

Отзыв

официального оппонента главного научного сотрудника ИИЦ РАН, д.б.н. Маргулиса Бориса Александровича на диссертацию Елисеева Игоря Евгеньевича на тему «Однодоменные антитела ламы для блокирования активации рецептора ErbB3: разработка, структурно-функциональные исследования, перспективы применения в иммунотерапии», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 - Биохимия

Актуальность проведенного исследования.

Иммунотерапия к настоящему времени стала одним из наиболее эффективных средств борьбы с патологиями самой разной природы, в том числе онкологическими заболеваниями, и признанием этого факта стало вручение Нобелевской премии 2018г за «открытие противораковой терапии методом подавления негативной иммунной регуляции». Суть подобных видов терапии состоит в блокировании важных для жизнеспособности и функции раковых клеток белков, инактивация которых осуществляется с помощью моноклональных антител. Ввиду своей высокой специфичности моноклональные антитела получают все более широкое распространение в мировой медицине, и к настоящему времени число одобренных препаратов на их основе достигает ста. Автор рецензируемой работы выбрал в качестве мишени белок ErbB3 (HER3), представитель семейства тирозин-киназных рецепторов EGFR и HER2, для нейтрализации которых антитела уже разработаны и применяются в клинике. При использовании указанных терапевтических препаратов отмечены случаи повышения устойчивости, и поэтому ErbB3 стал еще одной перспективной мишенью для онкологии. Актуальность и свежесть работе И.Е.Елисеева придает тот факт, что в отличие от конкурентов он создал однодоменные моноклональные антитела к ErbB3, которые высоко специфичны и обладают рядом преимуществ по сравнению с классическими IgG; создание антител и их характеристика стали целью диссертационной работы. Перед исследованиями были поставлены следующие задачи:

1. Изучить закономерности амплификации сложных ансамблей фрагментов ДНК при проведении обычной и эмульсионной полимеразной цепной реакции для совершенствования методов конструирования библиотек антител.
2. Разработать эффективную систему гетерологической экспрессии для получения растворимых однодоменных антител высокой степени очистки в нативной конформации.
3. Изучить структурные и биохимические характеристики однодоменных антител к внеклеточному домену рецептора ErbB3.
4. Изучить связывание однодоменных антител с рецептором ErbB3 и их функциональную активность на клеточных линиях рака молочной железы.

Научная новизна исследования, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, сформулированных в диссертации.

Основным результатом работы, проведенной Елисеевым И.Е., стало создание однодоменных антител к рецептору ErbB3, причем надо подчеркнуть, что подобные антитела созданы впервые. Важным фрагментом исследований стала характеристика самих антител и эпитопов на молекуле рецептора, которые узнаются антителами и находятся на внеклеточной части

молекулы. Результаты этой части работ, проделанных с применением высокоразрешающих физико-химических методов, позволят более детально судить о структуре взаимодействующих доменов антигена-антитела в динамике. Наиболее крупным достижением работы надо считать данные о подавлении ErbB3-зависимой пролиферации клеток рака молочной железы полученными антителами.

В ходе выполнения работ автором развиты технологии молекулярной иммунологии для отбора и синтеза однодоменных антител. Эти протоколы получения антител имеют практическое значение, так как могут быть использованы в других лабораториях.

Степень обоснованности научных положений, выводов рекомендаций, сформулированных в диссертации, личный вклад автора.

Автором вынесено на защиту 4 положения

1. Предложенная теоретическая модель точно описывает процесс амплификации сложных библиотек ДНК при проведении полимеразной цепной реакции, тем самым создавая теоретическую основу для совершенствования методов конструирования библиотек антител, сохраняющих их клональное разнообразие.

2. Гетерологическая экспрессия в цитоплазме бактерий *E. coli ΔtrxB Δgor cDsbC* в виде химерной конструкции с белком SUMO позволяет более эффективно по сравнению с классической системой периплазматической экспрессии получать однодоменные антитела.

