

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук**

**СТЕНОГРАММА**

**Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН**

**17 июня 2020 года**

**Защита диссертации**

**на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

**Шиловой Ольги Николаевны**

**по теме: Создание адресных противораковых агентов на основе  
ERBB2-специфичного белка DARPin 9-29**

**Специальность 03.01.03 – «молекулярная биология»**

**Москва – 2020**

## СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 17 июня 2020 года

Председатель  
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 23 человека, из них докторов по профилю диссертации – 7.

1. Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2. Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
3. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
4. Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
5. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
6. Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(03.01.06)
7. Академик РАН	Деев Сергей Михайлович	(03.01.03)
8. Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(02.00.10)
9. Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
10. Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
11. Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
12. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
13. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
14. Академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
15. Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
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.	Смирнов Иван Витальевич	(02.00.10)
20. Член-корр. РАН	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
21. Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
22. Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)
23. Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(02.00.10)

**Иванов В.Т., председатель:**

Итак, речь идет о защите Шиловой Ольги Николаевны, кандидатской диссертации. Владимир Александрович изложит нам материалы личного дела.

**Олейников В.А., ученый секретарь:**

Да, личное дело. Шилова Ольга Николаевна, гражданка Российской Федерации, окончила Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова по специальности Биохимия в 2015 году. С 2013 г. по 2015 г. она работает уже в нашем институте, старший лаборант с 2013 по 2015, с 2015 г. по 2019 г. – старший инженер, а с 2019 по настоящее время – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии нашего института. Кандидатский экзамен по специальности молекулярная биология сдан с оценкой «Хорошо». Работа выполнена в лаборатории молекулярной иммунологии нашего института, научный руководитель доктор биологических наук, профессор, академик РАН Сергей Михайлович Деев, руководитель лаборатории молекулярной иммунологии. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно 18 декабря 2019 года. Все необходимые документы в деле есть.

**Иванов В.Т., председатель:**

Я надеюсь, у нас нет никаких замечаний, дополнений. Может быть, какие-то вопросы есть по личному делу? Обычно их не бывает, этот раз не исключение. Двигаемся дальше, Ольга Николаевна, Вам слово для доклада, 20 минут.

**Шилова О.Н., соискатель:**

*(Излагает основные положения диссертационной работы)*

**Иванов В.Т., председатель:**

Спасибо. Есть таковые? Вопросы я имею в виду.

**Бовин Николай Владимирович:**

Я не уловил из вашего доклада, откуда собственно взялся специфический DARPin, который связывается с опухолью. Это опубликованная в литературе последовательность аминокислотная или что-то другое?

**Иванов В.Т., председатель:**

Я присоединяюсь к этому же вопросу.

**Шилова О.Н., соискатель:**

Да, спасибо большое за вопрос. Действительно, это белок, который получен в лаборатории Андреаса Плюктуна, его последовательность была опубликована, и мы использовали ее для создания адресных противораковых белков.

**Иванов В.Т., председатель:**

Спасибо, еще вопросы?

**Ефремов Роман Гербертович:**

Мой вопрос непосредственно связан с предыдущим. Это принципиальная вещь, насколько специфичным является дарпин и конструкции на основе дарпина. Потому что известно, что тирозинкиназы рецепторные семейства ERBB работают в ансамблях, в оркестрах так называемых. Насколько все-таки селективен именно к HER2 DARPIn, потому что наверняка он связывается и с другими рецепторными тирозинкиназами, которых вокруг много, они очень плотно упакованы в этих областях мембраны. Спасибо.

**Шилова О.Н., соискатель:**

Спасибо большое за вопрос, он до некоторой степени дублирует замечания уважаемого оппонента. Я могу ответить на него следующим образом. На самом деле при получении DARPIn 9-29 была проверена его кросс-специфичность в отношении по меньшей мере ERBB1 и ERBB4, и по данным иммуноферментного анализа она отсутствует, то есть уровень сигнала крайне низкий, этот белок действительно специфично узнает ERBB2. ERBB3 напрямую в этом сравнении не проверяли, однако если мы посмотрим на эпитоп DARPIn 9-29 (он здесь выделен желтым цветом), то мы увидим, что ERBB3 сильнее всего отличается в этой области от ERBB2, поэтому мы не ожидаем здесь кросс-специфичности. Мы удовлетворились этими данными и не проверяли кросс-специфичность наших конструкций в отношении других членов семейства.

**Иванов В.Т., председатель:**

Есть ли еще вопросы?

**Дзантиев Борис Борисович**

Во-первых, спасибо за интересный доклад. Про DARPIn все уже свое любопытство удовлетворили. Все-таки все время в голове сравниваешь с эффективностью работы антител. С антителами у Вас колоссальный опыт в лаборатории, и с рекомбинантными, и с очеловеченными антителами, и с любыми. Если я правильно запомнил, то константу связывания вы оцениваете как 5 нМ для DARPIn, да?

**Шилова О.Н., соискатель:**

Да, а для DARPIn 9-29 это 3,8 нМ.

**Дзантиев Борис Борисович**

А при этом IC<sub>50</sub> у вас проявляется при 0,1 пМ, это 10<sup>-13</sup>. Вот как на Ваш взгляд, соответствуют эти параметры друг другу?

