сравнить антитела, связанные с цельным ганглиозидом по сравнению со свободным тетрасахаридом, с более широким кругом ганглиозидов, похожих на этот, со смесями ганглиозидов и кое что еще...было ли сделано что то еще, что не вошло в диссертацию? И где те исследования, которые определяют специфичность ганглиозидов?

И.И. Доронин:

Спасибо за вопрос. Что касается данных исследований, в данный доклад не вошли исследования по кросс-реактивности непосредственно опухолевых клеточных линий, которые мы разделяем на GD2 и GD3 позитивные и негативные, показывая их кросс-реактивность. Что касается других антигенов, проверить интересно, но, в первую очередь, в качестве нашей задачи стояло изучение эффектов на клетках, т.е. при этом специфичность, разумеется, играет роль, но в нашем случае мы получили антитела, которые обладают существенными цитотоксическими эффектами, которые мы и будем в дальнейшем изучать. И специфичность – будем, это будет одним из требований обязательно. Мы будем смотреть, проверять, но пока что вот с

углеводными не смотрели... Главное, что для нас важнейшей задачей было проверить кросс-реактивность с ганглиозидами, схожими по структуре, потому что сам по себе ганглиозид GD2 довольно специфично экспрессируется именно опухолевыми клетками и при этом на поверхности нормальных клеток его немного. Другие ганглиозиды, которые мы проверяли в том числе экспрессируются нормальными клетками, соответственно, нам было важно понять, насколько специфичны наши антитела по отношению к этим близким ганглиозидам. Оказалось, что они, действительно обладают низкими параметрами кросс-реактивности и с точки зрения функциональных эффектов – это хорошо. В частности, если мы возьмем полноразмерные антитела, те побочные эффекты, о которых я говорил, это нейротоксичность и гиперактивация иммунной системы, они обеспечиваются за счет того, что GD2 экспрессируется нормальными клетками.

Н.В. Бовин:

И к этому же вопросу. Сравнивали ли Вы количественно, как связываются эти антитела с ганглиозидами по сравнению с пептидомиметиками?

И.И. Доронин:

Да, мы это иммуноферментным анализом проверяли, сравнивали, такие эксперименты были. Связываются с пептидами значительно хуже, чем с чистым ганглиозидом. Это может быть особенностью иммуноферментного анализа.

Н.В. Бовин:

Не понял - антитела связываются с пептидомиметиком хуже, чем с ганглиозидом?

И.И. Доронин:

Да. Думаю, что это особенность иммуноферментного анализа, может быть из-за размеров комплекса с антителом.

Н.В. Бовин:

Надо будет посмотреть потом.

В.Т. Иванов:

Есть еще вопросы? Похоже, что вопросы иссякли. Спасибо. Есть возможность ненадолго отдохнуть. Переходим к заслушиванию отзывов ведущей организации.

В.А. Олейников:

Ведущая организация – это Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук. Отзыв положительный, соответственно, я его зачитываю. (Зачитывает отзыв; отзыв прилагается).

Замечания.

В диссертации встречаются довольно смешные конструкции русского языка, включая образование новых слов, например:

На стр. 61 «с использованием флуоресцентно активированных клеток (FACs) сортировкой селекцией»

На стр. 72 «белок был введен ксенотрансплантированным нейробластомой безтимусным мышам с быстрой очисткой от несвязавшегося белка»

На стр. 78 «отмывку проводили на автоматическом вошере»

Подписи к рисункам бывают не совсем точными:

«Рисунок 28. Прямой ИФА, на подложке ганглиозид GD2 (250нг/лунка)»

Рисунок 53 изображает вскрытую брюшную полость мыши. Подпись к рисунку «Общий вид лабораторных животных ...»

Несколько раз повторяется слово «метастаз» вместо «метастазов».

На стр. 65 и стр.71 – повторы двух строчек

На стр. 130

«По-видимому, индукция увеличения потенциала митохондрий является первым событием в клетках, происходящим после добавления к ним анти-GD2-мАт ME361 и их Fab-фрагментов».

Эта фраза вызывает сомнения в том, что именно имеет в виду автор.

На стр. 141. Представлен раздел «Заключение и выводы», однако заключения нет.

Заключение.

Диссертационная работа И.И. Доронина «Противоопухолевые эффекты модифицированных фрагментов GD2-специфичных антител» является законченной квалификационной научно-исследовательской работой, и содержит интересные данные, отражающие новый перспективный подход к решению важной научной задачи по разработке эффективных таргетных противоопухолевых препаратов, имеющих большое значение для фундаментальной биологии и практической медицины. Исследование характеризуется высокой актуальностью, научной новизной, корректностью использования методов, что позволило обеспечить объективность и достоверность полученных результатов.

Научная и практическая значимость работы, ее высокий методический уровень, несомненная новизна позволяют сделать вывод о том, что диссертация И.И. Доронина «Противоопухолевые эффекты модифицированных фрагментов GD2-специфичных

антител» соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней", предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а сам диссертант, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.03 -Молекулярная биология.

Отзыв на диссертацию и автореферат обсуждены и одобрены на заседании коллоквиума лаборатории "Клеточных основ развития злокачественных заболеваний" 2 июня 2015 г., протокол № 15.

И.И. Доронин:

Я согласен с замечаниями ведущей организации относительно русского языка, я буду над этим работать и более тщательно выбирать определенные термины. Хотя в некоторых случаях, например, метастаз и метастазов, используются как один, так и другой. При этом, что касается первого эффекта, действительно, следовало написать сначала связывание, а уже потом интернализация комплексов каких-то, либо, какие-то механизмы, которые пока еще не изучены, в целом по отзыву – да, я согласен, спасибо.

В.Т. Иванов:

Спасибо. Дальше у нас по протоколу научный руководитель может выступить, Роман Васильевич Холоденко.

