

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Петрова» Минздрава России
чл.-корр. РАН, профессор, д.м.н.

А.М. Беляев



«сентября» 2024 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической значимости диссертационной работы Елисеева Игоря Евгеньевича на тему: «Однодоменные антитела ламы для блокирования активации рецептора ErbB3: разработка, структурно-функциональные исследования, перспективы применения в иммунотерапии», представленной к защите в диссертационный совет 24.1.158.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия

Актуальность темы диссертационной работы

Семейство ErbB, состоящее из четырех рецепторов эпидермального фактора роста, представляет собой одно из семейств рецепторных тирозинкиназ, играющих важную роль в координации таких интегральных клеточных процессов в клетках эукариот, как деление, пролиферация, дифференцировка и апоптоз.

Мутации рецепторов ErbB, их суперэкспрессия и/или нарушение регуляции приводит к неконтролируемому клеточному росту и характерно для целого ряда злокачественных опухолей человека. Сигнальная сеть, инициируемая взаимодействием рецепторов семейства ErbB с лигандами, и ее

ключевые элементы, регулирующие направление и скорость передачи сигнала, играют важную роль в патогенезе опухолевых заболеваний, способствуют формированию их агрессивного фенотипа и ассоциированы с плохим прогнозом.

Благодаря современным достижениям биотехнологии активно разрабатываются лекарственные препараты на основе моноклональных антител (МКАТ), обладающие направленным действием на опухолевые клетки и факторы, поддерживающие их рост, или стимулирующие противоопухолевый иммунитет. Мишенью для МКАТ являются ErbB рецепторы, что позволяет создавать препараты для диагностики заболеваний и селективного воздействия на опухоль. В настоящее время МКАТ к рецептору HER2 (ErbB2) входят в стандарты терапии при HER2-положительном раке молочной железы как в монорежиме, так при использовании комбинированного подхода с применением иммуноконъюгатов с цитостатиками. В последние годы под пристальным вниманием исследователей находится новый класс неканонических антител, переменные фрагменты которых представляют собой одиночный иммуноглобулиновый домен молекулярной массой 12-15 кДа. Однодоменные антитела обладают множеством преимуществ, в том числе высокой растворимостью, стабильностью и относительной простотой биотехнологического производства, что дает основания рассматривать их с точки зрения создания новых лекарственных средств для таргетной терапии.

Известно, что суперэкспрессия ErbB3, особенно в сочетании с гиперэкспрессией ErbB2 или ErbB1, ассоциирована с быстрым прогрессированием рака яичников, простаты, легких и плохим прогнозом для пациентов. Возможность идентификации рецептора ErbB3 как терапевтической мишени связана не только с его участием в процессе опухолевой трансформации, но и его ролью в развитии резистентности клеток злокачественных новообразований к ингибированию HER2.

Таким образом, разработка и структурно-функциональные исследования новых однодоменных антител ламы как перспективных средств для иммунотерапии онкологических заболеваний, основанных на блокировании активации рецептора ErbB3 в опухолевых клетках, явились своевременными и актуальными, легли в основу диссертационного исследования и определили цель работы.

Научная новизна диссертационного исследования

В результате исследования разработан новый иммунотерапевтический подход к блокированию активации рецептора ErbB3 в опухолевых клетках, основанный на применении особых неканонических антител верблюдовых, не имеющих легких цепей.

Разработаны технологии молекулярной иммунологии для отбора и синтеза однодоменных антител. Продемонстрированы фундаментальные закономерности, определяющие эффективность амплификации и эволюцию клонального разнообразия библиотек.

Разработан метод гетерологической экспрессии полученных антител в цитоплазме бактерий *E. coli* для эффективного получения фолдированных растворимых антител без молекулярных тагов, показана их высокая термодинамическая стабильность и проанализированы ее структурные детерминанты. Два полученных антитела явились первыми высокоаффинными ингибирующими однодоменными антителами к внеклеточному домену рецептора ErbB3.

Продемонстрировано, что они неконкурентно связываются с двумя эпитопами на рецепторе и блокируют его активацию различными путями, отличающимися от известных моноклональных антител к ErbB3. Оба высокоаффинных однодоменных антитела проявляют функциональную активность и подавляют ErbB3-зависимую пролиферацию клеток рака молочной железы.

Научная новизна исследования подкреплена наличием патента Российской Федерации на технологию получения однодоменного антитела, специфически связывающего рецептор ErbB3 человека.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Значимость диссертационной работы Елисеева И.Е. обусловлена ее вкладом в развитие ключевых технологий молекулярной иммунологии и исследований однодоменных антител как нового класса молекул для терапии и диагностики.

