

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Боробовой Елены Александровны на тему: «Разработка и изучение свойств искусственных полиэпитопных антигенов меланомы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология

Актуальность темы

Меланома является опасным злокачественным заболеванием, которое характеризуется высокой частотой летальных исходов. Разработки последних лет демонстрируют крайне обнадеживающие результаты по возможности создания и применения новых препаратов для лечения онкологических заболеваний. Накопленные знания в области онкоиммунологии, свидетельствующие о ключевой роли клеток иммунной системы в опухолевой прогрессии, являются основой для развития направления по созданию терапевтических противораковых вакцин, предназначенных в первую очередь для модуляции противоопухолевого иммунного ответа.

Привлекательным в этом отношении является подход по созданию ДНК-вакцин, кодирующих полиэпитопные иммуногены, содержащие Т-клеточные эпитопы из основных раковых антигенов. Полиэпитопные иммуногены в этом случае могут быть спроектированы, как с учетом распространенности различных алломорфных вариантов молекул HLA I класса, так и с учетом генетических особенностей каждого конкретного человека. Важным преимуществом таких вакцин является то, что они не содержат последовательностей полноразмерных белков, которые могут индуцировать развитие аутоиммунных реакций в организме вакцинируемого. Кроме того, ДНК-вакцинация способствует активации главных эффекторных клеток противоопухолевого иммунитета - цитотоксических Т-лимфоцитов.

Диссертационная работа Боробовой Елены Александровны посвящена конструированию и изучению свойств искусственных полиэпитопных иммуногенов, включающих в себя ряд цитотоксических и хелперных Т-клеточных эпитопов из шести антигенов меланомы (NY-ESO-1, MART-1, MAGE-A1, MAGE-A11, MAGE-A3 и MAGE-C1). Одним из ключевых этапов данной работы является проведение рационального дизайна искусственного иммуногена, а также включение в его состав сигнальных последовательностей для оптимизации процессинга целевых белков в клетках эукариот. В ходе исследования проводилось изучение экспрессии целевых генов трансфицированных эукариотических клетках, а также изучение иммуногенности и цитотоксической активности сконструированных рекомбинантных ДНК.

Научная новизна и практическая значимость исследования и полученных результатов

Научная новизна и оригинальность результатов, полученных автором, не вызывают сомнения. В ходе исследования при помощи компьютерного анализа и генно-инженерных работ впервые получены уникальные ДНК-конструкции, кодирующие полиэпипотные иммуногены MEL-A0201 и MEL-TCl.

В результате проведенных исследований была показана иммуногенность созданных ДНК-конструкций, определяемая по уровню продукции гранзима В эффекторными Т-лимфоцитами.

Впервые продемонстрирована способность искусственных полиэпипотных иммуногенов индуцировать образование репертуара эффекторных лимфоцитов, обладающих киллерной активностью по отношению к опухолевым клеткам, в системе *ex vivo*.

Плазмидные конструкции pMEL-TCl и pMEL-A0201, полученные в ходе выполнения работы, защищены патентами РФ.

Полученные в ходе работы результаты дают основания для расширения исследований по созданию полиэпипотных иммуногенов, как средств онкологических заболеваний в будущем.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Положения, представленные на защиту, согласуются с данными, приведенными диссертантом в работе. Выводы обоснованы и являются логическим завершением диссертационной работы.

Структура и объем работы

Диссертация построена по традиционной схеме: состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 191 источник преимущественно зарубежных авторов. Работа изложена на 132 страницах, включает 16 рисунков, 4 таблицы, 3 приложения.

Во введении автор обосновал актуальность исследуемой проблемы и изложил существующие на сегодняшний день современные разработки в этой области, обозначил цель и задачи исследования, привел положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы включает анализ как зарубежных, так и отечественных источников, относящихся к исследуемой проблеме. В обзоре представлены современные представления о «противоопухолевом иммунном ответе» и «механизмах формирования иммунологической толерантности к опухолевым клеткам». Литературный обзор написан хорошим, ясным языком, в нем приведены наиболее значимые разработки в области иммунотерапии меланомы. В обзоре было бы логичным описать участие системы HLA в процессинге белков, возможность и необходимость персонификации рекомбинантных вакцин – диссертант использует в работе специфические последовательности, которые распознаются соответствующими системами гистосовместимости, однако этот момент лишь незначительно затронут в литературном обзоре.

Глава «Материалы и методы» содержит описание используемых в работе реактивов, материалов и методов исследования и позволяет полностью воспроизвести проведенные эксперименты.

