

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.158.02,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ», ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 28 марта 2024 г. № _____

О присуждении Елисееву Игорю Евгеньевичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Однодоменные антитела ламы для блокирования активации рецептора ErbB3: разработка, структурно-функциональные исследования, перспективы применения в иммунотерапии»

по специальности 1.5.4. – Биохимия

принята к защите 25 января 2024 г. (протокол заседания № 2) диссертационным советом 24.1.158.02,

созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по адресу: 197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 (утвержден приказом Минобрнауки России № 105/нк от 11.04.2012).

Соискатель Елисеев Игорь Евгеньевич, 17 января 1989 года рождения. В 2012 году соискатель завершил обучение на кафедре физики и технологии наноструктур Федерального государственного бюджетного учреждения высшего профессионального образования и науки «Санкт-Петербургский Академический университет — научно-образовательный центр

нанотехнологий Российской академии наук» и получил степень магистра техники и технологии. В 2016 году окончил аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования и науки «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет Российской академии наук» по специальности 1.5.6 «Биотехнология».

С 2011 по 2022 год работал в должности младшего научного сотрудника, затем научного сотрудника в Федеральном государственном бюджетном учреждении высшего образования и науки «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет им. Ж. И. Алферова Российской академии наук». В настоящее время работает в должности ведущего инженера в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины».

Диссертация выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении высшего образования и науки «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет им. Ж. И. Алферова Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель — доктор биологических наук, член-корреспондент РАН Шамова Ольга Валерьевна, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, отдел общей патологии и патофизиологии, заведующий.

Официальные оппоненты:

Маргулис Борис Александрович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, главный научный сотрудник;

Тиллиб Сергей Владимирович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, лаборатория молекулярных биотехнологий, заведующий,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации в своем положительном отзыве, подписанном Балдуевой Ириной Александровной, доктором медицинских наук, заведующим научным отделом онкоиммунологии, и утвержденным директором, доктором медицинских наук, профессором, членом-корреспондентом РАН Беляевым Алексеем Михайловичем 16 февраля 2024 г.

указала, что представленная диссертационная работа «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».

Соискатель имеет 40 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 12 работ, из них в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, опубликовано 5 работ. В диссертации и автореферате отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных работах соискателя. Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. Eliseev I. E. Targeting ErbB3 receptor in cancer with inhibitory antibodies from llama / I. E. Eliseev, V. M. Ukrainskaya, A. N. Yudenko, A. D. Mikushina, S. V. Shmakov, A. I. Afremova, V. M. Ekimova, A. A. Vronskaja, N. A. Knyazev, O.

V. Shamova // *Biomedicines*. – 2021. – V. 9. – № 9. – P. 1106. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091106>. Вид работы: статья в журнале. Объем публикации: 18 страниц. В работе представлены данные по гетерологической экспрессии однодоменных антител, изучению их биохимических характеристик, связыванию с рецептором ErbB3 и антипролиферативной активности. Вклад соискателя: разработка концепции исследования, подбор методов исследования, проведение части экспериментов, участие в анализе данных, подготовка рукописи (авторский вклад составил 60 %).

2. Terekhov S. S. Liquid drop of DNA libraries reveals total genome information / S. S. Terekhov, I. E. Eliseev, L. A. Ovchinnikova, M. R. Kabilov, A. D. Prjibelski, A. E. Tupikin, I. V. Smirnov, A. A. Belogurov, K. V. Severinov, Y. A. Lomakin, S. Altman, A. G. Gabibov // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – V. 117. – № 44. – P. 27300. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017138117>. Вид работы: статья в журнале. Объем публикации: 7 страниц. В работе представлены данные по изучению ошибок в библиотеках ДНК при их амплификации и изложена теоретическая модель процесса амплификации библиотек в эмульсионной полимеразной цепной реакции. Вклад соискателя: анализ данных секвенирования, разработка теоретической модели, подготовка соответствующих разделов рукописи (авторский вклад составил 30 %)