**Шилова О.Н., соискатель:**

Спасибо большое за вопрос, я понимаю некоторые затруднения, которые вызваны разницей в константе диссоциации. Единственное, что я могу сказать, это что, во-первых, эти данные по высокой эффективности токсинов на основе дарпинов проверены не только в нашей лаборатории, и действительно псевдомонадный экзотоксин просто за счет своей очень высокой токсичности попадает в клетку и считается, что достаточно двух молекул, чтобы убить клетку. Поэтому, несмотря на то, что аффинность измеряется в наномолярном диапазоне, ее достаточно для того, чтобы доставить то количество токсина, которое убьет клетку. Я наверное еще уделю этому внимание в ответе на замечания уважаемого оппонента, но еще очень важной характеристикой белка, помимо его аффинности, является интенсивность интернализации. Не только мы ее оценивали, и

для DARPin 9-29 она действительно очень хороша. Если мы сравним, например, с антителом 4D5 и трастузумабом, который является таким золотым стандартом для доставки чего угодно к раковым клеткам, экспрессирующим ERBB2, то эффективность доставки именно экзотоксина будет выше, потому что трастузумаб и антитело 4D5, полученное из него, препятствуют гетеродимеризации ERBB2 с другими членами семейства, препятствуют эффективной рецептор-опосредованной интернализации. В 2014 году была работа, где напрямую сравнивали несколько разных моноклональных антител, специфичных к ERBB2, просто присоединяя к ним псевдомонадный экзотоксин. Оказалось, что трастузумаб – один из худших, к сожалению, примеров для доставки псевдомонадного экзотоксина в эндосому, потому что это антитело доставляет с высокой аффинностью токсин к рецептору, но дальше оно препятствует интернализации, не попавший в эндосому токсин ничего не может сделать с клеткой.

**Дзантиев Борис Борисович**

Понятно. И совсем короткий вопрос. Эти препараты из лаборатории Плюктуна. Не было там попыток сделать рентген, чтоб понять молекулярный механизм высокой аффинности? Не Вами, а в литературе.

**Шилова О.Н., соискатель:**

Было.

**Дзантиев Борис Борисович**

Просто молекулярный механизм высокой аффинности антител достаточно хорошо понятен, а здесь есть какие-то предпосылки, чтобы объяснить, с чем связывается, как связывается?

**Иванов В.Т., председатель:**

То есть, структуру комплекса Вы имеете в виду?

**Дзантиев Борис Борисович**

Да.

**Шилова О.Н., соискатель:**

Да, структура комплекса была определена, на этом слайде как раз опубликованные данные: здесь DARPin 9-29, который присоединяется к молекуле ERBB2, вот она изогнутая. А это как раз фрагмент, связывающий антитела трастузумаб. Эпитоп взаимодействия картирован, я уже показывала конкретные даже аминокислоты на поверхности ERBB2. Эти аминокислоты определены, они действительно помогают связываться, причем так удачно получилось, что в случае с ERBB2 во взаимодействии участвуют не только аминокислоты, которые варибельные, которые специально мутировали и рандомизировали, но еще дополнительно 5 аминокислот из N-концевого экранирующего модуля, которые, видимо, тоже повышают константу аффинности.

**Дзантиев Борис Борисович**

То есть физхимия соответствует?

**Шилова О.Н., соискатель:**

Да, это получено рентгеноструктурным анализом, эти комплексы опубликованы, буквально в PDB их можно посмотреть.

**Дзантиев Борис Борисович**

Спасибо!

**Иванов В.Т., председатель:**

Есть ли еще вопросы? Их было довольно много. По-видимому, все. Спасибо, отдыхайте немножко, а мы пока продолжим обсуждение по протоколу. Сергей Михайлович, будете характеризовать своего выпускника?

**Деев Сергей Михайлович, руководитель:**

Конечно, буду, не буду это делать долго. Всегда руководители пользуются тем, чтобы подробно рассказать. Я бы тоже мог очень много говорить, но кратко сказать... знаете, вот очень органичный человек, фантастически успешный во всем. К нам пришла студенткой, в срок защищается, и при этом мама замечательного ребеночка, за время аспирантуры ребеночек успел появиться, и это не помешало очень успешному, очень органичному и организованному человеку защититься, аспирантура еще не кончилась, а мы уже защищаемся. Я, наверное, очень счастливый человек, мне довольно часто везет с талантливыми людьми, которые приходят к нам в лабораторию, и Ольга одна из них. Вы видите, успела опубликовать 11 работ, сделала работу, которую Вы видели, я не имею права ее характеризовать, и еще при этом у нее замечательный муж. И они, несмотря на ребенка, несмотря на защиту диссертации еще проанализировали ситуацию с коронавирусом, из-за которого мы все сейчас в масках сидим, написали работу, и сейчас ее направили в публикацию, то есть человек таких разных интересов, и во всем успешен. Я благодарю Ольгу, лаборатории повезло, что она пришла в нашу лабораторию.

**Иванов В.Т., председатель:**

Спасибо. Нам нужно заслушать несколько отзывов. Наш институт дает заключение, я помню правильно? Ведущая организация.

