

**ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**  
члена-корреспондента РАН, доктора биологических наук, профессора,  
заведующего Лабораторией бионанотехнологии, микробиологии и  
вирусологии  
**Федерального государственного автономного образовательного  
учреждения высшего образования «Новосибирский национальный  
исследовательский государственный университет»**  
**Нетёсова Сергея Викторовича**  
на диссертационную работу Матвеева Андрея Леонидовича  
«Протективное химерное антитело против вириуса клещевого  
энцефалита: получение и характеристизация»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических  
наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

### **Актуальность темы исследования**

Клещевой энцефалит – это в большинстве случаев тяжелое вириусное заболевание человека, которое вызывается соответствующим флавивириусом. Данный возбудитель в качестве природного резервуара имеет мелких лесных грызунов и других лесных млекопитающих, но передается он человеку через укусы нескольких видов иксодовых клещей. В последние десятилетия ареал распространения этого вириуса по Европе постепенно расширялся и в настоящее время он охватывает практически все страны центральной Европы, южные части Норвегии, Швеции и Финляндии, восточные области Франции. Но наиболее часто это заболевание встречается в Австрии, Швейцарии, Германии и Чехии. Имеется три близкородственные разновидности этого вириуса: сибирский субтип, дальневосточный субтип, центрально-европейский субтип и, кроме того, в Великобритании встречается вириус шотландского энцефалита Люпин Илл, у которого геном тоже родственен этому вириусу. Тяжесть и процент смертельных исходов от заболеваний этим вириусами уже давно явились причинами разработки вакцин против этого заболевания, которые сейчас выпускаются в Австрии, Германии и России. К сожалению, специфических средств лечения этого заболевания пока не разработано, но зато показана эффективность применения человеческого высокотитражного гамма-глобулина в первые

двоє суток після укуса клешта. Однак, істочником сиров'я для виробництва такого гамма-глобулина є плазма високоіммунних донорів, які, відповідно, становлять все більше та дорожчим сиров'ям, а відповідно, ця плазма може бути заражена якими-небудь редкими чи поки невідомими патогенами патогенами. Тому вже давно велися розробки рекомбінантних гуманізованых антител, спрямованих на екстрену профілактику чи специфічне ліечение цього захворювання.

Робота Матвеєва А.Л. присвячена отриманню та дослідженням властивостей химерного антитела проти вірусу клещевого энцефалита, яке є дуже перспективним кандидатним препаратом для екстреної профілактики цього захворювання. Тема дослідження є актуальну, оскільки на сучасний день як в Росії, так і за межами країни відсутні препарати такого класу. Кількість заражень цим вірусом в світі та в Росії зростає, та потреба в такої категорії препаратів також зростає. Тому актуальність розробки таких препаратів очевидна.

### **Наукова новизна та практична значимість дослідження**

В процесі цієї роботи Матвеєвим А.Л. був вперше розроблено стабільний штамм суспензійних еукаріотических клеток, що продукують химерне антітело проти поверхневого білка Е вірусу клещевого энцефалита (ВКЭ), а також продемонстрировано, що химерне антітело chFVN145 здатне захищати модельних живих організмів від зараження штаммами ВКЭ трьох основних субтипов – Європейського, Сибірського та Дальневосточного. У частності, показано, що введення антітела chFVN145 через 1, 2 та 3 дні після зараження ВКЭ спасло життя більше 50% модельних живих – мишів. Крім того, введення суб-протективних доз цього широкопротективного химерного антітела зараженим живим не викликало поганянь інфекції, що переважно відрізняє цей препарат від препаратів гамма-глобулінів з плазми іммунізованых донорів. Наконець, вперше в N-концевому сегменті домена D3 білка Е ВКЭ

локализован эпитоп, отвечающий за связывание с широко-протективным антителом chFVN145, на базе которого и сконструирован этот кандидатный препарат.

В итоге полученное антитело с большой вероятностью может стать основой новых препаратов для экстренной профилактики и лечения заболевания, вызванного любым из субтипов ВКЭ. А в случае успеха такая методология может быть применена для экстренной профилактики и лечения других актуальных вирусных инфекций.

### **Значимость для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов**

Полученные Матвеевым А.Л. результаты имеют большое фундаментально-прикладное значение для снижения или даже элиминации последствий заражения человека ВКЭ и другими актуальными вирусными инфекциями.

В практическом плане в диссертационной работе Матвеева А.Л. разработана конкретная методология получения препаратов рекомбинантных антител, перспективных для промышленного выпуска реальных, научно-обоснованных лечебных препаратов.

### **Степень обоснованности научных положений и выводов**

Работа Матвеева А.Л. выполнена на высоком методическом уровне, использованы современные методы вирусологии, молекулярной и клеточной биологии, а в ряде конкретных деталей они еще и усовершенствованы. Результаты исследований получены с использованием современного оборудования, экспериментальные данные хорошо задокументированы и подвергнуты правильной статистической обработке. Достоверность данных не вызывает сомнений. Выводы обоснованы и напрямую вытекают из

полученных в ходе экспериментов результатов, соответствуют поставленным целям и задачам исследования.

Результаты диссертационной работы опубликованы в 4 статьях в высокорейтинговых журналах и доложены на семи зарубежных и российских конференциях.

## **Структура работы**

Структура диссертации традиционна. Диссертация содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы» из двух частей, «Материалы», «Методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список литературы». Работа изложена на 150 страницах текста и проиллюстрирована 20 рисунками и 4 таблицами. Список литературы насчитывает 314 источников.