Автором предложена теоретическая модель, предсказывающая эффективность амплификации библиотек при использовании обычной полимеразной цепной реакции и при инкапсуляции библиотеки в капли эмульсии. Данная модель хорошо согласуется с экспериментальными данными и представляет теоретическую основу для анализа эволюции репертуара библиотек и оптимизации протоколов их амплификации и клонирования.

Неканонические антитела верблюдовых обладают уникальными свойствами, которые могут быть реализованы в создании новых иммунотерапевтических средств. В данном исследовании получены фундаментальные знания об устройстве, структурно-функциональных характеристиках и свойствах однодоменных антител. Показано, что консервативная дисульфидная связь в однодоменном антителе может отсутствовать при сохранении фолдинга, высокой стабильности и функции данной молекулы. Полученные структуры высокого разрешения позволили изучить конформации гипервариабельных участков. Структура гипервариабельного участка CDR3 в одном из однодоменных антител отличается от всех известных классов структур для классических иммуноглобулинов G, что демонстрирует различия в репертуарах и механизмах молекулярного узнавания между ними. Сравнительные

исследования стабильности однодоменных антител позволили выявить определяющие ее аминокислотные остатки.

Результаты проведенного исследования обладают высокой практической значимостью, поскольку разработанные методы получения однодоменных антител являются универсальными и могут быть применены для других молекул данного класса. Кроме того, разработанные однодоменные антитела могут также быть использованы для визуализации рецептора ErbB3 и диагностики.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций

Цель и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, сформулированы четко и убедительно. Работу отличает последовательное применение методов научного познания. Значительный объем данных, полученный при непосредственном участии автора, с адекватно использованными в соответствии с задачами современными высокоинформативными молекулярно-биологическими, иммунологическими и математическими методами убеждает в обоснованности и достоверности полученных результатов.

Основное содержание работы изложено в 12 публикациях, из них 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации для публикации основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата биологических наук, 6 тезисов докладов и 1 патент.

Результаты работы были представлены на 4 международных, отечественных конференциях и на 2 семинарах.

Объем и структура диссертации, оценка ее завершенности в целом

Диссертация написана согласно современным требованиям, изложена на 147 стр. и состоит из введения, глав литературного обзора, материалов и

методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, который включает 261 источник, из них 260 – на английском языке. Текст иллюстрирован 11 таблицами и 31 рисунком.

Во введении автор детально определяет актуальность и необходимость исследования, формулирует цель и задачи, методологию и методы исследования, научную новизну и практическую значимость, представляет результаты апробации работы, личный вклад автора, а также положения, выносимые на защиту, которые отражают суть диссертационного исследования.

В литературном обзоре (глава 1), представленном на 39 стр., автор обстоятельно рассматривает область исследований, связанных с изучением рецепторов эпидермального фактора роста, проблемы резистентности злокачественных новообразований к блокированию HER2 и роли рецептора ErbB3 в ее формировании. Также в обзоре литературы представлены данные о возможностях фармакологического ингибирования рецепторов HER2 и ErbB3 и сведения об однодоменными антителами верблюдовых как альтернативы классическим иммуноглобулинам.

К сожалению, несмотря на очень емкое освещение имеющихся в мировой литературе данных, касающихся предмета настоящего исследования, в литературном обзоре отсутствует заключение, которое могло бы логически подвести к целям и задачам представленной работы.

Во второй главе, «Материалы и методы» (20 стр.), дано описание материала, который автор выбрал для реализации поставленной цели. Для клонирования и экспрессии белков были использованы разнообразные штаммы бактерии *E. Coli* и клетки яичника китайского хомячка СНО. Для функциональных экспериментов автором были использованы клеточные линии рака молочной железы, в качестве негативных контролей – клеточные линии хронической миелогенной лейкемии K562, рака шейки матки HeLa и гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2.

В работе автор применил методы молекулярного клонирования и секвенирования, экспрессии и очистки рекомбинантных белков, анализа структуры и стабильности однодоменных антител, макромолекулярной кристаллографии, поверхностного плазмонного резонанса, конфокальной флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуорометрии. Объем изученного материала и избранные методы исследования не вызывают сомнений в значимости и достоверности полученных результатов.