Р.В. Холоденко:

Здравствуйте! Игорь Игоревич пришел работать в наши ряды давно. Порядка шести лет назад он появился у нас для выполнения летней практики, будучи студентом биологического факультета МГУ кафедры биоорганической химии. Нам сразу стало понятно, что появился талантливый молодой человек, который обладает разносторонними интересами, широким кругозором, но в то же время способный сфокусироваться на выполнении достаточно узкой задачи. Игорь успешно защитил сначала курсовую работу, потом – дипломную работу на нашей базе, в нашей группе, и окончил Московский Государственный Университет с красным дипломом. Т.е. Игорь подошел к диссертационной работе с определенным багажом знаний в этой области, с пониманием проблемы, в связи с этим, была возможность предоставить Игорю достаточно сложную и принципиальную задачу, работу, что потребовало от Игоря больших усилий, особенно интеллектуальных. В его работе было много всего – как экспериментов, так и работы с литературой, она всегда необходима. Игорь со всем этим справился. Также следует отметить морально-волевые качества. Когда были отрицательные эксперименты, Игорь не сдался, не бросил на полпути, а в работе собрался и все задачи были реализованы. Хочется отметить человеческие качества Игоря, он открытый доброжелательный человек, с ним приятно общаться, также принимает активное участие в конференциях, в школах молодых ученых, конкурсах, участие успешное. В общем и целом, могу сказать, что диссертационная работа не была для Игоря легкой прогулкой, это сложная, на каких-то этапах не комфортная, но она способствовала становлению Игоря, как молодого ученого.

В.Т. Иванов:

Спасибо. У нас есть отзывы на автореферат. Давайте ознакомимся.

В.А. Олейников:

В Совет поступило два отзыва на автореферат. Оба положительные. Один из них подписан старшим научным сотрудником лаборатории инженерии белка Литвиновым. Тут совершенно без замечаний. Все очень положительно. А второй я считаю, что надо даже какой-то кусок зачитать, внимательно, так сказать, ознакомить членов диссертационного совета. Этот отзыв тоже положительный, и вот, что пишется, некая начальная часть, сугубо подчеркивающая значимость и высокий уровень этой работы. Дальше текст со слов: работа выполнена на высоком методическом уровне. Материал, представленный в автореферате, хорошо иллюстрирован, выводы корректны. Замечаний к работе почти нет – однако при прочтении автореферата возникает несколько пожеланий на будущее. Так, вывод №1 представляется чересчур смелым: сделать заключение о том, что индукция клеточной гибели «является общим... свойством GD2-позитивных опухолевых линий» (т.е. характерна для всех таких линий), на основании анализа всего лишь трёх из них едва ли возможно. Тем не менее, надо признать, что результаты данного анализа служат очень серьёзным аргументом в пользу такого заключения. Второе пожелание – в опытах по индукции гибели клеток GD2-специфичными антителами было бы полезно поставить контрольный эксперимент, в котором было бы показано отсутствие аналогичного эффекта при использовании любых других антител с похожими свойствами (вероятно, речь об антителах IgG-типа). В то же время, стоит отметить, что Доронин применил другой удачный контроль на специфичность, взяв GD2-негативные линии и показав на них отсутствие эффекта. В-третьих, в опыте, результаты которого представлены на Рис. 9В, также не помешал бы отрицательный контроль (например, опыт с аналогичной фракцией, полученной из преиммунной сыворотки, либо просто с другими, неспецифичными антителами) – поскольку разница в эффектах 9P-L1 и ME361 (в данном случае – положительным контролем) может показаться достаточно большой. Тем не менее, все эти вопросы носят лишь уточняющий характер и никак не отражаются на положительном восприятии работы в целом и на уверенности в адекватности результатов и правильности выводов.

К оформлению автореферата замечаний почти нет, кроме мелких недочётов (например, не самая удачная практика переноса подписей к рисункам с одной страницы на другую – что в совокупности с однотипностью шрифта в этих подписях и в основном тексте иногда может вызывать неудобство; слова «вторичные антитела anti-His» в подписи к Рис.7, которые, по-видимому, являются ошибкой; не очень удачное расположение подписей молекулярных весов маркёров на этом же рисунке; отсутствие подписи оси абсцисс и слишком похожие друг на друга типы маркёра на Рис. 9В, делающие его трудночитаемым; не совсем понятно, каким образом с помощью Белок-А-сефарозы чистили Fv-фрагменты, узнающие GD2 (Раздел 3.2); есть небольшие замечания по пунктуации) – однако эти незначительные недостатки с лихвой компенсируются высоким качеством автореферата в целом, а все предложения носят рекомендательный характер и не умаляют ценности работы диссертанта.

Далее идет положительный отзыв о работе, что работа соответствует, что автор ее заслуживает присвоения степени кандидата биологических наук, по специальности «молекулярная биология», подписано: старший научный сотрудник НИИ Физ.-хим. биологии им. Белозерского МГУ имени Ломоносова, кандидат биологических наук Дмитриев.

И.И. Доронин:

Во-первых, спасибо большое Сергею Евгеньевичу, за то, что он внимательно прочитал всю работу. Я конечно согласен с замечаниями по оформлению и форматированию, что касается вопросов: по поводу вывода об общем свойстве антител для GD2 позитивных линий, там было не три все-таки, а двадцать, я это уже объяснял. Помимо этого, мы действительно ставили контроли с другими антителами, GD2-неспецифичными, и этих эффектов обнаружено не было. Единственное, мы не стали включать эти данные в работу, чтобы не увеличивать ее объем. Что касается иммуноферментного анализа, там вероятно, следовало чуть подробнее объяснить цифры, потому как в принципе они нормальные, включая контроли. Сергей Евгеньевич указал, что разницы особой, необходимости особой не было. Спасибо.

В.Т. Иванов:

Спасибо. Официальные оппоненты. Профессор Сащенко Лидия Павловна, институт биологии гена.