Глава «Результаты и обсуждение» представлена в виде пяти частей. Первая часть посвящена описанию алгоритма выбора эпитопов из шести антигенов меланомы (NY-ESO-1, MART-1, MAGE-A1, MAGE-A11, MAGE-A3 и MAGE-C1) и теоретического дизайна полиэпитопных иммуногенов.

Вторая и третья части содержат данные по созданию и наработке рекомбинантных плазмид, кодирующих полиэпитопные иммуногены MEL-A0201 и MEL-TCI.

Четвертая часть посвящена изучению экспрессии полиэпитопных генов в клетках эукариот, трансфицированных сконструированными плазмидами. В ходе работы было продемонстрировано, что в эукариотических клетках, трансфицированных созданными ДНК-конструкциями, присутствует специфическая мРНК и синтезируются целевые белки. Пятая часть содержит обоснование и описание выбранной системы *ex vivo* на основе дендритных клеток человека, предназначенной для исследования способности сконструированных плазмидных ДНК, кодирующих полиэпитопные иммуногены MEL-A0201 и MEL-TCI, стимулировать иммунный ответ против клеток меланомы человека. Было показано, что созданные ДНК-конструкции обладают способностью стимулировать продукцию гранзима VCD8⁺ Т-лимфоцитами. Сконструированные плазмидные ДНК, кодирующие полиэпитопные иммуногены, также обладали способностью индуцировать цитотоксическую активность эффекторных лимфоцитов в отношении клеток меланомы человека линии Mel Is. Таким образом, сконструированные плазмиды pMEL-A0201,

pMEL-TCI и pcDNA-MART1 являются иммуногенными и способны индуцировать цитотоксическую активность эффекторных мононуклеарных клеток периферической крови.

Стоит отметить излишнюю лаконичность изложения раздела «Результаты и обсуждение» - раздел изложен на 28 страницах, из которых 10 страниц посвящены проектированию полиэпитопных иммуногенов, а значительную часть занимают рисунки и таблицы (в данном разделе 13 рисунков и 4 таблицы).

Замечания

Диссертация носит более технологический, чем исследовательский характер, хотя её вполне можно рассматривать как работу по проверке научной гипотезы о специфической иммуногенности сконструированных плазмид. В диссертации прослеживается ясная конструкторская логика, в работе получены все запланированные результаты, результаты достаточно хорошо иллюстрированы.

К недостаткам работы можно отнести ряд неудачных выражений, таких как «антиген был спроектирован в виде последовательности нативного белка» (стр. 9 автореферата), «низкий уровень окрашенных клеток» (стр. 14 автореферата) и ряд других. Остается неясным личный вклад автора в работу по дизайну иммуногенов – в автореферате (стр. 6) указано, что «дизайн проводился в сотрудничестве с Д.В. Антонцом», а в тексте диссертации (стр. 53) отмечено, что «дизайн был выполнен Д.В. Антонцом». Неубедительным выглядят иллюстрации иммунохимического окрашивания препаратов клеток НЕК 293Т, трансфицированных рекомбинантными плазмидами pMEL-A0201 и pMEL-TCI (стр. 14 автореферата). Диссертант объясняет небольшой процент окрашиваемых клеток быстрой деградацией целевых антигенов, однако этот тезис необходимо подкрепить дополнительно. Вызывает вопрос Рис. 10 (автореферат, стр. 18), где приведены данные по количеству CD8⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих гранзим В. Приведенные выводы о достоверном увеличении гранзим-положительных лимфоцитов в группе MEL-TCI не подтверждаются приведенным рисунком 10, возможно произошла путаница в представлении результатов.

Несмотря на высказанные замечания, в целом работа представляется крайне интересным и практически важным исследованием, выполнена с использованием современных методов молекулярной биологии, важнейшим позитивным моментом работы является проведение работы «полного цикла» - от теоретической разработки до проверки на клинических образцах с демонстрацией обнадеживающих для клиники результатов.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней

По своей актуальности, методическому уровню, ценности и новизне полученных результатов диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Боробова Елена Александровна, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент,

заведующий лабораторией

молекулярной генетики

ФГБНУ ФИЦ ФТМ,

подразделение

«НИИ экспериментальной и

клинической медицины»

Сергей Петрович Коваленко

Ученый секретарь

Федерального Исследовательского Центра

Фундаментальной и Трансляционной медицины

д.б.н.

Наталья Александровна Пальчикова

Личную подпись
Заверяю
Начальник отдела кадров
09 09 2019 г.

Коваленко С.П.
Пальчиковой Н.А.
Мещеряков