3. Eliseev I. E. Crystal structures of a llama VHH antibody BCD090-M2 targeting human ErbB3 receptor / I. E. Eliseev, A. N. Yudenko, V. V. Vysochinskaya, A. A. Svirina, A. V. Evstratyeva, M. S. Drozhzhachih, E. A. Krendeleva, A. K. Vladimirova, T. A. Nemankin, V. M. Ekimova, A. B. Ulitin, M. I. Lomovskaya, P. A. Yakovlev, A. S. Bukatin, N. A. Knyazev, F. V. Moiseenko, O. B. Chakchir // *F1000Research*. – 2018. – V. 7. – P. 57.

<https://doi.org/10.12688/fl1000research.13612.2>. Вид работы: статья в журнале. Объем публикации: 9 страниц. В работе представлен анализ пространственной структуры однодоменного антитела методами белковой кристаллографии. Вклад соискателя: разработка концепции исследования, подбор методов исследования, проведение части экспериментов, участие в анализе данных, подготовка рукописи (авторский вклад составил 50 %).

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Самойлович Марины Платоновны, доктора биологических наук, главного научного сотрудника и руководителя лаборатории гибридной технологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А. М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Отзыв положительный, замечаний нет. В отзыве отмечается, что «диссертационная работа содержит новые теоретические модели и практические приемы, которые способствуют предсказуемому и эффективному созданию однодоменных антител к различным антигенам. Автором создано два высокоаффинных антитела против двух разных детерминант молекулы ErbB3, которые, судя по результатам их исследования, представляют перспективные реагенты для использования в качестве основы фармакологических противоопухолевых диагностических и терапевтических препаратов».

2. Малек Анастасии Валерьевны, доктора медицинских наук, заведующей научной лабораторией субклеточных технологий с группой онкоэндокринологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Отзыв положительный, замечаний нет. В отзыве отмечается, что

«диссертационная работа... является самостоятельной научно-квалификационной работой, содержащей решение важной научной задачи разработки новых моноклональных антител, имеющей значение для развития иммунотерапии онкологических заболеваний».

3. Смирнова Ивана Витальевича, доктора химических наук, члена-корреспондента РАН, заведующего лабораторией химии протеолитических ферментов, заместителя директора по науке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук. Отзыв положительный, замечаний нет. В отзыве отмечается, что «диссертационная работа... решает важную научную задачу разработки новых иммунотерапевтических средств, содержит оригинальную теоретическую модель и новые практические методы и является законченной научно-квалификационной работой, соответствующей требованиям».

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается наличием публикаций в соответствующей сфере исследований, широкой известностью и достижениями в рассматриваемой области биологических и медицинских наук, а именно в области таргетной терапии онкологических патологий, в частности рака молочной железы, в иммунотерапии, в создании и исследованиях моноклональных антител, в частности наноантител, и в доклинических исследованиях новых фармакологических средств.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

предложен новый подход к блокированию активации рецептора ErbB3 в опухолевых клетках, основанный на применении однодоменных антител

ламы, который может быть использован в иммунотерапии онкологических заболеваний;

разработан способ получения трех новых однодоменных высоко-аффинных антител ламы, взаимодействующих с различными эпитопами на внеклеточном домене рецептора;

доказано, что два из трёх полученных антител, характеризующиеся наиболее высокой аффинностью к антигену, эффективно подавляют ErbB3-зависимую пролиферацию клеток рака молочной железы как с нормальным уровнем экспрессии рецептора HER2, так и с гиперэкспрессией HER2.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что: доказано, что амплификация сложных библиотек фрагментов ДНК при помощи эмульсионной полимеразной цепной реакции ведет к лучшему сохранению их клонального разнообразия по сравнению с обычной полимеразной цепной реакцией, что может быть применено для совершенствования методов конструирования библиотек антител; изложены основные элементы впервые созданной теоретической модели процесса амплификации сложных библиотек ДНК при проведении полимеразной цепной реакции в каплях эмульсии воды в масле, и показано точное соответствие теории экспериментальным данным; применительно к проблематике диссертации результативно использованы методы молекулярного клонирования и секвенирования, хроматографии, масс-спектрометрии, спектроскопии флуоресценции, макромолекулярной кристаллографии и молекулярного моделирования, метода определения аффинности антител с помощью биосенсоров, основанного на эффекте поверхностного плазмонного резонанса, конфокальной микроскопии и проточной цитофлуориметрии;

