

ОТЗЫВ

официального оппонента, д.б.н. Тиллиба Сергея Владимировича,
на диссертационную работу Елисеева Игоря Евгеньевича на тему
«Однодоменные антитела ламы для блокирования активации рецептора ErbB3:
разработка, структурно-функциональные исследования, перспективы применения и
иммунотерапии»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.4. «Биохимия»

Актуальность выполненного исследования

Иммунотерапевтические подходы на основе моноклональных антител, разнообразных рекомбинантных антиген-узнающих молекул, их конъюгатов, мультвалентных, би- и олиго- специфичных производных, безусловно, являются сегодня очень актуальным, широко признанным направлением биомедицины для повышения эффективности борьбы с онкологическими и иными актуальными заболеваниями человека. Одними из доказанных терапевтических мишеней в случае многих онкологических заболеваний, таких, как рак молочной железы, рак легких, рак толстого кишечника и прямой кишки, являются мембранные рецепторы-тирозинкиназы, представители семейства рецепторов эпидермального фактора роста (ErbB 1-4). Антитела к ряду этих рецепторов (ErbB1 или EGFR, ErbB2 или HER2/neu) уже прочно вошли в арсенал рекомендованной терапии. Однако рецептор ErbB3 (HER3) только относительно недавно стал рассматриваться как важная терапевтическая мишень, и в первую очередь, как компонент опухолеассоциированного гетеродимера HER2-HER3. Есть убедительные данные, указывающие на то, что блокирование антителами функционирования обоих компонентов этого гетеродимера может иметь более выраженный терапевтический эффект, чем блокирование только одного из них (HER2). Таким образом, ErbB3 (HER3) сегодня является новой актуальной мишенью для иммунотерапии. В настоящее время в мире на разных стадиях клинических испытаний находятся разные препараты моноклональных антител, узнающих определенные эпитопы ErbB3. Представленная работа посвящена разработке и биохимическому исследованию новых особых инструментов направленного действия, однодоменных антител, которые можно рассматривать как дополнительный (к имеющимся и разрабатываемым антителам) перспективный инструмент (компонент комбинированного лекарственного препарата) для таргетирования ErbB3.

Научная новизна, достоверность и значимость результатов.

Научная новизна результатов данной работы обеспечивается, в первую очередь, уникальностью объекта изучения. Проведена большая экспериментальная работа с использованием широкого арсенала самых современных методов с целью получить и досконально исследовать новые ErbB3-связывающие молекулы (однодоменные антитела, или нанотела). Продемонстрирован очень эффективный метод гетерологической экспрессии нанотел в цитоплазме особого штамма бактерий *E.coli* и последующего их выделения в функциональном и высокоочищенном виде. Проведен масштабный физико-химический анализ очищенных нанотел, определены узнаваемые ими эпитопы ErbB3 и определены константы связывания. Показано, что полученные нанотела специфически и с высокой аффинностью связывают разные эпитопы внеклеточного домена рецептора ErbB3 и могут быть использованы для блокирования его активации на опухолевых клетках, что приводит к подавлению размножения опухолевых клеток. Одним и принципиально важных начальных этапов в технологии получения новых однодоменных антител является этап амплификации исходного репертуара генов однодоменных антител при создании библиотеки перед процедурами селекции. Автор теоретически и экспериментально продемонстрировал преимущество использования для этой цели эмульсионной полимеразной цепной реакции.

Достоверность и новизна проделанной работы подтверждается пятью публикациями в рецензируемых международных научных журналах и одним российским патентом. Результаты были представлены на 6 конференциях. Полученные диссертантом результаты и разработки, безусловно, имеют большое значение как для фундаментальной науки в области биохимии и иммунологии, так и для прикладных биомедицинских исследований и разработки новых лекарственных средств.

Структура и содержание диссертации.

Диссертационная работа организована по классическому образцу и содержит следующие разделы: список сокращений (отмечу его обширность), введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы, содержащий 261 ссылку на первоисточники. Работа изложена на 147 страницах, содержит 31 рисунок и 11 таблиц.