**Олейников В.А., ученый секретарь:**

*(зачитывает положительное заключение организации, где выполнялась диссертация)*

Да, совершенно верно. Во-первых, заключение нашего института по поводу этой работы. Оно классически начинается с некоторых биографических данных: когда Шилова Ольга Николаевна закончила университет имени Ломоносова, потом обучалась у нас в аспирантуре, указаны экзамены. Научный руководитель академик Российской академии наук, доктор биологических наук профессор Сергей Михайлович Деев. Тема диссертационной работы была утверждена на заседании ученого совета 2 декабря 2015 года. Далее работа Шиловой, изложенная в диссертации «Создание адресных противораковых агентов на основе ERBB2-специфичного белка DARPIn 9-29», посвящена разработке адресных визуализирующих и терапевтических агентов на основе этого белка. Она соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Работа посвящена решению актуальных проблем, эти данные вносят вклад в понимание молекулярных механизмов действия адресных противоопухолевых токсинов различного состава. Тема и содержание диссертации соответствуют специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология» и отрасли науки «Биологические науки». Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, все результаты были получены, обработаны и

интерпретированы соискателем лично, за исключением опытов по изучению противораковой активности *in vivo*, которые были сделаны в Нижнем Новгороде. Результаты диссертационной работы полностью представлены в 11 статьях. Сама диссертация рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук. На заседании отдела иммунологии присутствовало 23 человека, единогласно принято вот это решение. Подписано, естественно, Викторией Олеговной Шипуновой (она у них ученый секретарь) и заместителем директора по научной работе Ильей Викторовичем Ямпольским. Утверждено директором нашего института Александром Габибовичем Габибовым.

*(Дальше зачитывает отзыв ведущей организации - отзыв положительный).*

Далее отзыв ведущей организации. Ведущая организация – это Институт биологии гена Российской академии наук. Начинается традиционно с того, что работа актуальна, конкретно пишется, что разработка препаратов для таргетной терапии рака имеет большое практическое значение, так как адресные агенты позволяют не только увеличить эффективность традиционной терапии, но и способствует развитию персонализированной медицины. Далее указаны проблемы, которые решаются в данной диссертации. Научная новизна – здесь подчеркивается, что в ходе исследования Шилова О.Н. впервые показала, что DARPIn 9-29 специфически связывается с рецептором, также впервые изучена скорость интернализации комплекса ERBB2 с DARPIn-miniSOG, что позволяет предсказать эффективность интернализации других белков на основе DARPIn 9-29, и использовать эти свойства для внутриклеточной доставки токсинов. Практическая ценность важна. Теперь о самой работе. Диссертационная работа имеет традиционную структуру, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, списка сокращений. Работа изложена на 109 страницах, цитирует 194 источника.

Введение обосновывает выбор научной проблемы. В обзоре литературы материал изложен последовательно и логично. Обзор не только суммирует ранее полученные результаты, но и освещает некоторые дискуссионные проблемы таргетной терапии. В разделе «Материалы и методы» подробно описаны все использованные методики. Глава «Результаты» включает несколько глав. Здесь достаточно подробно изложено то, что мы сегодня с вами слышали в докладе. Хочется подчеркнуть, что на последнем этапе работы исследовались противораковая активность вышеупомянутых соединений, оба исследованных белка достоверно снижали скорость роста опухоли, также исследовалась неспецифическая токсичность этих соединений с целью выявить побочные эффекты и иммуногенность. Белок DARPIn-LoPE обладал меньшей токсичностью и меньшей иммуногенностью, его можно рассматривать как кандидат при создании лекарственных соединений для борьбы с раковыми клетками, на поверхности которых гиперэкспрессирован рецептор ERBB2. Результаты опубликованы в 11 статьях в рецензируемых научных журналах. Автореферат содержит все необходимые данные и соответствует диссертации.

Тем не менее, к тексту диссертационной работы можно высказать некие замечания. Первое: при изучении неспецифической токсичности препаратов принято указывать тип исследуемой токсичности (острая или хроническая). В разделах, посвященных сравнению белков DARPIn-PE40 и DARPIn-LoPE, это не уточняется. Второе: в обзоре литературы излагается история получения и использования укороченных вариантов псевдомонадного экзотоксина, использованных в данной работе. Однако описание модификаций остается довольно кратким. Поскольку изменения, внесенные в последовательность белка, были выбраны на основе данных о структуре белка и его иммунодоминантных эпитопах, и тесно связаны как с активностью токсина, так и с его иммуногенностью, хотелось бы увидеть в тексте обзора последовательности PE, PE40 и LoPE, чтобы можно было понять, что именно модифицировали в каждом случае. Третье:

подписи к некоторым рисункам выполнены небрежно, слишком мелкий шрифт затрудняет чтение рисунка.

Однако указанные замечания относятся не к существу работы, а к ее форме, и не умаляют ценности диссертационной работы. Сама работа соответствует требованиям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Это было обсуждено на семинаре лаборатории молекулярной иммуногенетики рака Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук в феврале 2020 года. Отзыв подписан заведующей лабораторией молекулярной иммуногенетики рака доктором биологических наук профессором Сащенко Лидией Павловной. Отзыв ведущей организации утвержден директором ИБГ РАН академиком Георгиевым Павлом Георгиевичем.

