

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»  
(ИЦиГ СО РАН)

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

\_\_\_\_\_ член-корр РАН А.В. Кочетов

«08» апреля 2019 г.

**ОТЗЫВ**

Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в качестве ведущей организации на диссертационную работу Боробовой Елены Александровны «Разработка и изучение свойств искусственных полиэпитопных антигенов меланомы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

**1. Актуальность избранной темы**

Актуальность разработки вакцин против онкологических заболеваний на сегодняшний день не вызывает сомнений. Данные мировой статистики свидетельствуют об устойчивой тенденции роста заболеваемости злокачественными новообразованиями. Особое внимание привлекает меланома, как наиболее опасный и агрессивный рак кожи. Меланома отличается стремительными темпами роста и высокой частотой формирования отдаленных метастазов. Низкая эффективность лечения меланомы с использованием классических методов требует применения новых нетрадиционных подходов. Характерной особенностью клеток меланомы является высокая иммуногенность, обусловленная наличием опухолевых антигенов на поверхности клетки. Такое свойство клеток меланомы может послужить основой при создании противораковых вакцин. На

сегодняшний день существуют многочисленные разработки, направленные на борьбу с клетками опухоли. Среди них перспективным и привлекательным является подход по созданию искусственных полиэпитопных иммуногенов, содержащих широкий спектр Т-клеточных эпитопы из различных раковых антигенов.

Диссертационная работа Боробовой Елены Александровны посвящена разработке и изучению свойств ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих искусственные полиэпитопные гены, включающие цитотоксические и хелперные эпитопы из шести основных антигенов меланомы. В работе приводится подробное описание дизайна полиэпитопных иммуногенов с оптимизацией структуры, процессинга и презентации целевых полиэпитопных антигенов. Оба иммуногена, «аллелеспецифический» и «универсальный», содержат сигнальные последовательности, которые обеспечивают максимально эффективный процессинг целевых антигенов в эукариотических клетках. Для оценки биологической активности созданных полиэпитопных иммуногенов была выбрана система на основе дендритных клеток человека, которая является наиболее оптимальной для изучения способности сконструированных полиэпитопных антигенов индуцировать иммунный ответ против клеток меланомы. Данный подход представляется перспективным для создания нового поколения вакцин против злокачественных опухолей. Актуальность работы не вызывает сомнений.

## **2. Связь работы с планами соответствующих отраслей наук и народного хозяйства**

Диссертационная работа Боробовой Е.А. выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы, проводимой в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

## **3. Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Научная новизна полученных автором результатов состоит в том, что в настоящей работе впервые были получены ДНК-конструкции, кодирующие полиэпитопные иммуногены MEL-A0201 и MEL-TCI, спроектированные с учетом особенностей процессинга и презентации Т-клеточных эпитопов по пути как МНС I, так и МНС II классов. Оригинальность работы заключается в том, что теоретический дизайн полиэпитопных иммуногенов выполнялся с использованием обновленного программного обеспечения, разработанного в теоретическом отделе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

В ходе работы были получены результаты, подтверждающие синтез целевых белков MEL-A0201 и MEL-TCI в эукариотических клетках, трансфицированных

исследуемыми плазмидными ДНК. Оценка иммуногенности созданных ДНК-конструкций осуществлялась *ex vivo*, с использованием мононуклеаров периферической крови условно-здоровых доноров. В результате была показана способность CD8<sup>+</sup> продуцировать гранзима В в совместной культуре с дендритными клетками, трансфицированными целевыми ДНК-конструкциями. При изучении цитотоксической активности стимулированных мононуклеарных клеток, использовались клетки меланомы человека линии Mells, на поверхности которых экспрессируется антиген MART1, эпитопы из которого включены в состав исследуемых иммуногенов. Таким образом в результате исследований впервые была продемонстрирована способность искусственных полиэпитопных иммуногенов индуцировать образование эффекторных лимфоцитов, обладающих киллерной активностью по отношению к опухолевым клеткам, в системе *ex vivo*. Плазмидные конструкции pMEL-TCI и pMEL-A0201, полученные в ходе выполнения работы, защищены патентами РФ.

