

ОТЗЫВ

официального оппонента о работе *Хлусевич Яны Александровны*
**«Группоспецифические вируснейтрализующие рекомбинантные антитела
против иммунодоминантного белка Р35 ортопоксвирусов: получение и
характеризация»**, представленной на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

В настоящее время после разработки вакцины против натуральной оспы и победы над этим заболеванием, а также последующей отмены оспопрививания встал вопрос о потенциальной угрозе для людей вирусов оспы животных, в частности, возбудителей оспы обезьян и оспы коров, вызывающих у людей оспоподобные заболевания. Поскольку вакцинация вирусом осповакцины не только формирует длительный иммунитет у вакцинированных людей, но может сопровождаться и рядом осложнений, поэтому, несомненно, важным является разработка специфических средств профилактики поствакцинальных осложнений. **Актуальность** работы Я.А. Хлусевич, посвященной отбору группоспецифических антител, нейтрализующих инфекционность патогенных для человека ортопоксвирусов, а также локализации эпитопа белка, взаимодействующего с этими антителами, не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Хлусевич Я.А. состоит из общепринятых разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы.

Во **Введении** описана актуальность проблемы, обоснованы и сформулированы цель и задачи настоящего исследования.

Обзор литературы посвящен анализу литературных данных (210 источников) как о структуре, морфогенезе, геноме и белках ортопоксвирусов, так и об эпитопном картировании вирусных белков и создании вакцин на основе эпитопов. Кроме того, детально проанализирована литература по фаговому дисплею как основному методу создания фаговых библиотек антител и пептидов.

Раздел **«Методы»** содержит детальное, четкое и воспроизводимое описание широкого спектра современных молекулярно-биологических и биохимических подходов, использованных в работе: фаговый дисплей, гибридные технологии, определение нуклеотидных последовательностей генов, исследование вируснейтрализующих свойств иммуноглобулинов, иммунизация мышей;

использованы методы: полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ, Вестерн-блот гибридизация, атомная силовая, лазерно-сканирующая и конфокальная микроскопии.

Глава «**Результаты**» представляет данные, полученные при последовательном решении поставленных задач. На первом этапе отобраны пять одноцепочечных антител человека против вируса экстремелии штамм K1, определены аминокислотные последовательности полученных антител, исследовано связывание антител с различными ортопоксвирусами. Показано, что антитела, отобранные против непатогенного для человека вируса экстремелии, нейтрализуют *in vitro* вирусную активность высокопатогенного вируса натуральной оспы, штамм Ind-3A. В следующем разделе главы изложены основные результаты работы по созданию рекомбинантных плазмидных ДНК для получения полноразмерных человеческих антител класса IgG1, нейтрализующих ортопоксвирусы. Получены линии эукариотических клеток, стабильно продуцирующих полноразмерные антитела человека, подавляющие инфекционность ортопоксвирусов *in vitro*. Идентифицирован белок-мишень для вируснейтрализующих антител – белок р35 ортопоксвирусов. Сконструированы плазмидные ДНК, на основе которых получена панель штаммов *E. coli*, продуцирующих укороченные варианты белка р35 ортопоксвирусов. Далее представлены результаты по локализации нового вируснейтрализующего эпитопа белка р35 ортопоксвирусов с использованием созданных укороченных белков, а также методом пептидного дисплея. Определена нуклеотидная последовательность, кодирующая белок р35 вируса экстремелии штамм K1. Показано, что один из сконструированных рекомбинантных белков р35Δ12 при иммунизации мышей индуцировал у них образование антител, которые узнают клетки, зараженные вирусом осповакцины, и нейтрализуют их инфекционность *in vitro*, продемонстрировав высокую иммуногенность белка р35Δ12.

В главе «**Обсуждение**» представлено обоснование и правомерность используемых методов и подходов, в первую очередь фагового дисплея, для получения рекомбинантных полноразмерных человеческих антиортопоксвирусных антител: использование библиотеки фаговых антител, сконструированной на основе РНК периферических лимфоцитов добровольцев, иммунизированных вирусом осповакцины для получения репертуара специфических к ортопоксвирусам антител, применение вируса экстремелии для биопэннинга. Далее детально обсуждены 1) отбор нескольких группоспецифических нейтрализующих вирус натуральной оспы антител, которые взаимодействовали с

белком р35 ортопоксвирусов; 2) биологическая роль и топография белка р35. Обоснован выбор двух методов для идентификации вируснейтрализующего эпитопа белка р35: конструирование рекомбинантных ортопоксвирусных белков р35, укороченных с N- и С-концов, и применение пептидного фагового дисплея. И, наконец, в **Заключении** автор кратко суммирует все полученные в настоящей работе оригинальные результаты.

Интерпретация экспериментальных результатов, предложенная автором, аргументирована.

В рамках общих требований к оформлению диссертации приятно отметить, что диссертация написана логично, хорошим русским языком с небольшим количеством опечаток, ошибок и неудачных выражений. В качестве замечания следует отметить отсутствие в главе «Обсуждение» сравнения иммунохимических и противовирусных свойств сконструированных в представленной работе антител с другими антителами против ортопоксвирусов.

Сделанные замечания не носят принципиального характера, не умаляют достоинств работы и не влияют на основные выводы, которые обоснованы и не вызывают сомнения.

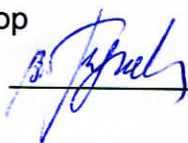
Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованным автором работ по исследуемой проблеме.

Представленная к защите работа Хлусевич Я.А. является научно-квалификационной работой, выполненной на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях, в которой решена задача выбора группоспецифических антител, нейтрализующих инфекционность патогенных для человека ортопоксвирусов, и идентификации эпитопа, взаимодействующего с этими антителами. Решение этой задачи имеет большое значение для создания вакцины нового поколения против ортопоксвирусов.

Таким образом, по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация 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,

Яна Александровна Хлусевич, безусловно, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Главный научный сотрудник
лаборатории ферментов репарации
Института химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН,
доктор биологических наук, профессор



Бунева Валентина Николаевна

Новосибирск, ул. Ильича, д. 1, кв. 54
тел. сл.+7-383-363-51-27 buneva@niboch.nsc.ru

Подпись Буневой В.Н. заверяю.

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН



/к.х.н. Пестряков П.Е./

02 декабря 2019 г.