**Иванов В.Т., председатель:**

Там были замечания, хотелось бы услышать ответы на замечания.

**Шилова О.Н., соискатель:**

Спасибо за возможность ответить на замечания. Что касается оформления, то я постараюсь учесть это в своих дальнейших работах. Что касается последовательностей белков, то действительно, можно бы было внести их в текст, чтобы прояснить, потому что низкоиммуногенных вариантов уже получено несколько. Для большей наглядности я уже включила в доклад вот эту схему, где видно, какие домены были укорочены в каком случае. Если говорить о последовательностях, то можно построить такое выравнивание, где будут видны, или, во всяком случае, будут отмечены отличия природного экзотоксина от PE40 и LoPE. Что касается токсичности, то наше исследование соответствует изучению хронической токсичности, поскольку мы не определяли разовых летальных или полумлетальных доз при введении белков. Напротив, мы рассматривали долговременные эффекты от повторного введения белков.

**Иванов В.Т., председатель:**

Все понятно, спасибо. Были ли у нас отзывы на автореферат?

**Олейников В.А., ученый секретарь:**

*(зачитывает дополнительные отзывы)*

Да, поступили отзывы на автореферат, их целых три. Все отзывы положительные. Характеризуют, что работа сделана на высоком методическом уровне, отметить следует новизну представленных результатов. Автореферат соответствует паспорту специальности 03.01.03 и соответствует требованиям, установленным Положением о присуждении ученых степеней. Этот отзыв подписан Сергеем Михайловичем Кочетковым, доктором химических наук, профессором, академиком РАН, Институт молекулярной биологии имени Энгельгардта.

Еще один положительный отзыв. Не вызывает сомнения новизна работы, выполнена на высоком методическом уровне, удовлетворяет требованиям ВАК. Отзыв подписан заведующим лабораторией №23 иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии». Это доктор биологических наук, профессор Филатов Александр Васильевич.



Еще один положительный отзыв. Опять же отмечается научная новизна, автореферат целиком отражает суть проделанной работы. Отзыв подписан научным сотрудником кафедры клеточной биологии и гистологии Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова Поташниковой Дарьей Марковной, кандидат биологических наук.

**Иванов В.Т., председатель:**

Там не было замечаний, поэтому можем двигаться дальше. Давайте заслушаем официальных оппонентов. Владимир Сергеевич Прасолов, доктор биологических наук, заведующий лабораторией, причем прямо по теме диссертации – клеточных основ развития злокачественных заболеваний. Слушаем, Владимир Сергеевич.

**Прасолов Владимир Сергеевич, оппонент:**

*(излагает отзыв, отзыв положительный)*

Спасибо. Глубокоуважаемые коллеги, для меня всегда большое удовольствие быть в вашем институте, долгое время мы были под одной крышей на улице Вавилова.

Представленное исследование является логическим звеном в большом направлении, успешно развиваемом уже много лет Сергеем Деевым. И тут, наверное, я не буду Вас утомлять еще раз пересказом содержания работы, потому что сама Ольга Николаевна прекрасно рассказала обо всем, и вопросы и отзыв ведущей организации уже затронули то, что я хотел бы сказать. В целом, что, на мой взгляд, является крайне актуальным: работа стоит на острие исследований, направленных на создание методов адресованной селективной борьбы с раковыми заболеваниями. В данном случае нужно выделить было вполне адекватный раковый маркер и подобрать условия взаимодействия направленного этого маркера с каким-то терапевтическим агентом. И надо сказать, что в лаборатории академика Деева всегда эта цель преследовалась, и у меня была возможность проследить за эволюцией этого исследования большого, этого направления. В данном случае мне кажется, что сделан значительный шаг, потому что этот известный маркер присутствует не только в объекте, который был исследован, а именно, маркер, который присутствует в 30-40% злокачественных опухолей молочной железы. Этот же маркер, тирозинкиназа HER2, присутствует еще в опухолях желудочно-кишечного тракта, простаты, яичников и других. В данном случае, использовали оригинальный интересный модуль, который специфически узнает тирозинкиназу HER2. И в серии экспериментов, логичных, с хорошими контролями, было показано, что, во-первых, этот модуль обеспечивает адресную доставку и присоединение к этому маркеру злокачественных клеток этой опухоли, потом были введены токсические агенты, поскольку все это делается, чтобы уничтожить раковые клетки. Вначале фотосенсибилизирующий токсин вводился (miniSOG), а потом – очень интересные вещи, которые я у нас в стране впервые увидел. Этот домен был соединен с токсином бактериальным. И это очень эффективная вещь, причем мне понравилось, что не просто вслепую присоединили, что само по себе хорошо бы было, но был найден способ методами геной инженерии удалить те локусы молекулы токсина, которые в значительной степени определяют его и неспецифичность, и, что главное, иммуногенность. Таким образом, это имеет значение для использования такого приема для создания действительно действующих антираковых терапевтических средств.