#### **4. Значимость для науки и производства (практики) полученных автором диссертации результатов**

Теоретическая значимость заключается в том, что в результате проведенных исследований получены новые данные, расширяющие современные представления о создании ДНК-конструкций, предназначенных для иммунотерапии онкологических заболеваний.

Практическая значимость работы заключается в создании новых иммуногенов, способных индуцировать формирование репертуара эффекторных лимфоцитов, обладающих цитотоксическим потенциалом в отношении клеток меланомы человека. Подобраны условия культивирования мононуклеаров периферической крови человека и получения зрелых дендритных клеток в системе *ex vivo*.

#### **5. Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Полученные результаты имеют большое значение для совершенствования подходов моделирования вакцинных конструкций, кодирующих искусственные полиэпитопные антигены и предназначенных для иммунотерапии онкологических заболеваний. Данные настоящей работы дают основания для расширения исследований по созданию полиэпитопных иммуногенов, как средств иммунотерапии и иммунопрофилактики онкологических заболеваний в будущем.

Кроме того автором также проведена оптимизация протокола получения зрелых дендритных клеток человека в условиях *ex vivo*, результаты которой могут быть использованы специалистами иммунологического и молекулярно-биологического профиля при работе с культурами эукариотических клеток.

Результаты и выводы работы могут быть использованы научно-исследовательскими коллективами, занимающимися проблемами разработками вакцин против онкологических заболеваний, а также в высших учебных заведениях по специальностям «иммунология», «биоинженерия» и «молекулярная биология».

#### **6. Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений**

Достоверность полученных в работе результатов, обоснованность научных положений, выводов и заключений не вызывает сомнений и основывается на продуманном методическом и методологическом подходе к выполнению диссертационного исследования. Поставленная цель - конструирование плазмидных ДНК, содержащих синтетические гены, кодирующие множественные цитотоксические и хелперные эпитопы антигенов клеток меланомы, а также изучение способности разработанных конструкций индуцировать противоопухолевый иммунный ответ. Четко сформулированные задачи определяют дизайн и последовательность выполнения исследования. Работа проведена с использованием современных иммунологических, молекулярно-биологических и биохимических методов. Использовались корректные методы статистической обработки данных. Автором выполнен значительный объем исследовательской работы с постановкой независимых экспериментов и надлежащих контролей. Все это позволяет считать диссертационное исследование Бороховой Е.А. соответствующим всем требованиям, предъявляемым к проведению научных исследований. Выводы – аргументированы, материалы работы были представлены всероссийских и международных конференциях, а также опубликованы в журналах из списка ВАК Минобрнауки России.

#### **7. Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению**

Предъявленная диссертация носит целостный и завершенный характер, изложена на 132 страницах, состоит из введения, обзора литературы, с описанием материалов и методов исследования, заключения, выводов, списка использованных сокращений и библиографического указателя, включающего 191 источник, в том числе 185 – иностранных. Работа иллюстрирована 16 рисунками и 4 таблицами.

Во введении изложена актуальность темы и степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы, а также основные положения, выносимые на защиту, апробация работы и личное участие автора. В обзоре литературы приведены последние данные об особенностях противоопухолевого иммунного ответа; функциях клеток и молекул, принимающих участие в осуществлении противоопухолевого надзора; описаны уникальные свойства