Л.П. Сащенко:

(Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается):

Глубокоуважаемый Вадим Тихонович! Глубокоуважаемые члены ученого совета, глубокоуважаемые коллеги! Я с удовольствием ознакомилась, прочитала эту работу Доронина Игоря Игоревича, и она вызвала у меня интерес. Я довольно долгое время работала над изучением механизмов клеточной гибели, изучая цитотоксические процессы, индуцированные в клетке. Я изучаю рецепторы, которые индуцируют эти процессы. Я как-то привыкла думать, что все танцует вокруг белков. Цитотоксический лиганд - белок, рецептор – белок, ферменты, которые там активируются в клетке, тоже белки. Все, все выполняет белок... И вот мне попадает работа, где в роли рецептора (ну так нельзя сказать!), в роли рецептора выступает ганглиозид. Интересно! Причем он участвует в передаче по всей вероятности, в качестве цитотоксического сигнала внутри клетки, без наличия специального внутриклеточного домена. Это очень интересно! Не меньший интерес представляют и антитела, которые обладают прямой цитотоксической активностью. Я с антителами мало работала, сталкивалась только, для того, чтобы выявить антиген, нужный мне. Но со времен далекой молодости я усвоила, что Fab-фрагмент антитела узнает то, что нужно увидеть, Fc-фрагмент организует это убийство с помощью дополнительных молекул, в частности, белков комплемента. Здесь я вижу абсолютно прямое цитотоксическое действие, антитело добавляется к клетке и клетка может погибнуть. Абсолютно прямое и довольно

интересное свойство антител. Это третья группа таких антител с таким свойством, с которой я сталкиваюсь. Одно – это АРА-I, которое взаимодействует с FAS рецептором, классический пример, вторая – это аутоиммунные антитела, изучаемые в лаборатории Александра Габировича Габирова, я даже с ними немножко когда-то работала, а вот здесь я впервые увидела с таким же свойством третью группу, которая связывается с совершенно другими рецепторами. В принципе, в теоретическом плане это очень интересные антитела, для изучения механизмов их действия просто необъятный простор. Совершенно очевидно, что это антитело убивает клетки, что оно может бороться с опухолью. Практическая значимость, она просто лежит на поверхности. Поэтому актуальность этой темы, проблемы, она не вызывает ни у кого никаких сомнений. Здесь возникает вопрос – если прямым действием обладает это антитело, не привлекая дополнительных молекул, тогда зачем Fc-фрагмент? Если лечить, то лучше, чтобы Fc-фрагмент отсутствовал. Потому что он и пертурбации в организме вызывает некоторые. Чем меньше молекула, тем легче будет лечение, это очевидно, поэтому может быть от него избавиться и спокойно все разрулится, Fab-фрагмент начинает лечить и все. Вот и вопрос: с опухолевой клеткой он будет связываться, это очевидно, но важно, что не каждое связывание с клеткой приводит к выполнению цитотоксической функции. Мы знаем много антител, которые прекрасно связываются и убивают клетки, у нас в лаборатории есть белок, который может специфически связываться со специфичным рецептором, не вызывая цитотоксического действия. Поэтому, прежде чем освобождаться от Fc-фрагмента нужно проводить исследования. Что и явилось целью данной работы. Теперь, утвердив актуальность темы, я быстренько, не ставя своей задачей и целью пересказать диссертацию, пробежусь по структуре и содержанию работы. Работа построена по старому традиционному принципу, состоит из введения, которое, кстати, очень хорошо написано, лаконично, четко. Я человек немножко из другой области, вот просто из введения суть проблемы была понятна. И это очень хорошо. Далее идет литературный обзор, который обобщает все известные подходы к лечению опухолевых заболеваний, опухолей, экспрессирующих GD2, в том числе антителами против этих ганглиозидов. Это соответствует содержанию диссертации, несколько страниц посвящено механизмам действия этих антител, причем, несколько страниц не потому, что ленился диссертант, а потому что просто получается так, что довольно мало известно о механизмах действия этих антител. На мой взгляд, литературный обзор слишком обширный, потому что 70 страниц на 155 страниц диссертации. Это почти половина. Можно было короче. Далее идет глава “Материалы и методы”, где довольно подробно автор описывает все методики, и, прочитав их, можно их просто воспроизвести, не прибегая к литературе. Однако, в некоторых случаях, автор начинает немножко сокращать на материале диссертации, расширив литературный обзор, он совершенно позволяет ссылаться на литературные источники, что не очень приветствуется. Глава наиболее интересная – Результаты и обсуждение – состоит из нескольких логически связанных между собой частей. Автор начинает с того, что (я разберу это Вам с какой-то степенью характеристики его системы, с которой он будет работать), он выбирает клетки, проверяет как они работают, на двух антителах. При этом здесь подчеркивается в какой-то степени универсальность того явления, которое он исследует. Потому что как говорит диссертант, *in vitro* исследований очень мало с этими антителами и они проведены на одной клеточной линии. Автор приводит перед нами результаты, что на шести линиях и говорит, что он вообще-то и двадцать линий