Я коротко должен сказать, что диссертация мне очень понравилась, во-первых, по тому, как она спланирована, и как выполнена. Это высочайший уровень современных методов молекулярной и физико-химической биологии, которые с умом, с хорошими контролями были применены. Что важно, обзор написан очень хорошо и интересно, и позволяет заинтересованному читателю быстро войти в круг обсуждаемой проблемы оценить

правильно место этого исследования в общем потоке исследований, которые проводятся в мире, и понять, что собственно нового и замечательного здесь сделано.

Вопросы, которые я хотел задать, уже обсудили. И одна вещь мне кажется важной, я скажу о ней, поскольку она часто встречается. Это когда в автореферат автоматически переносят рисунки из формата А4 диссертации в этот маленький уже листик. И может быть, многие обходятся без этого, но я, поскольку хотел дотошно рассмотреть, что там такое, я использовал увеличительное стекло, чтобы прочесть. Вот это надо иметь в виду. Есть некоторые описки, неизбежные у всех наших молодых исследователей англицизмы, которых в принципе легко при желании избежать. Но в целом, на меня диссертация произвела очень хорошее впечатление. Я должен сказать, что я довольно часто оппонирую и пишу отзывы, но можно сказать, что из общего потока диссертаций за последние годы эта работа выделяется. И я хочу поздравить и саму Ольгу Николаевну, и Сергея Михайловича с этой замечательной работой, пожелать им в дальнейшем в том же ключе продолжать и радовать нас всех. Спасибо.

**Иванов В.Т., председатель:**

Спасибо Вам. Ольга, соглашаемся с тем, что мелковаты подписи на рисунках в автореферате? Нет, кажется, будем спорить. Давайте.

**Олейников В.А., ученый секретарь:**

Там просто были замечания в тексте отзыва, которые не прозвучали.

**Шилова О.Н., соискатель:**

Ни в коем случае, конечно, не буду спорить. Большое спасибо Владимиру Сергеевичу за прочтение моей работы и за столь благожелательную рецензию. Я хочу извиниться за то, что доставила некоторые неудобства своим мелким шрифтом, надеюсь, что в дальнейшем не буду так делать. В автореферате было бы удобнее смотреть, если бы было покрупнее. Спасибо за рецензию, учту это в дальнейшем.

**Иванов В.Т., председатель:**

Двигаемся дальше. Второй оппонент – Жердев Анатолий Виталиевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиохимии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии».

**Жердев Анатолий Виталиевич, оппонент:**

*(излагает отзыв, отзыв положительный)*

Уважаемый председатель, уважаемые члены диссертационного совета, уважаемые коллеги. Стало уже некой исторической традицией, повторяющейся в десятках монографий и так ритуально заученной во многих докладах, что, когда речь идет об антителах как о биологических рецепторах, то о них говорится: «Благодаря уникальным возможностям молекулярной комбинаторики антитела предоставляют возможность конструировать биологические рецепторы с крайне высокой аффинностью и специфичностью». Ясно, что это лукавство, и лукавство уже на протяжении достаточно большого периода времени, но лукавство как бы извинительное. Потому что, несмотря на ряд описанных так называемых альтернативных скаффолдов, где также обеспечена возможность такой биологической комбинаторики и создания альтернативы антителам, а таких семейств уже даже, соискатель не даст соврать, по пальцам не пересчитаешь, естественен был следующий вопрос: «Ну и что?». Потому что с антителами понятно по

историческому опыту, что делать, как их модифицировать, как их тестировать, как нарабатывать в первую очередь именно антитела нужной специфичности, отбирать и так далее.

Ситуация изменилась благодаря развитию молекулярно-генетических методов и сейчас по большому счету нет проблем, воспользовавшись тем или иным из описанных скаффолдов, создать библиотеку, отбирать необходимые рецепторы нужной специфичности и создавать в первую очередь тоже генно-инженерные конъюгаты для решения тех или иных целей. Благодаря этому наряду с развитием иммунологических методов иммунодиагностики и иммунотерапии наблюдается некий бум применений альтернативных биологических рецепторов. Следует признать, что не только белковых, но и олигонуклеотидных аптамерных (там все очень активно развивается), что приводит к еще одному трафарету в обсуждениях. Когда на конференциях докладчику задают вопрос о том, как он вообще относится к новому рецептору, насколько он конкурентоспособен по сравнению с антителами, докладчики говорят отлаженную фразу на английском или на русском: «Мы еще слишком молоды. Нашего возраста, нашего опыта еще недостаточно, чтобы решить все проблемы, которые иммунологи с антителами решили уже за сотню лет». И вот в этой ситуации «Мы еще слишком молоды, у нас очень новый, мало охарактеризованный объект» оказалась диссертантка, оказалась лаборатория при формулировке тем, при постановке задачи исследования.

Наверное, не было бы сложностью, не было бы проблемой для лаборатории воспользоваться этой скидкой на молодость и сфокусировать работу в первую очередь на первичном изучении структурных характеристик дарпинов, особенностей взаимодействия. Тем более что прозвучавшая предыстория их возникновения и фамилия Плюктун – это не просто ссылка в литературу, это группа, с которой коллектив под руководством академика Деева давно и успешно взаимодействует. И не было бы проблемой решать методически, наверное, более простые и не рискованные задачи по характеристике взаимодействия этих альтернативных скаффолдов.

