

УТВЕРЖДАЮ:

Директор Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
(ФБУН ГНЦ ПМБ) Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
академик РАН, д.м.н., профессор,

И.А. Дятлов

2025 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о научно-практической ценности диссертационной работы Деркаева Артема Алексеевича на тему: «**ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА СПЕЦИФИЧНЫЕ К ТОКСИНУ С.BOTULINUM И ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ТЕРАПИИ БОТУЛИЗМА**», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. – Иммунология

Актуальность темы выполненной работы

Ботулинический нейротоксин типа А является одним из самых сильных биологических токсинов, вызывающих тяжёлое и потенциально смертельное заболевание — ботулизм. Это обуславливает необходимость разработки средств, способных быстро и эффективно нейтрализовать токсин в организме.

При подозрении на ботулизм для нейтрализации ботулинического токсина применяют ботулинический антитоксин, представляющий собой лошадиную сыворотку, содержащую антитела к токсинам типов А, В и Е, а при точном определении типа токсина – моновалентный антитоксин соответствующего типа. Однако применение лошадиной антитоксической сыворотки вызывает гиперчувствительность и сывороточную болезнь в 9–17%, а анафилаксию - в 1,9% случаев, а также множество других побочных эффектов, связанных с использованием препарата.

Моноклональные антитела, обладающие высокой специфичностью и способностью связывать ботулотоксин, блокируя его проникновение в клетки и нейтрализуя токсическое действие - рассматриваются как инновационное средство для терапии и экстренной профилактики ботулизма. Разработка и применение антитоксических моноклональных антител позволит существенно улучшить исходы лечения и снизить побочные эффекты, связанные с использованием гетерологичных антитоксических сывороток. По сравнению с традиционными антитоксинами на основе лошадиной сыворотки, моноклональные антитела характеризуются более высокой селективностью, меньшим риском аллергических реакций и улучшенной фармакокинетикой.

Актуальность разработки препаратов, нейтрализующих ботулотоксин, определяется высокой токсичностью возбудителя, а также необходимостью своевременного и эффективного лечения и профилактики ботулизма. Однодоменные антитела характеризуются высокой специфичностью и аффинностью к мишениям, а их модификация Fc-фрагментом IgG1 человека позволяет значительно увеличить период полужизни препарата в крови, улучшить его фармакокинетические свойства.

Диссертационная работа Деркаева Артема Алексеевича посвящена разработке продуцента и характеристике однодоменного антитела, модифицированного Fc-фрагментом IgG1 человека, нейтрализующего ботулотоксин. Данное исследование открывает перспективы создания новых биофармацевтических средств с повышенной терапевтической

эффективностью для лечения ботулизма, а также для экстренной профилактики лиц, подвергшихся риску заражения, что особенно актуально в условиях угроз биотerrorизма и спорадических случаев заболевания.

Научная и практическая ценность диссертации

В качестве научной новизны диссертационной работы автор приводит создание генетической конструкции, кодирующей модифицированное однодоменное антитело, способное нейтрализовать ботулинический нейротоксин типа А. Получение данного антитела, модифицированного Fc-фрагментом IgG1 человека, осуществлено методом культивирования клеточной линии-продуцента с последующей технологией трехступенчатой хроматографической очистки.

Впервые была разработана внутрижелудочная модель интоксикации мышей ботулиническим нейротоксином типа А, обеспечивающая длительное и воспроизводимое развитие клинических проявлений ботулизма. Автором было продемонстрировано, что полученное модифицированное однодоменное антитело эффективно защищает животных от летальной интоксикации ботулиническим нейротоксином типа А при применении в режимах терапии, экстренной и краткосрочной профилактики. Получены новые данные, свидетельствующие о безопасности молекул антител с неканоническим строением, что расширяет понимание их потенциальной клинической применимости.

Практическая значимость исследования обусловлена созданием прототипа препарата для лечения и экстренной профилактики ботулизма, вызванного ботулиническим токсином типа А, а также разработкой биотехнологической платформы его получения и проведением доклинических исследований, подтверждающих эффективность и безопасность препарата. Практическая ценность результатов подкреплена патентом РФ RU 2766348 C1 от 29.07.2021, а на базе полученных данных реализованы исследования, защищённые патентом РФ RU 2768044 C1 от 28.12.2021.

Разработан метод количественного определения моноклональных и однодоменных антител в культуральной жидкости трансфенированных эукариотических клеток с использованием биослойной интерферометрии. Этот метод внедрён в практику ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, что подтверждается официальным актом. Кроме того, основные научные положения, выводы и рекомендации исследования вошли в учебный курс аспирантуры данного учреждения и также подтверждены актом о внедрении.