посмотрел. Эти шесть линий видно совершенно, все видно. Если нет ганглиозида на **поверхности**, исследуемые антитела не связываются, если есть – связались, связались **и значит** - убили. Все! Все совершенно четко и понятно. Теперь об основной цели **работы** – получении fab-фрагментов. Первый подход, он сейчас как бы выставлен на **конец**, а я следую ходу диссертации. Первый подход состоял в получении рекомбинантного фрагмента на основе известного уже антитела, была довольно сложная экспрессия, чувствуется, что плохой фолдинг, что все сделано хорошо и замечательно, но мало материала. Ему хватило только доказать, что материал связывается, и его можно использовать в дальнейшем. Сам автор пишет, что надо набирать больше, что у него еще предстоит работа *in vivo*. Ему нужно много достаточно этого вещества. Поэтому можно было бы два пути здесь. Продолжать биться этими методами, выцарапывать еще и еще. Тем более, что оправдал себя – этот подход. А можно предложить другой подход. Что автор и сделал. Он предлагает энзиматическое расщепление с получением fab-фрагментов с помощью фермента, имеет право. У него есть коммерческая гибридома, но он хочет свою собственную. Он с этого начинает. Это большое достоинство этой работы. Он получил новое антитело, которое тоже связывается с опухолевыми клетками, несущими ганглиозиды на поверхности. Это очень интересно, потому что он расширил спектр этих антител, в лаборатории появилось собственное антитело, которое можно использовать в разных направлениях, прекрасно будет работать. Недостатком, с моей точки зрения, является отсутствие количественных характеристик. Как можно сравнить, чтобы было можно сравнить это антитело с антителами, уже известными, полученными в других лабораториях. Он показывает высокую специфичность, все таки существуют перекресты. Здесь он очень хорошо эти данные представил в докладе, но в диссертации – таблица, на которую смотришь не без улыбки. Там никаких процентов клеток нет. Хотя он меряет, на проточном цитофлуориметре, который выдает цифры. Он просто написал - «сильно», «средне», «слабо». Как хочешь можно реагировать. Дальше он начинает получать фрагменты, как из полученного антитела, так и из коммерческого антитела. Вот здесь гибридома коммерческая, которая у него появилась и антитело, которое продуцирует эта гибридома. И это очень хорошо, потому что получается два подтверждения, что fab-фрагменты двух антител могут связываться и убивать. Плюс можно какое-то провести сравнение. Но если бы он сделал количественную оценку. Количественная оценка опять отсутствует. Но тем не менее, факт налицо. первая часть задачи, поставленной в диссертации выполнена, *in vitro* он показывает, что fab-фрагменты антител связываются с ганглиозидами на поверхности опухолевых клеток и сразу же убивают эти клетки. Далее он пытается исследовать механизм, сравнить механизм действия на клетки полноразмерных антител и его фрагментов. Это очень интересная, конечно, тема. Должна быть, конечно, темой отдельной целой диссертации, отдельной работы совершенно. Большая работа и здесь. Здесь практически таких тонких механизмов и нет. Здесь классическая оценка типа смерти клетки. Апоптоз и некроз. На основании его данных можно прийти к выводу, что похоже, что они действуют практически одинаково. Но в короткие временные процессы они здесь больше, полноразмерное антитело больше по некрозу работает. Вот уже то, что через 24 часа процессы, которые развиваются там – апоптоз – и там, и там. Под действием fab-фрагментов, активируются в большей степени, в значительно большей степени каспазозависимый апоптоз. Ну все доказано, аргументировано. У меня замечания к этой части работы – вялое обсуждение, просто

невое. другого не скажешь. Просто обсуждение - описание графика и никаких мыслей. Мне совершенно не понятно, чем аргументирует автор времена, в которых происходят процессы, которые он исследует. Временная зависимость жизнеспособности клеток под действием антитела и его фрагментов не показана. Почему выбраны 4, 24? Почему жизнеспособность смотрят через именно это время? Я думаю, что здесь есть какие-то причины все-таки, это должно быть описано. Далее, мне очень режет ухо, когда я слышу слова некроз в отношении клеток, которые умирают через 24 часа. Значит, апоптоз и некроз – это разделение – прошлый век, так говорили. Сейчас мы точно знаем, что существует некроз программируемый. И он отличается от классического. Если мы говорим некроз и не дай Бог, думаем, классический, тот до 24 часов эти клетки не доживут. Некроз через 24 часа, это клеток там нет. А молодой человек собирает клеточки, несет их на проточник, обнаруживает в них дырочки. Это значит, что дырочек немного, клетка еще сохранила свою форму, скорее всего они произошли от процессов, происходящих изнутри. И это – программирование. Я не настаиваю на том, что он на каждой этой самой странице, он довольно много посвящает места описаниям. Он должен писать, что это программируемый некроз. Но вначале, когда он начинает это все, он одним абзацем обязан определиться, чтобы люди понимали, что это не классический некроз. Очень опять же интересно, он получает одновременно через 24 часа, у него число некротических клеток, и некротические процессы зарегистрированы и апоптотические. Вот как собственно? Вот что это? Часть клетки умерла по некрозу, часть клетки ушла в апоптоз? Как в клетке активировались одновременно оба процесса? Как автор это представляет? Где обсуждение? Потому что я встречала еще пока, что некроз и апоптоз в клетке – одновременно. Или апоптоз, или некроз. Считается, что это альтернативные процессы. Даже, если они индуцируются от одного рецептора. Поэтому хотелось бы, видеть, слышать это обсуждение, а не просто смотреть и видеть картинку. Вот это недостаток. Ну далее, следующий этап, это уже подготовка к лечению, к опытам *in vivo*, автор сделал химическую точечную модификацию, я не буду на этом останавливаться, он показал, что модификация никак не влияет на свойства fab-фрагмента, он и связывается, и убивает, он это уже использует на мышинной модели, показывает, что не даром, что это пегилирование ему помогло, что лучше модифицированные фрагменты работают, что работают как антитело, так и фрагмент, исчезают самые главные метастазы в печени. Правда, немножко осталось в почках, но я думаю, что если поиграть на концентрации, то исчезнет и это. Вторая часть, вторая задача, поставленная автором тоже была решена. Значит, далее идут выводы, вытекающие из экспериментальных всех данных полностью. Экспериментальные данные у оппонента никаких сомнений не вызывают. Поэтому все нормально, недостатков работа не лишена. Я вот уже остановилась на двух. Но в принципе эти недостатки суть работы не меняют, не снимают ее общие достоинства. Ну придирки, вот могу привести, меня очень раздражает, что он начинает энзиматическое расщепление антитела, полученного им и пишет очень красивую фразу «специфически в трех точках произошло точечное специфическое расщепление при действии пепсина». Человек думает - как самый неспецифический фермент специфически расщепил в трех точках? Действительно? Я специально полезла в материалы и методы посмотреть и тут то он как раз ссылается на источник, я не смогла прочитать. Но понятно, что существует этот метод модификации, но это надо написать. Вот у него – где-то написано много, где-то не написано вообще... Вот это его основной такой недостаток. Еще раз

повторяю, что общие достоинства этой работы это все не снижает, что новизна работы состоит в получении нового антитела, в доказательстве того, что fab-фрагменты работают, как *in vitro*, так и *in vivo*, что расширяет представление о них и о механизмах иммунной защиты, это совершенно очевидно может использоваться, как иммунотерапия. Поэтому я с большим удовольствием прочитаю эту фразу, которую я и обязана зачитать – «Диссертационная работа Доронина И.И. – Противоопухолевые эффекты модифицированных фрагментов GD2-специфичных антител – является научной квалифицированной работой, имеющей существенное значение для развития элементов терапии GD2-положительных позитивных онкологических заболеваний. Таким образом, диссертационная работа соответствует всем критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013, номер 842. А сам автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 «Молекулярная биология». Благодарю за внимание.