Диссертант такой скидкой на молодость дарпинов не воспользовался и пошел по более сложному пути, по характеристике возможностей этих альтернативных рецепторов как средств потенциальной онкотерапии. И в представленном докладе (я не буду повторять ключевые слова и конкретные экспериментальные полученные данные) успешно пройдено по наиболее критичным параметрам применения потенциальных онкотерапевтических средств, показана эффективность дарпинов в этом отношении, показана сопоставимость их с антителами в этом отношении.

Ясно, что эта работа не отменяет уже канонических, в доклинических испытаниях конкретных отбираемых препаратов, но резко добавляет оптимизма, резко добавляет интереса к использованию дарпинов, к возможности благодаря другой комбинаторной структуре обойти те проблемы, которые известны и с которыми долго и разной эффективностью борются для антител и работать с новым классом терапевтических агентов.

Возвращаясь к конкретно диссертации, следует отметить, что все проведенные исследования диссертантом очень четко изложены, дан детальный анализ с доказательным подтверждением всех выводов. Результаты работы в полной мере отражены в публикациях, автореферат полностью соответствует содержанию полной диссертации, отражает тематику направления исследований. Не вызывает сомнений то, что работа соответствует тематике специальности и соответствует всем требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертационным работам, а соискатель заслуживает присуждения искомой степени.

И короткое возвращение к тому, с чего я начинал, кто-то из советских классиков писал, что какая, собственно, разница, кому сколько лет, главное – что у кого впереди. Вот на мой взгляд диссертационная работа, именно применительно к альтернативным

скаффолдам дарпинам показала, что они заслуживают того внимания, которое на них было потрачено при выполнении диссертационной работы и заслуживает продолжения исследований как потенциальное средство терапии, в том числе опухолевой терапии. Спасибо за внимание.

**Иванов В.Т., председатель:**

Спасибо. Я упустил, там не было замечаний?

**Жердев Анатолий Виталиевич, оппонент:**

С замечаниями та же ситуация немножко у нас, что и с первым оппонентом: почти все замечания прозвучали в ходе дискуссии, но, поскольку там какие-то акценты менялись, может, мы попросим диссертанта непосредственно по списку пройти и дать некие дополнительные комментарии к уже обсуждавшимся и прописанным в отзыве замечаниям. Можем мы так поступить?

**Иванов В.Т., председатель:**

Спасибо. Диссертант хочет, по-моему, какие-то комментарии дать.

**Шилова О.Н., соискатель:**

Спасибо большое за такое подробное изучение моей работы и за содержательные комментарии. Я действительно хотела бы немножко вернуться к тем замечаниям, которые были в отзыве, чтобы не осталось никакой незавершенности по их обсуждению.

Что касается структурного сходства членов семейства ERBB, то этот вопрос уже прозвучал. Я уже отметила, что для DARPIn 9-29 было проверено отсутствие кросс-специфичности еще на стадии его получения и отбора фаговым дисплеем, когда исходно этот модуль получался. Конечно, важно различать специфично разные члены семейства, поскольку, несмотря на их структурное сходство, их функционирование и роль в патогенезе отличаются, и поэтому их отдельно определяют для разных типов рака. В данном случае это отсутствие кросс-специфичности было проверено.

Далее было замечание в отзыве про сравнение альтернативных скаффолдов и антител по размеру вариабельного лиганд-связывающего участка, размеру молекулы и аффинности. Действительно, это принципиальный вопрос, и здесь как раз был вопрос про аффинность дарпинов в соотношении с их функциональными свойствами. Размер, как я уже говорила, определяет фармакокинетику белка и проникновение в опухоль, число вариабельных аминокислот во многом определяет спектр возможных мишеней, а размер, жесткость и форма связывающего участка также влияют не предпочитаемые мишени. И, естественно, аффинность – наиболее, пожалуй, важный параметр для разных связывающих модулей. Здесь я должна сделать небольшую оговорку, что число вариабельных аминокислот не обязательно соответствует числу аминокислот, участвующих во взаимодействии с мишенью, мы уже даже это обсудили. Но с этой оговоркой мы можем сравнить дарпины с другими связывающими модулями.

Действительно, альтернативных скаффолдов получено уже очень много. В данную таблицу, в данное сравнение я включила только те белки, препараты на основе которых проходят как минимум вторую стадию клинических испытаний. Среди антител, понятно, что много уже есть клинически одобренных. Что касается размера, то дарпины находятся примерно в середине диапазона, 14-18 кДа в зависимости от числа связывающих модулей, тем не менее, они содержат довольно много вариабельных аминокислот на такую молекулярную массу. И что касается аффинности, то стоит заметить, что сейчас к дарпинам применяют методики созревания аффинитета, которые позволяют добиться

субнаномолярных и пикомолярных аффинностей, что сравнимо с одноцепочечными антителами. Дополнительным преимуществом является отсутствие дисульфидных связей, стабилизирующих структуру, что определяет их агрегационную стабильность и возможность делать точные конъюгаты за счет введения уникального цистеина.