Третья глава занимает 50 стр. и посвящена результатам собственных исследований и их обсуждению. Автором проведена работа по совершенствованию технологий отбора антител, этот раздел посвящен изучению ошибок при амплификации сложных библиотек ДНК и созданию теоретической модели эмульсионной ПЦР. Описаны результаты изучения ошибок (инсерций, делеций, замен) и клонального разнообразия (покрытия) в синтетической библиотеке из 12000 фрагментов ДНК. Показано, что эмульсионная ПЦР значительно лучше сохраняет клональное разнообразие библиотеки ДНК. Далее автором была построена теоретическая модель, описывающая эффективность амплификации библиотеки при эмульсионной ПЦР. Предсказания модели хорошо согласуются с экспериментальными данными и создают теоретическую основу для понимания эффекта деградации клонального разнообразия при амплификации библиотек ДНК. В процессе разработки системы гетерологической экспрессии однодоменных антител было обнаружено, что наиболее эффективной системой получения растворимых однодоменных антител является их гетерологическая экспрессия в цитоплазме бактерий *E. coli* Δ trxB Δ gor cDsbC в виде химерной конструкции с белком SUMO.

При изучении структурных и биохимических характеристик однодоменных антител автор установил, что разработанные однодоменные антитела к рецептору ErbB3 обладают высокой термодинамической стабильностью. Полученные кристаллические структуры позволяют выявить вероятные структурные детерминанты конформационной стабильности,

изучить паратоп связывания и построить модель комплекса с эктодоменом рецептора ErbB3. Было изучено также антипролиферативное действие однодоменных антител в серии экспериментов по ингибированию пролиферации клеток рака молочной железы однодоменными антителами и установлено, что два разработанных антитела неконкурентно связываются с эпитопами на субдоменах III и I эктодомена рецептора ErbB3 с наномолярной аффинностью и эффективно подавляют ErbB3-зависимую пролиферацию HER2⁻ и HER2⁺ клеток рака молочной железы. В заключении автор подводит итоги результатов своей работы, кратко суммируя полученные данные, подчеркивая, что однодоменные антитела представляют идеальную платформу для создания иммуноконъюгатов с цитотоксическими лекарствами вследствие их высокой стабильности, растворимости и хорошего проникновения в ткани. Кроме того, малый размер и эффективный фолдинг однодоменных антител позволяет разрабатывать терапевтические стратегии, в которых антитело может синтезироваться *in vivo* и секретироваться из клеток, а также ингибировать внутриклеточно ErbB3-зависимую сигнализацию путем блокирования биосинтеза и транспорта рецептора до его презентации на клеточной мембране.

Выводы целиком вытекают из результатов исследования.

Автореферат и 12 публикаций, из которых 6 статей опубликованы в рецензируемых научных журналах, рекомендованных перечнем ВАК РФ, полно отражают результаты исследования.

Рекомендации по использованию результатов диссертационной работы

Так как разработанные методы получения однодоменных антител являются универсальными и могут применяться для получения других молекул данного класса, возможно использовать результаты данного диссертационного исследования в производстве МКАТ различного назначения.

Результаты представленного диссертационного исследования вносят значительный вклад в фундаментальные знания о свойствах однодоменных антител, эволюции технологии библиотек ДНК для отбора антител необходимой специфичности, поэтому могут дополнить соответствующие учебные пособия и служить теоретической основой для дальнейших разработок в этой области человеческого знания.

Вопросы и замечания

Принципиально важных замечаний нет.

Заключение

Диссертационная работа Елисеева Игоря Евгеньевича «Однодоменные антитела ламы для блокирования активации рецептора ErbB3: разработка, структурно-функциональные исследования, перспективы применения в иммунотерапии», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная проблема по развитию технологий молекулярной иммунологии и характеристике однодоменных антител как нового класса молекул для терапии и диагностики.

По своей актуальности, научной новизне, объему и уровню проведенных исследований, практической значимости полученных результатов диссертационная работа Елисеева И.Е. соответствует всем требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 01.10.2018 г. № 1168, от 20.03.2021 г. №426, от 26.09.2022 № 1690, от 25.01.2024 № 62), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, а автор Елисеев И.Е.

заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании научного отдела онкоиммунологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, протокол №25 от 07.02.2024.

Заведующий научным отделом
онкоиммунологии
Федерального государственного
бюджетного учреждения
«Национальный медицинский
исследовательский центр
онкологии имени Н.Н. Петрова»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
доктор медицинских наук

И.А. Балдуева

Подпись доктора медицинских наук Балдуевой Ирины Александровны
заверяю

Ученый секретарь
Федерального государственного
бюджетного учреждения
«Национальный медицинский
исследовательский центр
онкологии имени Н.Н. Петрова»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации,
доктор медицинских наук



А.О. Иванцов

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России
Адрес: Россия, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская,
д.68; тел. : +7(812) 439-95-55, эл.адрес: oncl@rion.spb.ru