

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Матвеева Андрея Леонидовича «Протективное химерное антитело против вируса клещевого энцефалита: получение и характеристика», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

На сегодняшний день, как в мире, так и в Российской Федерации нет коммерчески доступного препарата, который может надежно предотвратить заболевание вирусным клещевым энцефалитом людей, инфицированных вирусом КЭ. Наиболее эффективным средством предотвращения этого тяжелого заболевания является профилактическая вакцинация населения в районах, эндемичных по вирусному энцефалиту, переносимому клещами. Однако даже среди наиболее сознательных и осведомленных групп населения есть те люди, которым вакцинация противопоказана по состоянию здоровья, либо по возрасту (в том числе, дети до 1 года). В связи с этим, ежегодно сотни граждан только по НСО обращаются в медицинские учреждения для проведения экстренной профилактики и терапии заболевания после укуса клещом. Для этих целей используется иммуноглобулин человека против вирусного клещевого энцефалита, получаемый из донорской крови, что сопряжено с определенными биологическими рисками.

В представленной диссертационной работе Матвеева А.Л. поставлена цель получения штамма-продуцента химерного антитела, обладающего протективной активностью в отношении трех основных субтипов ВКЭ, что определяет актуальность проведенного исследования. Кроме того, изучение особенностей взаимодействия вирусов с противовирусными антителами в масштабах живого организма совершенно необходимо для расширения фундаментальных представлений о защитных механизмах и побочных реакциях, как механизм усиления инфекционности вируса под действием специфических антител, что определяет научную значимость работы.

Представленная на отзыв диссертация построена по традиционному плану, и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов, их обсуждения, заключения и списка литературы. Работа изложена на 150 страницах, содержит 20 рисунков и 4 таблицы. Библиография включает 314 литературных источников. Во введении обосновывается актуальность исследования, формулируются цель и задачи исследования. Цель работы четко сформулирована, 5 задач соответствуют поставленной цели, все они успешно выполнены в ходе работы.

Обзор литературы состоит из 2-х основных разделов и заключения. Первый раздел дает представление об особенностях строения, жизненного цикла инфекционного агента (вируса клещевого энцефалита), его переносчиках (клещах рода Ixodes), путях заражения и патогенеза клещевого энцефалита, а также о современном состоянии терапии КЭ. Во втором разделе приводится подробная информация о методических подходах, которые используются сегодня для получения рекомбинантных гликопротеинов в клетках млекопитающих. Анализ процитированных публикаций позволяет автору сделать

обоснованный вывод о перспективности разработки терапевтического препарата на основе полноразмерных рекомбинантных антител, обладающих противовирусными свойствами в отношении ВКЭ. Наличие значительного количества ссылок на публикации, в том числе 3-х последних лет, говорит о тщательном изучении результатов исследований в данной области и об актуальности приведенной информации.

В главе, посвященной экспериментальной части, приведен значительный перечень разнообразных методов генетической инженерии, культивирования эукариотических клеток, выделения и очистки белков, иммунохимического анализа, анализа с использованием пептидного дисплея, работы с модельными животными, что говорит о высокой квалификации автора. Все методы являются современными и адекватными для решения поставленных задач, что определяет надежность и достоверность полученных результатов.

Результаты диссертационной работы отражены в главе «Результаты и обсуждение», состоящей из 3-х основных разделов. Выполненная Матвеевым А.Л. работа является продолжением исследований, проводившихся в Лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН с целью разработки потенциально терапевтического препарата для профилактики и лечения ВКЭ на основе вирус-нейтрализующего антитела. Основой для разработки химерного антитела было моноклональное антитело мыши, специфичное к основному иммуногенному гликопротеину Е вируса КЭ, полученное ранее. Для дальнейшего исследования и применения было создано химерное антитело, состоящее из константных доменов иммуноглобулинов человека и переменных доменов вируснейтрализующих мышиных антител. Автору пришлось приложить немало усилий для того, чтобы получить возможность наработки химерного антитела в количествах, достаточных для анализа его свойств и дальнейшего использования в модельной системе заражения животных ВКЭ. В результате проведенной работы был создан штамм эукариотических клеток на основе линии CHO, в геном которой встроены гены, кодирующие тяжелые и легкие цепи химерного антитела против ВКЭ. Автору удалось добиться интеграции генов антитела в транскрипционно активный участок генома штамма клеток CHO-S/FRT путем направленной гомологичной рекомбинации. Использовались различные подходы для повышения уровня экспрессии химерного белка с интегрированной в геном конструкции, в том числе, амплификацию целевых генов. В результате полученный штамм трансфицированных клеток обеспечил стабильно высокий уровень продукции белка (более 100 мг/л культуральной среды).