изучены полученные методом макромолекулярной кристаллографии пространственные структуры разработанного однодоменного антитела и построена модель его комплекса с внеклеточным доменом рецептора, а также выявлены вероятные молекулярные детерминанты конформационной стабильности однодоменного антитела;

проведена модернизация применения метода одноволновой аномальной рентгеновской дифракции на кристаллах белка с ионами кадмия;

раскрыт механизм блокирования активации рецептора ErbB3 при помощи однодоменного антитела, заключающийся в конкуренции с естественным лигандом за связывание с субдоменом I внеклеточного домена рецептора.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработана эффективная система для получения растворимых однодоменных антител высокой степени очистки в нативной конформации;

созданы генетические конструкции для гетерологической экспрессии однодоменных антител в виде химерной конструкции с белком SUMO в цитоплазме бактерий *Escherichia coli*;

определены структурные и биохимические характеристики однодоменных антител, их эпитопы на внеклеточном домене рецептора ErbB3, кинетические и равновесные параметры взаимодействия;

представлены рекомендации по дальнейшей разработке и применению однодоменных антител ламы к рецептору ErbB3, в частности в составе биспецифических и бипаратопных антител и иммуноконъюгатов с противоопухолевыми лекарственными препаратами

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты экспериментальных работ получены на современном сертифицированном оборудовании с применением разнообразных взаимодополняющих экспериментальных методов, характеризуются высокой воспроизводимостью в сериях независимых экспериментов и обработаны при помощи корректных статистических методов;

теория процесса амплификации библиотек ДНК в каплях эмульсии построена на основе стандартных математических моделей и допущений относительно случайных процессов и хорошо согласуется с приведенными в работе экспериментальными данными;

идея базируется на анализе и обобщении данных современной научной литературы о роли рецептора ErbB3 в развитии резистентности опухолей к блокированию рецептора HER2, а также об уникальных характеристиках однодоменных антител как нового класса иммунотерапевтических молекул; использованы различные методы биохимии, структурной и клеточной биологии, методы статистической обработки данных, сравнение полученных результатов с данными из научной литературы по другим терапевтическим моноклональным антителам и однодоменным антителам;

установлено соответствие основных полученных в работе результатов с представленными в научной литературе данными для терапевтических моноклональных антител к ErbB3 и другим рецепторным тирозинкиназам, в тех случаях, когда такое сравнение является обоснованным.

Личный вклад соискателя состоит в его непосредственном участии во всех этапах выполнения диссертационного исследования: выработке концепции исследования; постановке цели и задач исследования; поиске, анализе и обобщении научной литературы по теме исследования; разработке новых методов исследования; разработке планов экспериментов и их проведении; статистической обработке и интерпретации полученных данных;

апробации результатов исследования на всероссийских и международных конференциях; подготовке публикаций и диссертации по выполненной работе.

На заседании 28.03.2024 г. диссертационный совет принял решение:

за разработку однодоменных антител ламы для блокирования активации рецептора ErbB3 и исследование их структуры, свойств и механизмов антипролиферативного действия присудить Елисееву И. Е. степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 24 человек, из них 12 докторов наук по специальности 1.5.4. – Биохимия (6 докторов по биологическим наукам и 6 докторов по медицинским наукам), участвовавших в заседании, из 35 человек, входящих в состав совета, проголосовали:

«за» - 24, «против» - 0, «недействительных бюллетеней» - 0.

Председатель диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

 Василийев В.Б.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат медицинских наук

 Мухин В. Н.

28 марта 2024 г.