В.Т. Иванов:

Спасибо, Лидия Павловна! На очереди – диссертант, ответить на замечания Лидии Павловны, прошу.

И.И. Доронин:

В первую очередь огромное спасибо за то, что уделили время и смогли очень внимательно ознакомиться с моей работой. Что касается Ваших замечаний – по большей их части, я, разумеется, согласен. А что касается ссылок на литературные источники в материалах и методах, да, здесь, я в общем руководствовался тем, что мне хотелось немножко подсократить. Само описание, как мы уже говорили, более подробное описание изложено в статьях, в общем, я давал ссылку, я учту замечания, спасибо. Что касается констант, как я уже говорил, разумеется, эта работа у нас запланирована и будем этим заниматься. Что касается кросс-реактивности и таблицы один, где было указано сильно, слабо, средне. Ну, в первую очередь представление такой таблицы было обусловлено тем, что нам было необходимо показать именно кросс-реактивность и основной целью было сравнение GD2\GD3, соответственно там плюс-минус присутствие ганглиозидов на клетках. И конкретно давать значения о средней интенсивности флуоресценции без значений всех контролей не корректно. Либо давать гистограммы, это очень много места заняло бы, поэтому в целях оптимизации была представлена эта таблица, при этом следует отметить, что в принципе, в литературе подобное представление данных, именно с точки зрения кросс-реактивности встречается, и мы считаем, что это вполне допустимо. Что касается самого механизма, да, в общем, действительно, это отдельный и очень сложный вопрос, тема, которой у нас в лаборатории занимаемся, работа в этом направлении идет. Точное установление механизмов не являлось задачей данной диссертационной работы, поэтому установление механизмов носило своего рода описательный характер. Тем не менее, были описаны те эффекты, которые и были обнаружены, поэтому, что касается непосредственно механизмов, мы указывали в работе, что клеточная гибель происходит по неклассическому пути, поэтому, конкретного упоминания терминов, что это вот некроз, а вот это апоптоз, мы все-таки не делали. Возможно, что это следовало сформулировать как-то более четко. Что

~~качества~~ выбора времени, временных особенностей, мы ставили разные времена инкубации и в работу включали те, которые были наиболее показательны, т.е. на коротких промежутках, там через четыре часа – эффекты были наиболее видны, включая разницу между антителами и их Fab-фрагментами. Соответственно, да, классическим некрозом, смерть через 24 часа мы не называли. Тем не менее работу в лаборатории мы продолжим и с механизмами рано или поздно мы разберемся. Энзиматическое получение, там просто методика, которая позволила специфически получать определенные фрагменты. Спасибо!

В.Т. Иванов:

Спасибо. Теперь двигаемся по процедуре. Удовлетворена ли Лидия Павловна?

Л.П. Сащенко:

Молодой человек все мне объяснил.

В.Т. Иванов:

Ну понимаете, если все-таки что-то не то, у нас будет дискуссия еще. Алексей Юрьевич Лупатов, НИИ биомедицинской химии имени Ореховича.

А.Ю. Лупатов:

(Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается):

Здравствуйтесь уважаемые коллеги! Мне более трудно выступать, чем предыдущим товарищам. Так почти все замечания или возражения, которые я отметил в диссертации, уже всплывали в процессе дискуссии или оппонирования. Однако, я буду честно исполнять свои обязанности. Так, по поводу актуальности, думаю, что никто из здесь присутствующих не сомневается в актуальности работы, поскольку создание противоопухолевых препаратов, тем более еще и не обладающих токсической активностью, конечно, проблема актуальная. Хочу только обратить Ваше внимание на то, что традиционно люди, занимающиеся тонкой иммунологией, противоопухолевым иммунитетом, всегда отдавали приоритеты и считали, что самое главное – это клеточный иммунный ответ. А сдвиг иммунного ответа в гуморальном направлении считали неблагоприятным фактором. Более того, считалось также, что противоопухолевые антитела больше вреда наносят, чем пользы приносят, поскольку они способны маскировать эпитоп, необходимый для распознавания эффектором клеточного иммунитета. Как обычно в таких ситуациях и бывает, в итоге клеточная иммунология, люди, создающие исследования, или создающие какие-то продукты на основе клеточного иммунитета до сих пор пытаются доказать эффективность дендритно-клеточных вакцин или схем адаптивного переноса в клинических исследованиях, а антитела оказались уже коммерческим продуктом, одобренным, имеющим и эффективность и несомненно полезным для практики. Более того, оказалось, что использование антител совершенно необязательно должно быть частью пассивной иммунотерапии. Появилась так называемая таргетная терапия, которая по сути иммунотерапией и не является. Не важно совершенно, что связывает какую-то мишень, тетрамер, или химически синтезированное вещество, или антитело, но в