Наработанное в эукариотической культуре антитело chFVN145 было выделено, очищено в значительном количестве, что позволило изучить его свойства: аффинность взаимодействия с антигеном (гликопротеином Е вируса КЭ) и протективную активность в модели инфицирования мышей ВКЭ. Определение аффинности связывания антител с антигеном белком Е проведено методом поверхностного плазмонного резонанса на оптическом биосенсоре ProteOn XPR36 (Bio-Rad). Эпитопное картирование антитела chFVN145 проводили двумя независимыми методами – анализом взаимодействия антитела chFVN145 с укороченными рекомбинантными фрагментами гликопротеина Е ВКЭ и пептидным картированием с использованием комбинаторных фаговых библиотек

случайных пептидов. Применение двух независимых методик позволило с большой вероятностью картировать эпитоп, с которым взаимодействует созданное химерное антитело, с точностью до нескольких аминокислотных остатков домена D3.

Эксперименты по терапии зараженных вирусом животных в модели, имитирующей условия экстренной профилактики и терапии вирусного клещевого энцефалита, показали наличие протективных свойств у антитела chFVN145. Была также сделана оценка возможного антитело-зависимого усиления инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE). Такое усиление инфекции было недавно обнаружено в экспериментах *in vitro* на клетках, инфицированных вирусом денге, вирусом японского энцефалита, вирусом Западного Нила, вирусом долины Мюррей и ВКЭ. Введение суб-протективных количеств антитела chFVN145 не ухудшало состояние зараженных животных и не снижало среднюю продолжительность их жизни. Результаты работы имеют очевидную практическую значимость, поскольку на основе разработанного антитела можно в перспективе создать эффективный и безопасный лекарственный препарат для профилактики и лечения социально значимого заболевания.

Выводы диссертационной работы Матвеева А.Л. по теме «Протективное химерное антитело против вируса клещевого энцефалита: получение и характеристика» основаны на полученных результатах, автореферат диссертации соответствует ее содержанию.

По теме исследования опубликовано 4 статьи в журналах Перечня ВАК РФ, индексируемых результаты были представлены на отечественных и международных конференциях. Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертации и автореферата нет. Диссертационная работа в целом оставляет хорошее впечатление, содержит незначительное количество опечаток.

В ходе работы возникли дискуссионные вопросы

1. В экспериментах на мышах при заражении вирусом КЭ используются высокие, при этом различающиеся дозы вируса в различных экспериментах. С чем связана необходимость такого подхода?

2. Разработанное антитело является химерным, и несет переменные области, соответствующие антителам мышей. Каковы потенциальные риски, связанные с возможностью иммунного ответа на химерное антитело со стороны организма человека?

Заключение. Диссертационная работа Матвеева А.Л. по теме «Протективное химерное антитело против вируса клещевого энцефалита: получение и характеристика» является научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научно-практическая задача по созданию вирус-нейтрализующего химерного антитела, специфичного к основному иммуногенному белку Е вируса клещевого энцефалита, что имеет существенное значение для расширения фундаментальных знаний о механизмах противовирусной иммунной защиты, и для разработки эффективного терапевтического средства для лечения и профилактики социально значимого заболевания.

Таким образом, по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация Матвеева А.Л. отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.03 – молекулярная биология, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации, Матвеев Андрей Леонидович, без сомнения, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Доктор биологических наук,

ведущий научный сотрудник

лаб. молекулярной медицины ИХБФМ СО РАН

Е.Ю. Рыкова

Подпись д.б.н., в.н.с. Е.Ю. Рыковой заверяю:

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН

канд. хим. наук



П.Е. Пестряков

630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт химической биологии и фундаментальной медицины

Сибирского отделения Российской академии наук

ИХБФМ СО РАН, Тел.: +7 (383) 363-51-44

E-mail: rykova.elena.2014@gmail.com

9.12.2019