Обзор состоит из пяти основных частей и содержит основную базовую информацию, которая требуется для понимания актуальности задач проводимого исследования в контексте общего положения дел в данной области науки. Автор описывает основные сегодняшние представления и последние данные, касающиеся

структуры и функционирования рецепторов эпидермального фактора роста в норме и патологии. Особое внимание логично уделено проблеме резистентности опухолей к блокированию HER2 и роли рецептора ErbB в ее формировании. Специальный подраздел посвящен способам терапевтического блокирования рецепторов HER2 и ErbB. Наконец 5 часть обзора посвящена однодоменным антителам Веблюдодовых как альтернативе классических антител. Обзор написан понятным языком, логично, информативно и достаточно сфокусировано.

В главе «Материалы и Методы» достаточно подробно описаны многочисленные и весьма разнообразные методики, использованные для решения поставленных задач. Следует отметить использование автором очень широкого весьма впечатляющего арсенала самых современных методов молекулярной и клеточной биологии, биохимии, биофизики, биоинформатики, навыков программирования.

В главе «Результаты и обсуждение» диссертант последовательно излагает полученные результаты и иллюстрирует их с помощью наглядных рисунков и таблиц. Эта глава содержит шесть подразделов. Описание проделанной работы сделано достаточно четко, последовательно и компактно. Обсуждение полученных результатов проводится вместе с описанием собственно результатов, не вынесено в отдельный раздел. Среди основных результатов работы отмечу следующие. Убедительно показано и теоретически обосновано преимущество использования амплификации ДНК при помощи эмульсионной полимеразной цепной реакции (ПЦР) перед обычной ПЦР для сохранения исходного клонального разнообразия сложной библиотеки последовательностей ДНК, что очень важно для повышения эффективности технологии отбора клонов однодоменных антител с заданной специфичностью. Показано, что наиболее эффективным методом наработки однодоменных антител без молекулярных тагов в бактериях *E.coli*, штамме SHaffle (Δ trx, Δ gor, cDsbC), является их экспрессия в составе гибридного белка, содержащего на N-конце гистидиновый таг и белок SUMO, которые позднее можно отщепить от нанотела с помощью TEV-протеазы. В работе работали с тремя разными нанотелами против внеклеточного домена ErbB3, которые имели названия BCD090-P1 (P1), BCD090-M2 (M2) и BCD090-M456 (M456). Диссертанту удалось эффективно наработать и выделить в чистом виде все три нанотела в цитоплазме бактерий. Для сравнения было также наработано одно нанотело (P1) в периплазме. Было показано, что нанотела являются мономерами и обладают вторичной структурой, характерной для иммуноглобулинового домена. Нанотела P1 и M2 имеют каоническую дисульфидную связь, а в M456 такая связь неожиданно не детектируется. Показано, что все три нанотела, и в особенности P1, обладают высокой конформационной стабильностью. Изучена

пространственная структура M2 в различных кристаллических формах, проведено программное моделирование комплекса M2 с внеклеточным доменом ErbB3. Для всех нанотел определены константы взаимодействия с рекомбинантным доменом ErbB3 методом поверхностного плазмонного резонанса. Идентифицированы относительные локализации узнаваемых нанотелами эпитопов ErbB3. Наиболее перспективные и высокоаффинные нанотела P1 и M2 связывают разные эпитопы ErbB3 на поверхности опухолевых клеток и способны подавлять их ErbB3-зависимую пролиферацию. Весьма перспективным представляется создание бипаратопных нанотел на основе нанотел P1 и M2.

В разделе «Заключение» кратко изложены основные результаты исследования и обсуждены теоретическая и практическая значимость данной работы.

В разделе «Выводы» подведены итоги работы. Выводы не вызывают сомнения.

Замечания

Принципиальных замечаний по сути данной работы и по сделанным выводам у меня нет. Однако, помимо некоторых выявляемых грамматических неточностей, англицизмов, я бы хотел сделать ряд замечаний, сформулировать некоторые вопросы и предложения в основном дискуссионного характера.

На рис. 7 на стр. 59 очень мелкие изображения карт экспрессионных плазмид. Желательно было бы разбить этот рисунок на два с целью увеличить изображения.