Во «Введении» убедительно обоснована актуальность выбранной темы, четко определены задачи исследования, которые полностью отражают подходы для достижения поставленной цели. «Обзор литературы» состоит из двух частей. Первая часть включает описание таксономии, структуры вириона, жизненного цикла ВКЭ, переносчиков ВКЭ, его генетического разнообразия, патогенеза, а также методов профилактики и лечения вызываемого им заболевания. Вторая часть посвящена получению рекомбинантных гликопротеинов в клетках млекопитающих и содержит описание основных подходов к конструированию полноразмерных антител, описание особенностей наработки этих гликопротеинов, описание типов клеток млекопитающих, используемых для их наработки, и векторных плазмид, используемых для доставки генетического материала в клетки. Также сюда включено описание способов сайт-направленной интеграции целевых генов в клеточный геном, увеличения скорости пролиферации клеток, способов воздействия на секрецию и фолдинг рекомбинантных гликопротеинов и способов оптимизации состава ростовых сред и других параметров культивирования. Этот второй раздел является весьма ценным

для всех специалистов в области изучения flavивирусов, но особенно - для русскоговорящих исследователей и разработчиков в области синтетической биологии и достоин отдельной публикации в хорошем русскоязычном журнале.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробную информацию обо всех использованных реактивах. Приведена также вся необходимая информация об использованных в работе штаммах бактерий, вирусов, плазмидах, культурах клеток и лабораторных животных. Очень хорошо, что приведен подробный состав всех применяющихся буферных растворов и культуральных сред. Вся информация о примененных в работе олигонуклеотидах-праймерах приведена в отдельной таблице. Использованные в работе методы описаны подробно, демонстрируют высокий экспериментальный уровень представленной работы и адекватны поставленным задачам.

В главе «Результаты и обсуждение» Матвеев А.Л. на 37 страницах подробно описывает дизайн исследования, схемы экспериментов и их результаты. В Главе имеются разделы, посвященные созданию штамма-продуцента химерного антитела против ВКЭ на основе эукариотических клеток; оценка иммунохимических свойств антитела chFVN145 против ВКЭ и изучение протективных свойств этого антитела на модельных животных – мышах.

В результате автором получены и доказаны следующие результаты:

1. Сконструированный автором оригинальный суспензионный штамм CHO-S/FRT на основе культуры клеток яичников китайского хомячка, в которые нужные гены введены в транскрипционно активные участки хроматина, пригоден для создания на его основе штаммов-продуцентов полноразмерных антител.
2. Химерное антитело chFVN145 обладает высокой ( $1.5 \times 10^{-9}$  М) аффинностью к белку E ВКЭ.

3. В белке Е ВКЭ обнаружен новый эпитоп, включающий аминокислотные остатки 307-313 и 333–338, расположенные в D3-домене.
4. Химерное антитело chFVN145 способно защищать мышей от заражения ВКЭ Дальневосточного, Сибирского и Европейского субтипов.
5. Введение суб-протективных доз антитела chFVN145 не вызывало у зараженных ВКЭ мышей уменьшения средней продолжительности жизни по сравнению с контрольно зараженными мышами, которым не вводили антитело. Это означает, что при введении данного антитела не удается обнаружить антитело-опосредованное усиление инфекции ВКЭ при введении таких доз антител.

Далее представлены «Заключение» и «Выводы», сделанные в результате проведенной работы. Выводы, сделанные автором, хорошо аргументированы и соответствуют поставленным задачам. Два заключительных раздела – это Список сокращений и Список литературы.

#### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

1. Разработанный препарат и технология его наработки и выделения должны быть доведены до доклинических испытаний, а затем и до клинических испытаний, поскольку препарат является весьма перспективным для внедрения в производство и в медицинскую практику.
2. Вторая часть литературного обзора заслуживает опубликования в высокорейтинговом российском журнале.

## **Замечания и вопросы по содержанию работы**

1. Серьезные замечания к диссертационной работе отсутствуют, дальнейшие комментарии носят в основном рекомендательный характер;
2. Приведенная в диссертации таксономическая классификация рода устарела, и лучше сейчас ориентироваться на сайт [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus) .
3. Возможность антитело-опосредованного усиления инфекционного процесса изучалась только для штамма Абсеттаров. На других штаммах это может проявиться. Поэтому в будущем данное возможное последствие стоит изучить на более современных штаммах и штаммах других субтипов вируса и учесть при проведении доклинических и клинических испытаний.

## **Заключение**

В диссертационной работе были проведены работы по конструированию и разработке метода культивирования клеток-продуцентов химерно моноклонального антитела против ВКЭ, методов его выделения и очистки и определению его основных характеристик. Научная работа Матвеева А.Л. хорошо продумана, правильно и логично выстроена, написана хорошим и понятным слогом и заслуживает самой высокой оценки. Для выполнения поставленных задач был проделан большой объем работ с использованием самых современных методов. Результаты были доложены на семи международных и российских конференциях, представительно опубликованы в высокорейтинговых журналах.

Работа Матвеева А. Л. полностью соответствует требованиям пп. 2.1–2.5 «Положения о присуждении учёных степеней в ИХБФМ СО РАН», так как полученные в диссертации данные вносят существенный вклад в создание и изучение химерных антител, а ее автор, Матвеев Андрей Леонидович,

несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент,

Заведующий Лабораторией бионанотехнологии, микробиологии и вирусологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ),  
доктор биологических наук, профессор  
член-корреспондент РАН

С.В. Нетёсов

Подлинность подписи С.В. Нетёсова заверяю:

Ученый секретарь НГУ, к.х.н.

Е.А. Тарабан

03 декабря 2019 года



630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2. Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет». Тел (383) 363-43-33. <http://www.nsu.ru>

Нетёсов Сергей Викторович. Тел. (383) 363-4203; сот.: +7-913-910-0843.  
Эл. почта [svn15@hotmail.com](mailto:svn15@hotmail.com) и [netesov.s@nsu.ru](mailto:netesov.s@nsu.ru).