И еще один был вопрос про сравнение  $IC_{50}$  описанных конструкторов с аналогичными ERBB2-специфичными конструкторами на основе антител, что прозвучало в отзыве как необходимость сравнивать с тем, что уже хорошо сделано. В данную таблицу я опять же включила такие параметры, которые не упомянуты в докладе. DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG, полученный на основе антитела, мы сравнивали напрямую в работе, и я это изложила в докладе. Что касается ERBB2-специфичных агентов, включающих псевдомонадный экзотоксин, то, видимо, в силу такой исторической предопределенности чаще всего такие конструкторы получают на основе трастузумаба, хорошо клинически охарактеризованного антитела, одобренного и так далее. И чаще всего, видимо из-за того, что опять же очень хорошо проработаны протоколы конъюгации, получают конъюгаты. При этом конъюгация не всегда точная, и это влияет на эффективность итогового препарата, как видите, для конъюгатов в основном диапазон концентраций  $IC_{50}$  наномолярный, исключение составляет недавно полученный (в 2019 году) конструктор, очень изысканный, с двумя модифицированными на генном уровне белками, который тоже работает в пикомолярном диапазоне концентраций. Что касается слитных белков, у них нет этой необходимости делать сложную конъюгацию. Однако если мы сравним даже с 4D5scFv-PE40, также полученным в лаборатории молекулярной иммунологии, это слитный белок, то он имеет сравнимую константу диссоциации, сравнимую  $IC_{50}$ . Но, тем не менее, примерно в 10 раз более высокую  $IC_{50}$ , то есть низкую токсичность. Мы связываем это, как я уже говорила, с эффективностью интернализации. И это не только наши измерения динамики, но и уже упомянутая работа, где было показано, что 4D5, точнее трастузумаб и полученное из него одноцепочечное антитело 4D5scFv, препятствуют гетеродимеризации и интернализации рецептора. Таким образом, полученные в работе конструкторы на основе дарпина и псевдомонадного экзотоксина оказываются оптимизированы сразу по двум параметрам: во-первых, они не требуют сложной конъюгации, что упрощает получение агентов, и, во-вторых, они эффективно интернализуются, и адресный модуль не мешает работе токсического.

На этом, кажется, все замечания в отзыве завершены, я надеюсь, что я удовлетворила уважаемого оппонента своими ответами.

**Жердев Анатолий Виталиевич, оппонент:**

Да, спасибо большое.

**Иванов В.Т., председатель:**

Спасибо. У нас завершена заранее заготовленная часть нашего заседания, нашего обсуждения, переходим к открытой дискуссии. Кто еще хотел бы добавить к тому, что мы уже услышали, свою точку зрения, в том числе и по поводу того, как голосовать? Виктор Ионович, прошу.

**Цетлин Виктор Ионович:**

Мне понравилась эта работа, это прекрасное сочетание химии и молекулярной биологии. То, что касается химии, мы, скажем, тоже что-то отдельно понимаем. Здесь токсины, вы работали с токсином. Вот это сочетание, оно классно сделано, и видно, что работа сделана очень серьезно. И слово DARPin не очень было мне знакомо, на глаза попался недавний выпуск Nature, и там написано DARP, и, может быть, не все в зале знают, что это за сокращение. Это американский Defence Advanced Research Project. Почему я об

этом вспомнил здесь? Это не просто совпадение сокращений, не имеющее отношения к данной работе. Там интересно даются гранты: грант дают, чтобы была выполнена какая-то часть работы, и параллельно даются гранты каким-то другим независимым лабораториям, которые должны будут эту работу воспроизвести, и действительно оказалось, что это нормальная воспроизводимая работа. По тому, как эта работа была представлена, у меня нет сомнения, что это работа прекрасно воспроизводимая и даже уже видно возможное практическое применение. Поэтому я буду, конечно, голосовать за и вместе с американцами призываю проголосовать за.

**Иванов В.Т., председатель:**

Спасибо, учтем. Кто еще хотел бы высказать соображения. Прошу.

**Дзантиев Борис Борисович:**

Коллеги, я всегда с интересом читаю работы от лаборатории Сергея Михайловича, эта работа не исключение. В ней, как всегда, есть сочетание очень интересной современной науки и использования этой науки для решения конкретных практических задач, то, что мы все сегодня слышали. То, что мне особенно понравилось, это то, что лаборатория использовала весь свой огромный потенциал работы с антителами для того, чтобы не просто получить результаты с дарпином, а сравнить их, насколько это альтернатива, или это лучше, чем с антителами. И то, что мы слышали, в общем-то убеждает в том, что действительно найден скаффолд, который вполне может конкурировать и превосходить по эффективности использование антител. Это не значит, что их списывают в архив, это просто очень интересная находка, которая имеет свое право на дальнейшее развитие. Поэтому у меня нет никаких сомнений, что работа хорошего кандидатского уровня. Конечно, я буду голосовать за нее и думаю, что у всех членов ученого совета есть все основания для этого же. Спасибо.

**Иванов В.Т., председатель:**

Спасибо. Кто еще хотел бы добавить к тому, что мы слышали? Судя по всему, такой необходимости нет. Все, что надо было сказать, было уже сказано, и мы готовы двигаться дальше. Перед тем, как двигаться дальше, я дам слово диссертанту для завершения обсуждения, для заключительного слова. Прошу.