В тексте статьи повторяются англицизмы: «эквilibрирована» - например, на стр. 66 и 67 (правильнее: уравновешена); «инъекция» или «инжектировались» - например, на стр. 67, 114 (правильнее: введение, наслаивание, подача); «фолдируется» - например, на стр. 85, 87 (правильнее: образует вторичную структуру, сворачивается).

Есть неточности. Например, на стр. 67: «переведенного в объем элюента» (правильнее, - нормированного на объем элюата).

Стр. 73 «однодоменные антитела... конъюгировали с флуоресцентными метками». Как проверяли, не нарушается ли при этом функциональность нанотел?

В разделе результаты на стр. 91 и 92 несколько удивляют данные об аномальном поведении relB-P1-His6 на электрофорезе и при гель-фильтрации. Результат сдвига подвижности на электрофорезе примерно на 3 кДа вполне можно объяснить наличием His6-тага, дающего дополнительный положительный заряд. Однако, этим не объяснить наблюдаемый увеличенный размер нанотела при гель-фильтрации. Есть ли у диссертанта подобные данные по экспрессии в периплазме и выделению другого нанотела?

На стр. 96 и в других местах работы утверждается, что в случае наработанного в цитоплазме нанотела M456 нет канонической S-S связи. Интересно, есть ли подобные данные относительно того же нанотела, наработанного в периплазме?

На стр. 97 автор утверждает: «Вопреки общим представлениям, отсутствие консервативной дисульфидной связи не мешает данному антигену иметь нативную конформацию иммуноглобулинового домена». На мой взгляд, здесь лучше было бы написать более аккуратно о конкретных экспериментах, указывающих на конформацию, близкую к нативной, особенно в свете последующих данных об этом слабоактивном нанотеле.

Замечание. Удивительно, что ни одно из трех полученных и исследованных в этой работе нанотел не содержит часто встречающуюся в нанотелах дополнительную S-S связь между гипервариабельными участками. Использование таких нанотел могло бы позволить лучше сравнить правильность формирования S-S связей при наработке полнофункциональных нанотел в периплазме бактерий и в цитозоле клеток используемого мутантного штамма.

Стр. 102. Почему именно наименее стабильное из данных вариантов нанотел (M2) было проанализировано методом рентгеноструктурного анализа?

На рис. 30 использовано антитело Ритуксимаб как отрицательный контроль, но не указано в какой концентрации.

Вопрос. Не было ли данных по одновременному использованию трастуцумаба и нанотел (P1 и M2) для подавления роста раковых клеток? Интересно, будет ли добавочный эффект?

Вопрос. Как объяснить меняющуюся относительную разницу в концентрациях нанотел (P1 и M2), необходимых для подавления роста разных опухолевых клеток на рис. 30 и 31?

Заключение

Сделанные замечания касаются в основном оформительского плана, носят дискуссионный характер и ничуть не снижают самой высокой оценки данной очень интересной работы, выполненной на высоком методическом уровне. Таким образом, диссертационная работа Елисеева Игоря Евгеньевича на тему «Однодоменные антитела лампы для блокирования активации рецептора ErbB3: разработка, структурно-функциональные исследования, перспективы применения и иммунотерапии», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. «Биохимия», является законченной, самостоятельно выполненной работой. По своей актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа И.Е. Елисеева полностью соответствует требованиям п. 9 и п. 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в действующей редакции), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Елисеев Игорь Евгеньевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. «Биохимия».

Официальный оппонент:

д.б.н. по специальностям 1.5.3. - «молекулярная биология»,
главный научный сотрудник, и.о. зав. лаб. молекулярных биотехнологий
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии гена Российской академии наук

Тиллиб Сергей Владимирович



12 марта 2023 г.

Адрес: 119334, город Москва, улица Вавилова, дом 34/5
e-mail: tillib@genebiology.ru
телефон: 8-903-791-8997



Подпись С.В. Тиллиба
ЗАВЕРЯЮ
ДИРЕКТОРА ИБГ РАН
МАНСУРОВА Г.В.