3. Разработанные однодоменные антитела к рецептору ErbB3 обладают высокой термодинамической стабильностью и нативной структурой иммуноглобулинового домена; полученные кристаллические структуры высокого разрешения позволяют изучить конформации гипервариабельных участков и построить модель связывания с эктодоменом рецептора ErbB3.

4. Два разработанных однодоменных антитела неконкурентно связываются с эпитопами на субдоменах I и III эктодомена рецептора ErbB3 с наномолярной аффинностью и эффективно подавляют ErbB3-зависимую пролиферацию HER2⁻ и HER2⁺ клеток рака молочной железы как посредством прямой конкуренции с лигандом, так и без нее.

Эти положения были сформулированы на основании анализа и обобщения полученных автором новых фактов, которые отражены в выводах диссертации.

Основные результаты диссертации представлены в 5 статьях в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, изданиях, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Диссертант является соавтором одного патента на изобретение.

Результаты диссертации были представлены на различных всероссийских и международных конференциях.

Структура и содержание диссертации.

Диссертация Елисеева И.Е. состоит из введения, трех основных глав, заключения и выводов. Общий объем диссертации составляет 147 страниц, включая 31 рисунок и 11 таблиц. Список литературы содержит 261 источник.

Глава 1 (Обзор литературы) представлена на 39 страницах текста.

В литературном обзоре проведен подробный анализ структурных и функциональных характеристик рецепторов эпидермального фактора роста и рассмотрена их роль в развитии опухолевого процесса. Автор подчеркивает существенное значение ErbB3 для активации других членов семейства рецепторов и развития устойчивости к терапии с использованием ингибиторов рецепторов EGFR и HER2. Поэтому особый интерес, как терапевтическая мишень, представляет собой рецептор ErbB3, и в обзоре даны характеристики ингибиторов белка, основанных, в частности, на антителах к белку. Рассматривая литературные данные о структуре и функции молекулы ErbB3, автор нашел более эффективный путь подавления про-опухолевой активности белка, причем в качестве ингибитора вместо канонических иммуноглобулинов G он предлагает однодоменные антитела, генерированные в представителях верблюдовых. Описанию этой, относительно новой и перспективной технологии автор отводит значительную часть обзора, в которой я помимо особых свойств, рассмотрел бы их преимущества, в том числе экономические, перед обычными моноклональными антителами, полученными в грызунах и кроликах. Интересно, что в этом разделе автор пишет о методах получения гуманизированных, рекомбинантных и однодоменных антител в трансгенных мышах (С.48), но не комментирует этот факт, видимо считая, что метод, использованный им в работе все-таки более эффективен. В заключение полагаю, что раздел, посвященный характеристике однодоменных антител, после небольших модификаций может быть опубликован в виде отдельной статьи.

Глава 2 (Материалы и методы) представлена на 20 страницах. Несмотря на сравнительно небольшой объем, данный подраздел включил в себя описание большого количества методов, относящихся к технологии молекулярного клонирования, получению и очистке рекомбинантных белков и анализу физико-химических характеристик выделяемых полипептидов. Можно сказать, что в этой главе есть все, от тонкостей культивирования бактериальных клеток до деталей метода кристаллизации белков. Наиболее интересным мне показалось описание методов анализа взаимодействий антигена (внеклеточный фрагмент ErbB3) с двумя полученными антителами; в этой части работы автор применил все известные высокоразрешающие методы анализа вплоть до поверхностного плазмонного резонанса. Судя по тексту, можно сказать, что автор сам прочувствовал все методологические изыски технологий и, что особенно важно, не только занимался измерением характеристик полученных белков, но и рассчитывал и интерпретировал данные о структуре белковых комплексов. Наконец в конце главы приведены условия экспериментов по анализу эффектов однодоменных антител на клетки с аномальной или нормальной экспрессией рецепторов семейства Erb/HER. Автор для этой работы использует метаболический краситель MTS, который не окрашивает не только не делящиеся, но и мертвые клетки. По моему мнению такую окраску применять можно, но для полноценного определения ростовых характеристик клетки должны окрашиваться фактором, выявляющим гибнущие клетки и в оптимуме, клетки, демонстрирующие уход в апоптоз.