**Шилова О.Н., соискатель:**

Большое спасибо за возможность еще раз подытожить свой доклад и обсуждение. Я благодарна глубокоуважаемым членам диссертационного совета за внимание к моей работе и за ее столь содержательное обсуждение. Что касается выполнения самой работы, то, конечно, я очень благодарна всему коллективу лаборатории молекулярной иммунологии за возможность выполнить эту работу и за помощь на всех ее этапах. Естественно, благодарю Сергея Михайловича Деева за руководство и содействие со всех возможных сторон, Галину Михайловну Прошкину за совместную работу по белкам на основе miniSOG и LoPE, Екатерину Николаевну Лебеденко за огромную помощь в редактировании текста и остальных сотрудников лаборатории молекулярной иммунологии, поскольку я получала очень важные и экспериментально нужные советы на всех стадиях работы. Кроме того, я бы хотела поблагодарить Рябову Анастасию Владимировну за проведение измерений на конфокальном микроскопе и сотрудников лаборатории оптической тераностики Нижегородского государственного университета за совместную работу по изучению противораковой активности белков *in vivo*. Ну и членов моей семьи за большую помощь и возможность выполнить эту работу. Спасибо большое.

**Иванов В.Т., председатель:**

Все понятно. По поводу голосования: нам нужно избрать счетную комиссию. У меня уже традиционно заготовлено некое предложение, которое я озвучу, традиционно опять же без имен, отчеств и регалий: Лебедев, Цетлин и Олейников. Стандартный размер счетной комиссии, есть ли изменения, есть ли иные предложения коррекции в ту или иную сторону, отводы, самоотводы? Как правило, не бывает, все согласовано заранее, данный случай не исключение. Прошу проголосовать за данный состав счетной комиссии (Лебедев, Цетлин, Олейников). Кто против? Нет. Счетная комиссия избрана, мы можем голосовать. И перед тем как это делать, я традиционно хотел бы услышать от членов ученого совета, есть ли какие-то замечания по поводу проекта заключения, за которое нам предстоит голосовать после заслушивания итогов нашего основного голосования? Николай Владимирович, похоже, заготовил что-то такое. Давайте.

**Бовин Николай Владимирович:**

Так получилось, что я монополизировал эту деятельность ученого совета. Я буду пытаться в дальнейшем совершенствовать эту свою деятельность. Раздел «Практическое применение», я предлагаю убрать кусочек, который я процитирую: «Получены данные о динамике интернализации рецептора в комплексе с искусственным лигандом». Мне кажется, что это к практике имеет очень отдаленное отношение. И второе мое пожелание - это 5 и 6 страница, абзац, который начинается со слов «Диссертационный совет отмечает...» и заканчивается практическим применением. Если посмотреть на весь этот кусок целиком, то тот, кто будет это делать бегло, а такие, наверное, будут, у них может создаться впечатление, что речь идет о препарате противораковом. Здесь это называется совершенно корректно противораковым агентом, но при беглом чтении может возникнуть такое ощущение. Поэтому мне кажется, что нужно будет каким-то образом написать, что речь все-таки идет о модельных системах. Это все делается либо на клеточной системе, либо на животных. Чтобы не было ложного ощущения о готовом противораковом препарате.

**Иванов В.Т., председатель:**

У нас традиционная ситуация. Предлагается некая редакция, обычно мы находим такое дипломатическое решение: мы поручаем вам, Николай Владимирович, и авторам доработать и прийти к какому-то консенсусу, к какому-то устраивающему обе стороны решению. И мы доверяем, что вы примете устраивающее нас решение. Мы будем готовы голосовать после того, как мы послушаем общие итоги голосования, будем голосовать за будущую исправленную формулировку этого проекта заключения.

**Бовин Николай Владимирович:**

Должен признать, что та схема ни разу не давала осечки.

**Иванов В.Т., председатель:**

Объявляю перерыв на голосование, предлагаю не расходиться, я надеюсь, что подсчет будет быстро осуществлен и мы быстро получим итог голосования.

*(Идет тайное голосование)*

**Иванов В.Т., председатель:**

Подсчет голосов закончен, и счетная комиссия готова объявить результаты своих подсчетов.

**Олейников В.А., ученый секретарь:**

Итак, итоги голосования по диссертации Шиловой Ольги Николаевны. Присутствовало на заседании 23 члена диссертационного совета, роздано бюллетеней - 23, оказалось в урне - 23, «за» – 23, «против» и недействительных нет.

**Иванов В.Т., председатель:**

Ожидаемо. Кто за то, чтобы утвердить итоги голосования? Кто против? Подсчет был правильный. Последнее голосование. Мы уже обсудили предварительный проект заключение, давайте проголосуем за отредактированный проект, который мы уже имеем на руках. Кто за? (*Проект заключения совета принимается единогласно*). Поздравляем диссертанта с блестящей защитой, спасибо всем за работу.

Председатель  
диссертационного совета

Ученый секретарь  
диссертационного совета



д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

д.ф.-м.н. Олейников В.А.