результате этого связывания клетка погибает. Т.е. либо активируются какие-то каскады, приводящие к смерти, либо просто этот продукт, с которым связывается антитело, жизненно необходим для клетки. Единственно какие проблемы нужно решить, чтобы такое антитело превратилось в препарат, это собственно, решить три проблемы: нужно найти мишень, чтобы она была адекватной. Нужно, чтобы антитело или продукт, созданный на его основе существовал в организме достаточно долго, и третье, что необходимо - не должно быть каких-то иммунологических реакций на этот продукт. Собственно, решению этой проблемы диссертация и посвящена. Проблема на самом деле очень серьезная и очень амбициозная, я не хочу интригу создавать, поэтому я сразу скажу, что диссертация мне понравилась. Мне она очень понравилась. И я думаю, что эта диссертация существенно превышает средний уровень диссертаций, подаваемых на защиту, по крайней мере по сравнению с теми, с которыми я сталкивался, потому что я здесь в совете никогда не присутствовал. Буду отрабатывать свой хлеб и искать недостатки, поскольку это моя основная обязанность. Начну с того, на что обычно вообще внимания никто не обращает - с оглавления. Пронумеровано оно несколько странно: названия глав обозначаются одной цифрой, названия подглав обозначаются тремя цифрами и во всех подглавах между ними стоит единица. Какой смысл в этой единице, или, может, сакральный какой-то смысл, я не знаю, но все подглавы в середине обозначаются единицей. Но это думаю, не самый страшный недостаток. Введение, я согласен совершенно с Лидией Павловной, что введение написано очень хорошо. Здесь мне очень введение понравилось. Все по сути, цель кратко сформулирована. Задачи тоже четки и понятны. Единственно, на что я хотел обратить ваше внимание, это - есть тут такой подраздел, основные положения, выносимые на защиту. Я не знаю, он обязательный или нет, но возможно, он не обязательный, но первое положение, выносимое на защиту меня навело на философские размышления. Звучит оно так - свойство GD2 специфических антител и их фрагментов, индуцировать клеточную гибель является общей особенностью GD2 позитивных опухолевых клеток. Как свойства антител могут быть свойствами клеток, которые их при этом не синтезируют и по большому счету к ним никакого отношения не имеют? Я вот об этом до сих пор думаю, может такое быть или нет? Больше никаких вопросов у меня по этой части диссертации нет. Обзор литературы, он действительно очень большой, но он насыщенный и везде все по делу. Более того, я в отличие от отзыва ведущей организации, подготовленного, как оказалось, моим научным руководителем по кандидатской диссертации, профессором Егоровым, я не нашел здесь проблем с русским языком. Но это мы потом, когда с ним встретимся, обсудим. С моей точки зрения обзор литературы написан очень хорошим русским языком, что важно здесь много иллюстраций, чего обычно никто не делает именно в обзоре. После прочтения обзора у меня как-то не возникло понимания, а как же все-таки антитела без комплемента и клеточно-ассоциированной цитотоксичности, убивают ганглиозид-позитивные клетки? У меня такого понимания честно говоря не было, я решил это сделать, как замечание, еще раз обратился к обзору и понял, что я просто невнимательно читаю, после этого попытки найти что-либо в этом обзоре, что можно было бы поругать и покритиковать, я прекратил. Дальше, следующая часть это результаты и обсуждение - я не сторонник объединения результатов и обсуждения. Я тут тоже с Лидией Павловной полностью согласен, что обсуждения практически нет, оно очень вялое. Правда, я хочу отметить, что в конце каждой подглавы есть как минимум один абзац, где вся информация как бы подводится, но нет совершенно

обсуждения в контексте мировой литературы. Не пишется о том, какое место занимают результаты в контексте результатов, полученных другими. Тем не менее, работа, именно экспериментальная работа, выполнена и она большая, если не сказать она огромная. То есть я думаю, что она если не на две, то на полторы диссертации она точно уж потянула бы, выполнено все довольно квалифицированно, эксперименты построены грамотно, вопросы по сути работы у меня возникали те, которые возникли уже в процессе обсуждения и оппонирования. Прежде всего, первый вопрос, который я отразил в письменной форме своего доклада, а где константа? То есть везде я вижу оптическую плотность с иммуноферментного анализа, ОД, ОД, ОД и это связывает побольше, это связывает поменьше, а где константа? Я тоже хотел предложить, может быть у нас в институте есть плазмонный резонанс, может быть, захотите в гости? Это может быть проблемой, поскольку, Вы бы отразили все дискуссии, и оппонента другого тоже бы отразили... Второй вопрос, который у меня возник, ну я не прошу ответа на этот вопрос, потому что его уже так много обсуждали, что я не жду от диссертанта ответов. Второй вопрос у меня был по поводу тестов *in vitro*. Дело в том, что в диссертации там были еще включены данные, которые не были представлены на экране, об измерении веса опухолей после введения и мне показалось это не совсем адекватным. Но я вижу, что в этом направлении диссертант и его руководитель, видимо тоже вне зависимости от меня, это как-то осознали и изменили всё в правильном ключе. Поэтому, соответственно, таких глобальных таких вопросов по работе у меня больше и нет. Есть небольшие замечания по оформлению, допустим, некоторых рисунков. Обычно пишут, когда эти рисунки подписывают, что это блот-анализ того-то, обычно пишут, что экспрессия белка такого-то, подписывают их как некий эффект, который на этом рисунке рассматривают. А в диссертации используют и такой и такой вариант. Иногда пишут иммуноферментный анализ чего-то, иногда пишется сама суть. По поводу заключения, тоже я также обратил внимание и в письменной форме своей рецензии, то, что заключение, собственно, это только выводы. Хотелось бы все-таки услышать от диссертанта... Т.е. очень большая работа и такое ощущение, что на заключение уже не осталось сил. Выводы написаны хорошо, все соответствует действительности. Выводы, как и должны соответствовать задачам поставленным, но здесь нету никаких ни перспектив использования, мнения автора на эту тему. Ну и в завершение, я, конечно, хочу сказать, что работа на самом деле очень хорошая, несомненно она соответствует всем требованиям, предъявляемым к защищаемым кандидатским диссертациям, сам диссертант конечно заслуживает присвоения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности «молекулярная биология», эта работа с молекулярной биологией связана явно. Спасибо за внимание!

В.Т. Иванов:

Ну, Доронин Игорь Игоревич хочет сказать несколько слов в ответ на замечания? Я бы согласился просто и все.

И.И. Доронин:

Большое спасибо! Согласен во многом по оформлению, оглавлению и всему прочему, относительно константы. Единственное замечание, касательно мировой литературы, дело в том, что мировой литературы по антителам и механизмам

попросту нет, сравнивать особо тут не с чем. Что касается заключения и перспектив, я уже говорил - разумеется, мы будем работать в направлении получения противоопухолевого препарата. Ну да, константа – да, сложный антиген, будем измерять, но пока что цифры нет, но будет. Наверное, все, спасибо.