Глава 3 Результаты и их обсуждение.

Глава Результаты и обсуждение начинается с описания преимуществ авторской модели эмульсионной ПЦР. Как показали данные секвенирования библиотеки из 12000 фрагментов

ДНК, амплификация ее с помощью эмульсионной ПЦР привела к большему клональному разнообразию и поэтому вся дальнейшая работа по созданию библиотек проходила с помощью модифицированного автором метода ПЦР. Добиваясь высокого уровня продукции однодоменных антител в бактериях, автор оценил содержание белков в периплазме и цитоплазме различных штаммов *E. coli* и показал, что экспрессия в цитоплазме может достигать 200мг целевого белка на 1л культуры, что является одной из наивысших величин производительности среди опубликованных в литературе. Всего было получено три однодоменных антитела, и применение высокоразрешающих методов, в частности одноволновой аномальной рентгеновской дифракции позволило выявить много сходных параметров и нескольких различий в их структуре. Комментируя этот раздел, хочется выяснить у автора, насколько важны данные об особенностях структуры молекул трех антител и сходятся ли они с результатами других авторов, анализирующих строение аналогичных белков верблюдов или лам. Следующий раздел содержит данные анализа взаимодействия однодоменных антител с рецептором ErbB3. Интересно, что два из трех антител связываются с внеклеточным доменом рецептора с константами порядка нескольких нМ, сродство третьего антитела намного ниже, но его комплекс с антигеном стабильнее. Наибольший интерес вызывают данные об эффектах полученных антител на пролиферативную активность опухолевых клеток. Результаты теста MTS показывают, что два антитела, будучи в фармакологически разумных концентрациях, вызывают снижение скорости роста, и имеют цитотоксический эффект, оценка которого, к сожалению, не приведена.

Анализ полученных в настоящем исследовании результатов позволил автору сформулировать 4 содержательных вывода. Все сформулированные выводы логичны и соответствуют содержанию представленных в диссертации результатов. Текст автореферата (23 страницы) соответствует содержанию диссертационной работы.

В целом, работа И.Е.Елисеева производит сильное впечатление своей продуманностью, новыми методологическими находками и, главное, перспективой клинического применения полученных реагентов. Она в полной мере соответствует заявленной специальности и демонстрирует уверенное владение автором современными технологиями.

Замечания.

В тексте работы встречались стилистические ошибки и возможные погрешности форматирования, однако, ввиду незначительности обсуждать их не считаю нужным.

К наиболее серьезным замечаниям к работе нужно отнести отсутствие данных о гибели клеток, испытывающих эффект однодоменных антител.

В порядке научной дискуссии, можно сформулировать следующие вопросы:

1. Каков может быть эффект комбинации терапевтического фактора 1-ой линии и какого-либо из полученных антител?
2. Имея уже клоны клеток, производящих рекомбинантные антитела, нельзя ли повысить эффективность последних путем манипуляций с активными доменами последних?

Следует отметить, что высказанные по данной работе замечания не являются принципиальными, а поставленные вопросы имеют дискуссионный характер и не умаляют значимости работы.

Заключение. Диссертационная работа Елисеева Игоря Евгеньевича на тему «Однодоменные антитела ламы для блокирования активации рецептора ErbB3: разработка, структурно-функциональные исследования, перспективы применения в иммунотерапии», является законченным квалификационным научным исследованием, актуальна, решает важную задачу современной биохимии и соответствует заявленной специальности 1.5.4 - биохимия.

Диссертация полностью соответствует требованиям, изложенным в пунктах 9 и 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции с изменениями от 25 января 2024 г.), утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4- биохимия.

Главный научный сотрудник лаборатории защитных механизмов клетки
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии
Российской академии наук
Доктор биологических наук
Маргулис Борис Александрович
Телефон +79921)3374669
margulis@incras.ru



ЗАВЕРЯЮ
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РАН, к.б.н.
ТИОРЕВА И.И.

