ОТЗЫВ

официального оппонента Локтева В.Б. на диссертационную работу Матвеева Андрея Леонидовича «Протективное химерное антитело против вируса клещевого энцефалита: получение и характеризация», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

Актуальность и новизна диссертационной работы связана с тем, что она направлена на разработку новых подходов для профилактики и лечения важнейшей вирусной инфекционной патологии человека. Вирус клещевого энцефалита был открыт группой советских ученых в 1937 году на Дальнем Востоке, как этиологический агент одноименного заболевания. ВКЭ принадлежит к группе вирусов комплекса клещевого энцефалита и вызывает у людей острое инфекционное заболевание, зачастую с тяжелейшими поражениями центральной нервной системы.

Принято считать, что существуют три основных генотипа вируса клещевого энцефалита: дальневосточный, европейский (западный) и сибирский. Тяжесть заболевания и уровень смертности сильно зависят от генотипа ВКЭ, так смертность составляет от 0,1–2 % для европейского и сибирского генотипа и может достигать 30 % – для дальневосточного генотипа. Наиболее широко распространён сибирский генотип, доминирующий в Сибири, Центральной Азии, на Урале и в

Европейской части Российской Федерации. В последние годы наблюдается очень существенный рост (более чем в 50 раз) заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом в северных регионах европейской части РФ и существенный рост заболеваемости в ряде западноевропейских стран.

Ежегодно, в России более 500 тысяч человек обращаются за оказанием медицинской помощи после укуса клеща. В данных случаях необходимо решать практические вопросы по диагностике клещевых инфекций, включая возможное инфицирование пациента вирусом клещевого энцефалита. Эта ситуация диктует необходимость проведения комплекса профилактических, и зачастую лечебных мер по предотвращению развития клещевого энцефалита и других клещевых инфекций у большой группы населения. При этом в официальную статистику попадают только пациенты, обратившиеся за медицинской помощью после укуса клеща. Видимо, количество реальных случаев контакта человека и клещей, инфицированных ВКЭ и другими клещевыми инфекциями, существенно больше. Именно это обуславливает актуальность, новизну и высокую практическую значимость диссертационной работы, которая направлена на разработку потенциального терапевтического препарата для экстренной профилактики и терапии клещевого энцефалита на основе химерных гуманизированных антител обладающих выраженным протективным и терапевтическим эффектом в отношении трех основных генотипов ВКЭ.

Диссертация Матвеева А.Л. написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы, главы с описанием полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы. Во введении четко определены актуальность проблемы, цели и задачи работы, научная новизна и практическая ценность полученных

результатов, а также положения, выносимые автором на защиту. Обзор написан подробно, ясно и логично. Раздел материалы и методы свидетельствует о том, что работа выполнена с использованием современных методов молекулярной биологии и не оставляет сомнений в достоверности полученных результатов и адекватности их анализа. Результаты собственных исследований и их обсуждение изложены в главе 3 разбитой на три подраздела. Результаты представлены четко и последовательно, хорошо иллюстрированы, что убеждает в полноте проведенного исследования и достоверности полученных результатов. Обсуждение результатов диссертационной работы проведено достаточно полно.

В процессе выполнения диссертационной работы автором были сформулированы и решались следующие основные задачи:

- Создание штамма эукариотических клеток, стабильно продуцирующих химерное антитело против ВКЭ.
- Получение препарата очищенного химерного антитела и оценка аффинности этого антитела.
- Определение эпитопной специфичности химерного антитела против ВКЭ.
- Исследование протективных свойств данного химерного антитела в отношении дальневосточного, сибирского и европейского субтипов ВКЭ в экспериментах на лабораторных животных.
- Проведение оценки возможности усиления вирусной инфекции in vivo при введении невысоких доз антитела.

В результате выполнения работы автору удалось создать оригинальный суспензионный штамм CHO-S/FRT, в геноме которого сайты гомологичной рекомбинации введены в транскрипционно активные участки хроматина. На основе штамма CHO-S/FRT и сконструированной кассетной плазмиды, несущей FRT-сайт и участки

для удобного встраивания иммуноглобулиновых генов, диссертантом разработан штамм-продуцент CHO-S/FRT-3E4-9, обеспечивающий стабильную продукцию химерного гуманизированного антитела chFVN145 против вируса клещевого энцефалита с продуктивностью до 320 мг/л. Полученные антитела chFVN145 имели константы связывания с рекомбинантным белком E вируса клещевого энцефалита, составившее $KD = (1,5 \pm 0.2)\times10^{-9}$ M.

С помощью рекомбинантных фрагментов белка E вируса клещевого энцефалита и комбинаторных пептидных библиотек показано, что антитело chFVN145 специфически взаимодействуют с N-концевым регионом домена D3 этого белка, и в связывании, по всей вероятности, участвуют аминокислотные остатки с 307 по 313 и с 333 по 338 находящиеся на поверхности белка E.

Исследование протективных свойств антитела chFVN145 на лабораторных животных показало выраженную протективную активность антител в отношении трех штаммов дальневосточного, сибирского и европейского субтипов ВКЭ. Протективная активность продемонстрирована при однократном введении антитела по схемам экстренной профилактики и терапии. Причем диссертант использовал заведомо высокие инфицирующие дозы ВКЭ, что только подчеркивает эффективность протективного действия антител. При введении небольших доз антитела chFVN145 животным через 1, 2 и 3 дня после заражения ВКЭ автор на обнаружил феномена усиления вирусной инфекционности.