В.Т. Иванов:

Спасибо. Далее у нас – общая дискуссия.

С.М. Деев:

Дорогие коллеги, мы работаем довольно долго по этой диссертации, но я думаю, что все согласятся со мной, я получил очень большое удовольствие от доклада, от дискуссии, мы присутствуем сегодня на настоящем научном собрании. Вот я думаю, что в девятнадцатом веке, когда люди не так торопились, они много чего обсуждали и просто с интересом и именно вот это сегодня было. Вот мы прослушали работу, работа очень большая, антитела моноклональные, ганглиозиды в особенности, известные с послевоенного периода, однако эта работа очень современная. Все современные тенденции, которые используются, в инженерии антител и в таргетной терапии, они здесь так или иначе прозвучали. Человек, который получил гибридому свою, пошел к мини-антителам, они быстро выводятся из организма, начал их пегилировать и так далее, и так далее...очень хорошая работа, я считаю по демонстрации эффектов, это редко бывает, чтобы работа была цельная, диссертационная работа это именно цельная работа, мы видим работу от объекта исследования до клеточных линий и экспериментов *in vivo*. Было много вопросов, мы слышали вопросы такие - болевые точки, мы слышали очень квалифицированные ответы на эти вопросы, мне очень нравится, когда диссертант не оправдывается, не замечает мусор под ковер, а говорит, да, будем работать дальше. На мой взгляд, это такое хорошее научное событие, это работа безусловно заслуживает самой высокой оценки и присвоения степени. Давайте все голосовать в поддержку этой работы. Спасибо.

В.Т. Иванов:

Спасибо. Николай Владимирович, прошу.

Н.В. Бовин:

Мое выступление будет более критическим, начну с того, что я согласен, что диссертация очень хорошая, что все сделано замечательно, что она заслуживает присвоения искомой степени, но я считаю, что качество научной работы оценивается не только тем, что в ней сделано, но и тем, что в ней не сделано. И в этой работе я вижу довольно значительную дыру, о которой я не могу здесь не сказать. Дело в том, что когда, характеризуются антитела, тем более моноклональные, обязательно надо знать их специфичный эпитоп, желательна тонкая специфичность. Иначе можно не понять тех механизмов, по которым эти антитела работают с клеткой. Мне кажется, что здесь мы видим именно тот самый случай. Почему эти антитела взаимодействуют с клеткой так, что Fab-фрагмент взаимодействует так, что это приводит к гибели

клетки. Наверное, они связываются не просто с ганглиозидами, наверное, там есть какая то особенность этого взаимодействия, я могу что-то даже сказать, предсказать, предугадать, что там происходит... Небольшую сессию я позволю на несколько минут? Я участвовал в нескольких воркшопах по моноклональным антителам. По своему направлению, по моноклональным антителам. Как это устроено? Получают моноклональные антитела, причем к одному и тому же антигену, в разных лабораториях, рассылают по всему миру, это могут быть десятки и даже сотни лабораторий, потом этой информацией обмениваются и далее информация систематизируется и анализируется, что получилось. Вот что получается. Скажем, антиген является кластером дифференцировки, общепризнанный антиген, к нему огромный интерес, огромное количество людей им интересуются, вот к этому CD получено несколько моноклональных антител, свойства этих антител разные, они все связываются тоже с этим антигеном примерно с одинаковой константой связывания. Ну а эпитопная специфичность, соответственно способность узнавать этот антиген на тех или иных клетках, у этих антител может быть и похожей, но может быть и совершенно разной. Могу привести такой пример, что антитела к тетрасахариду Сиалил Льюис X. Лучше я начну с селективных, скажем, он узнает 10 тыс. таких рецепторов на одной клетке. Берут моноклональные антитела против того же тетрасахарида и они узнают примерно те же 10 тысяч рецепторов. Берут второе антитело, к тому же самому и оно узнает в 10 раз меньше рецепторов. Почему? А почему – более или менее понятно, потому что контекст этого антигена на поверхности клетки совершенно может быть другой. И на поверхности клетки нет 10 тыс одинаковых Сиалил Льюис X. Так же, как и какого либо ганглиозида. Может быть 10 тысяч одного сорта, 10 тысяч другого, несмотря на одну и ту же химическую структуру. Т.е. природа – не органический химик, природа оперирует в категориях атомов и молекулярных паттернов, а не молекул, которые берут органические химики. Т.е. антитело может узнавать действительно ганглиозид. Целевой ганглиозид этой диссертации. На самом деле оно узнает не этот ганглиозид, а фрагмент молекулы, антитело узнает молекулярный паттерн, в состав которого входит ганглиозид, два ганглиозида, или два одинаковых, или два разных, или кусок этого ганглиозида и кусок другого гликофинголипида, или кусок соседнего белка. Мембрана организована не беспорядочно, как мы теперь хорошо знаем. Она имеет псевдокристаллическую структуру. Это жесткая структура. Поэтому мы обязаны точно знать, с чем это антитело взаимодействует. По-видимому, это антитело взаимодействует с молекулярным паттерном, связывается с ним и это связывание само по себе приводит к тому, что нарушается организация мембраны в этом участке. И этого достаточно, чтобы целью диссертации Игоря Игоревича были клетки. Т.е. я возвращаюсь к тому, с чего все-таки начал – чрезвычайно важно знать тонкую эпитопную специфичность антител, этого сделано не было. И я выражаю сожаление, потому что это можно было сделать. Возникает у меня ощущение, что группа, которая работала над этой проблемой живет на необитаемом острове. Она не знает, что в институте биоорганической химии есть лаборатория липидов, которая может методически и во многом другом легко и без особых усилий помочь сделать дополнительные исследования по этому направлению. Есть лаборатория углеводов, которая может тоже легко, без особых усилий и с большим удовольствием сделать работу по характеристике эпитопной специфичности, а методов и возможностей в этих стенах – это не только эти две лаборатории. Вот, я повторяю, что диссертация

замечательная, диссертация хороша. Но желаю, чтобы у нас в институте не жили на необитаемых островах.