опухолевых клеток, позволяющие им ускользать из-под иммунологического надзора; представлены и проанализированы современные стратегии создания терапевтических вакцин против онкологических заболеваний. В разделе «материалы и методы» приводится характеристика примененных автором материалов и методов исследования. В работе использовались методы компьютерного моделирования, молекулярного клонирования, секвенирования, выделения и очистки плазмидной ДНК, трансфекции клеток плазмидами, микроскопии, метод иммунохимического окрашивания клеток, работы с культурами эукариотических клеток, проточная цитофлуориметрия и Вестерн-анализ. Методы исследования описаны достаточно подробно, что свидетельствует о высоком уровне методической квалификации, необходимом для выполнения поставленных задач. Результатам собственных исследований посвящено 5 частей. В первой части описывается теоретический дизайн полиэпитопных иммуногенов, содержащих цитотоксические и хелперные эпитопы из 6 основных антигенов клеток меланомы, во второй – создание рекомбинантных плазмид, кодирующих полиэпитопные гены, в третьей – наработка препаративного количества рекомбинантных плазмид, в четвертой- результаты изучения экспрессии полиэпитопных генов в трансфицированных эукариотических клетках, в пятой – оценка иммуногенности созданных плазмидных ДНК и их способность стимулировать цитотоксическую активность мононуклеарных клеток периферической крови против клеток меланомы человека. В заключении обобщены результаты проведенных исследований и делается вывод об их фундаментальной и прикладной значимости. Выводы обоснованы данными экспериментальных исследований, логично сформулированы. Принципиальных замечаний по оформлению работы нет.

#### **8. Замечания по диссертации**

1. На поверхности клеток меланомы встречается большое разнообразие опухолевых антигенов. Почему в качестве положительного контроля использовалась плазида, кодирующая белок MART1. Почему был выбран именно этот антиген?

2. В научных публикациях разными авторами предлагаются другие протоколы и другие комбинации цитокинов для получения зрелых ДК из моноцитов периферической крови. Почему в своей работе вы использовали именно такой протокол.

3. В данной работе при оценке цитотоксической активности мононуклеаров периферической крови против клеток меланомы человека линии Mells вы использовали соотношение «мишень:эффектор» (1:10). В то время, как в литературных источниках приводятся примеры разных соотношений мишень:эффектор. Почему не проводилось исследование цитотоксической активности при разном соотношении «мишень:эффектор»?

4. Пробовали ли вы сравнивать иммуногенность ваших конструкций с иммуногенностью других ДНК-конструкций, оптимизированных по-другому?

5. По нашему мнению разработанные конструкции могут рассматриваться, как прототипы вакцины будущего, хотелось бы более четко услышать позицию соискателя о том, как он позиционирует свои конструкции?

6. Необходимо отметить, что для создания полноценной вакцины требуются масштабные эксперименты с добровольцами, однако, факт небольшого числа доноров, привлеченных в эксперимент, несколько не снижает значимости самой работы. Проведение более масштабных исследований потребует больших финансовых затрат. Данная работа показывает значимость и целесообразность дальнейших исследований, проводимых в этом направлении.

Вместе с тем, отмеченные недостатки не снижают общей теоретической и практической значимости диссертационного исследования.

#### **9. Соответствие автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат диссертации отражает ее основное содержание, включает все основные разделы, текст четко структурирован, результаты проведенных исследований хорошо проиллюстрированы.

#### **10. Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати**

По теме диссертации опубликовано 4 работы, из них 3 - в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень научных журналов и изданий для опубликований основных научных результатов диссертации ВАК Минобрнауки России. Получены два патента РФ. Материалы были также представлены на всероссийских и международных конференциях, по итогам которых опубликовано 11 тезисов. Публикации автора полностью отражают основные результаты проведенных исследований.

#### **11. Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней**

Диссертационная работа Боробовой Елены Александровны «Разработка и изучение свойств искусственных полиэпитопных антигенов меланомы», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи - по конструированию и изучению биологической активности ДНК-конструкций, кодирующих искусственные полиэпитопные антигены меланомы.

По актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов, работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание

ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени 03.01.03 – молекулярная биология.

Отзыв составил:

Заведующий лабораторией, ведущий научный сотрудник, доцент,  
Лаборатория компьютерной протеомики ИЦиГ СО РАН,  
Кандидат биологических наук

В.А. Иванисенко

Подпись к.б.н. В.А. Иванисенко удостоверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»,  
Кандидат биологических наук

Г.В. Орлова

Сведения о составителе отзыва

Иванисенко Владимир Александрович, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией Лаборатория компьютерной протеомики ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Адрес: 630090, Новосибирск, Россия, пр.ак.Лаврентьева,10

Телефон: +7(383) 363-49-80

E-mail: salix@bionet.nsc.ru