К важнейшим достижениям диссертационной работы следует отнести:

- Создание стабильного штамма суспензионных клеток, продуцирующих химерное гуманизированное антитело chFVN145 против белка E ВКЭ.

- Установление факта, что антитело chFVN145 способно защищать лабораторных животных от заражения штаммами ВКЭ трех основных субтипов – европейского, сибирского и дальневосточного.
- Проведение оценки терапевтического потенциала антитела chFVN145, которое оказалось способно защищать лабораторный животных даже через 1, 2 и 3 дня после заражения животных при отсутствии признаков усиления вирусной инфекции.
- Картирование в N-концевом участке домена D3 белка E ВКЭ эпитопа, отвечающего за связывание с протективным антителом chFVN145.

Рассмотрение работы показывает, что диссертационная работа Матвеева Андрея Леонидовича является самостоятельным и оригинальным исследованием, посвященным крайне актуальной проблеме создания препаратов нового поколения на основе гуманизированных антител для лечения и профилактики клещевого энцефалита. Представленная работа не лишена определенных недостатков. К ним следует отнести:

- Не совсем согласен с выводом автора об отсутствии у антител chFVN145м при низких концентрациях феномена возможного усиления вирусной инфекционности. Вне всякого сомнения, полученные диссертантом результаты позволяют высказать данное предположение. Однако, одна из общепринятых гипотез связывает этот эффект с взаимодействием константных доменов антител с соответствующими им клеточными рецепторами чувствительных к вирусу клеток. В данном случае использование гетерологичной системы «человек-мышь» не полностью адекватно и требует

дополнительного подтверждения, например с использованием макрофагальных клеток человека для подобных экспериментов.

- Выбор доз ВКЭ при проведении экспериментов на животных. Диссертант использовал высокие дозы ВКЭ, хотя обычно рекомендуются использовать дозы в пределах 10-30 $ЛД_{50}$ на животное. Это особенно важно в экспериментах по усилению вирусной инфекционности.
- Не приведены данные статистической обработки в ряде таблиц и рисунков. Например: таблица 2 (стр. 84), таблица 3 (стр. 91), таблица 4 (стр. 93), рисунок 11 (стр. 94), рисунок 14 (стр. 97).
- Имеются небольшие редакционные замечания. Так, например опечатки или дефекты печати: стр. 5, стр. 12 автореферата (97 стр., диссертация), два варианта написания слова «суб-протективных» и «субпротективных», неудачные выражения «..целевых генов в геном» (стр. 41) и т.д. В целом, количество редакционных неточностей незначительно для текстов такого объема и сложности. Диссертация хорошо читается, написана профессионально и продуманно.

На мой взгляд, для достижения результатов диссертационной работы был использован адекватный набор молекулярно-генетических методов для разработки потенциально терапевтического препарата для экстренной профилактики и терапии клещевого энцефалита. Большой объем исследований связан с формированием панели штаммов на основе суспензионных эукариотических клеток и использованию их для создания штаммов-продуцентов различных полноразмерных гуманизированных антител. Это позволило автору успешно решить задачи диссертационной работы. Диссертация представляет законченное исследование, выполненное на современном методическом

и теоретическом уровнях. Выводы сформулированы корректно и соответствуют полученным результатам. Основные положения автореферата полноценно отражают материалы диссертационной работы.

Диссертационная работа выполнена в классическом стиле, она изложена на 150 страницах, содержит 20 рисунков и 4 таблицы. Список литературы состоит из 314 работ отечественных и зарубежных авторов.

Полученные результаты были успешно апробированы на 16 российских и международных конференциях. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

Заключение

Оценивая работу в целом, можно твердо сказать, что проведенные исследования принесли интересные научные результаты, их новизна и достоверность не вызывают сомнений. Представляется, что диссертационная работа закладывает фундаментальные основы для развития новых методов профилактики и лечения клещевого энцефалита, созданию перспективных препаратов против вируса клещевого энцефалита пригодных для профилактики и лечения этой инфекции у человека, т.к. в работе решена важная научная задача по созданию протективного гуманизированного антитела против ВКЭ и систем его получения на клетках СНО, что позволит создать принципиально новые препараты для профилактики и лечения клещевого энцефалита.

Обобщая вышесказанное, можно сказать, что, несмотря на некоторые замечания, которые носят дискуссионный и редакционный характер, большая научная и особенно практическая важность

диссертационной работы Матвеева А. Л. «Протективное химерное антитело против вируса клещевого энцефалита: получение и характеризация» дает все основания считать, что диссертация соответствует паспорту специальности 03.01.03 – молекулярной биология и полностью соответствует требованиям критериям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Диссертационная работа оформлена в соответствии с Приложениями № 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации, Матвеев Андрей Леонидович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Доктор биологический наук, профессор,
зав. отделом молекулярной вирусологии
флавивирусов и вирусных гепатитов,
ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора, В.Б. Локтев

Подпись д.б.н., профессора В.Б. Локтева заверяю:
Ученый секретарь ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора
канд. биол. наук, доцент О.А. Плясунова

630559, Новосибирская обл., п. Кольцово,
ФБУН Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора.
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Тел.: +7 (383) 3367400 доп.2453
E-mail: loktev@vector.nsc.ru