В.Т. Иванов:

Спасибо. Кто хотел бы продолжить дискуссию? Выступать может кто угодно, диссертант, не видно что-то руководителя, а так – и оппоненты и кто угодно может выступать. Или достаточно? У меня ощущение, что аргументы собраны, а... нет, есть желающие.

А. Ю. Лупатов:

Когда сравниваете антитела, полноразмерные антитела и фрагменты делается вывод о том, что антитела полноразмерные вызывают некроз, а fab-фрагменты – апоптоз. А почему, а как Вы думаете, мне действительно это интересно, почему антитела, без комплемента, и когда нету клеток, которые могут Fc-фрагменты распознать, почему они вызывают именно некроз? Мне просто действительно это интересно! Какое есть объяснение? Почему?

И.И. Доронин:

Что касается в частности, фрагментов, паттернов и прочего, то если рассматривать сам механизм – то, во-первых, конкретно, не вот эти антитела, которые я получил в ходе данной работы, а на других меченых антителах мы проводили исследования по связыванию с белками, которые на мембране каким-то образом ассоциированы с ганглиозидами, пока что закономерностей особых не нашли, но ищем... и это отчасти может быть связано вот с этим механизмом. Потому что действительно, очень интересно, что происходит конкретно на начальных стадиях изучаемого процесса, и если сравнивать fab-фрагменты и антитело, то антитело бивалентно, fab-фрагмент – моновалентен. Возможно, что какое-то стягивание ганглиозидов, или молекул вокруг, как раз и определяет разницу в наблюдаемых эффектах. А на коротком промежутке времени плюс, если, например, брать другой ганглиозид GD3, то там показано, что GD3 интернализуется внутрь, там довольно сложный механизм, его долго объяснять, но дальше в данном случае происходит взаимодействие с митохондриями, может быть с fab-фрагментом происходит что-то подобное. Опять-таки повторяюсь что это тема отдельной работы, которая ведется в нашей лаборатории. На этом все.

В.Т. Иванов:

Спасибо. Ну кто еще хотел бы подискутировать? У меня такое ощущение, что многое из того, что мы сейчас слышали, - это надо было бы сделать, тут надо было бы сделать...специфичности и количественную оценку. Когда работа вызывает желание еще что-то сделать, это скорее – ее достоинство, чем недостаток. Это я считаю работа, в итоге которой рождается пожелание сделать одно, второе, третье, четвертое, это хорошо, это ее достоинство. И я буду голосовать за. Кто еще хотел бы выступить? Не вижу больше желающих, тогда Вам – заключительное слово.

И.И. Доронин:

В первую очередь, конечно, хотелось бы поблагодарить уважаемых оппонентов, которые уделили время, прочитали, обсудили эту работу. Конечно – членов Диссертационного Совета, которые также внимательно с ней ознакомились. Спасибо за интересные вопросы всем присутствующим. Разумеется, я бы хотел выразить благодарность всему коллективу нашей группы, нашей лаборатории, конечно, научному руководителю, Холоденко Роману Васильевичу, который помогал мне на всех этапах работы так, что я загорелся этой идеей, все действительно интересно и увлекательно. Думаю, что и дальше все будет очень интересно. Помимо этого, я, конечно, благодарен и руководителю нашей группы – Ирине Михайловне за ценные советы и помощь на всех этапах работы. Что касается каких-то конкретных моментов, я благодарен сотрудникам нашего института, Илье Ильичу Михалёву из лаборатории липидов, он помогает нам с ганглиозидами высокой степени очистки, Рязанцев Дмитрий Юрьевич, помогал с подбором условий для наращивания продуцентов, хотел бы поблагодарить Полину Вишнякову, которая помогала со многими моментами по ходу работы. Хотелось бы выразить также благодарность руководству института, за созданные благоприятные условия работы. Спасибо!

В.Т. Иванов:

Спасибо. По поводу заключения, у кого-нибудь есть какие-то замечания?

В.В. Безуглов:

У меня есть. Мне кажется, что та, часть, которая содержит замечания оппонентов, она слишком короткая в этом заключении, по сравнению с тем, что мы видели по первой диссертации. Хотелось бы подробнее. Мы в выступлениях слышали много замечаний, но здесь просто два-три слова написано, предлагаю в рабочем порядке все-таки те замечания, которые прозвучали, включить в наше заключение, именно с тем, чтобы потом в ответах, у диссертанта в протоколе они были бы отражены.

В.Т. Иванов:

В рабочем порядке, в принципе, за сам каркас можно голосовать, при условии, что в рабочем порядке будут внесены некие дополнения. Юлиан Георгиевич?

Ю.Г. Молотковский:

Третий абзац – внизу – следует написать так – к оформлению автореферата, к автореферату замечаний нет, кроме указания на мелкие недочеты. Это просто стилистика.

В.Т. Иванов:

Написано коряво, согласен. Но смысл остается в том, что Вы сказали. Учтем. Еще есть замечания – прошу!

Д.А. Долгих:

У меня не замечание, а вопрос просто. Я обратил внимание, обычно всегда – окончил аспирантуру, а вот здесь интересно – соискатель окончил аспирантуру по программе подготовки научно-педагогических кадров в 2014 году, на первой странице. Вот эти десять лишних слов, они вообще какой-то смысл имеют? Так теперь положено писать?

В.Т. Иванов:

Это шаблон.

В.Т. Иванов:

Ну что – готовы голосовать?

(Проходит голосование и подсчёт голосов)

В.Т. Иванов:

Такое впечатление, что подсчет голосов завершен и нам готовы об этом доложить. Правильно я понял? Да, прошу рассаживаться.

В.А. Олейников:

Доронин Игорь Игоревич, присутствовало двадцать один человек из Диссертационного совета, роздано двадцать один бюллетень, оказалось в урне – двадцать один, за – проголосовали двадцать один, против – нет, недействительных – нет.

В.Т. Иванов:

Есть ли возражения против утверждения того, что мы слышали? Возражений нет! Принято, всем спасибо.

Председатель

диссертационного совета

академик РАН Иванов В.Т.

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