Значимость полученных соискателем результатов для развития соответствующей отрасли науки

Полученные результаты вносят вклад в развитие теоретических и практических основ иммунологии, способствуют развитию методов пассивной иммунизации и пониманию механизмов нейтрализации ботулотоксина на молекулярном уровне. В результате выполнения диссертационной работы расширились концептуальные представления в области разработки инновационных методов терапии и профилактики ботулизма. Используемая в диссертационной работе методология получения препарата помогает продвигать биоинженерные технологии в иммунологии, создавая прочную базу для разработки инновационных лекарственных препаратов на основе однодоменных антител, что соответствует современным тенденциям иммунобиотехнологии и трансляционной медицины.

Достоверность и аprobация результатов исследования

В работе были использованы современные иммунологические, биотехнологические, молекулярно-биологические, бактериологические, биоинформационные методы, а также методы работы с лабораторными животными. Полученные результаты исследования представлены в репрезентативном объеме проанализированных данных и статистическом анализе их достоверности. Результаты проведенных исследований доложены на различных научно-практических мероприятиях. Таким образом

достоверность полученных результатов и научных положений, выносимых на защиту, не вызывает сомнений.

По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК и/или индексируемых в системах Web of Science, Scopus, 2 тезиса докладов в сборниках материалов российских и международных конференций, получены 2 патента РФ на изобретение.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 3.2.7. Иммунология, в частности пунктам 6 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных, аллергических и других иммунопатологических процессов» и 7 «Исследование эффективности и безопасности этих воздействий».

Личный вклад автора

Автор самостоятельно выполнил комплекс работ по созданию и изучению модифицированного однодоменного антитела B11-Fc против ботулинического токсина типа А. А именно: создание генетической конструкции и стабильной клеточной линии, проверку ее стабильности, организацию банков клеток, оптимизацию культивирования и очистки (аффинная и анионообменная хроматография). Препарат был охарактеризован по чистоте, активности, аффинности к Fc-рецепторам и способности активировать комплемент. Эффективность антитела была доказана в экспериментах на мышах с различными путями интоксикации ботулиническим нейротоксином типа А, в результате чего были подобраны протективные дозы и оценена защита в разных условиях.

Отдельные этапы работы были выполнены совместно с коллегами, а именно: получение токсина, разработка технологии, масштабирование и доклинические исследования безопасности.

Содержание и оформление диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 183 страницах машинописного текста и включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных 14 обозначений и список используемой литературы (225 источников: 10 – отечественных и 215 – иностранных публикаций). Работа содержит 22 таблицы и 41 рисунок.

Обзор литературы представляет собой развернутый, квалифицированный, достаточно полный анализ публикаций, дающих представление о получении, характеристиках и фармакокинетике моноклональных антител. Представлен информативный обзор моноклональных антител для терапии ботулизма, а также описана роль Fc-фрагмента в эффективной нейтрализации.

В главе «Материалы и методы исследования» дана информация об объектах исследования, приведены сведения о нормативно-технических, нормативно-методических и других документах (методических указаниях, руководствах), согласно которым проводились исследования, данные об использованных наборах реагентов, программного обеспечения. Приведена информация о методах математической и статистической обработки результатов.

Результаты собственных исследований представлены подробно в четырех подглавах. Первая часть посвящена описанию этапов создания прототипа препарата на основе модифицированного однодоменного антитела B11-Fc для экстренной профилактики и терапии ботулизма, вызванного ботулотоксином типа А. Описаны получение клеточной линии СНО, стабильно продуцирующей антитело B11-Fc, технологии культивирования и очистки антитела B11-Fc и характеристики очищенного препарата B11-Fc.

Следующая подглава собственных исследований «Изучение физико-химических и иммунологических характеристик антитела B11-Fc»

посвящена исследованиям чистоты препарата B11-Fc, определению гликанового профиля, измерению эффекторной активности B11-Fc.

В подглавах 3.3 и 3.4 приведены результаты доклинических исследований эффективности, фармакокинетики и безопасности модифицированного однодоменного антитела B11-Fc. Результаты доклинических исследований свидетельствуют о терапевтической эффективности и безопасности препарата на основе модифицированного однодоменного антитела B11-Fc.

Анализ и обсуждение полученных результатов проведенного исследования приведены в разделе «Заключение», в котором обобщены и детально проанализированы полученные данные.

Выводы, представленные автором, отражают результаты собственного исследования и соответствуют поставленным перед исследованием задачам.

Автореферат оформлен в соответствии с ГОСТ Р 7.0.11-2011 и полностью отражает содержание диссертационной работы.

Тема диссертации, основные положения и выводы, сформулированные автором, полностью соответствуют специальности 3.2.7. – Иммунология.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы указанием научных коллективов, которым следует продолжить и развить соответствующие исследования).

Рекомендуется использовать полученные результаты и выводы диссертационной работы для дальнейшего развития и внедрения в практическую медицину и иммунобиотехнологическое производство, а именно:

1. Провести клинические испытания однодоменных антител с улучшенной фармакокинетикой для терапии и экстренной профилактики ботулизма.

2. Развивать междисциплинарные исследования, связывающие иммунологию, биоинженерию и фармакологию для совершенствования и создания препаратов с более широким спектром действия, включая

нейтрализацию ботулотоксинов В, Е, вызванные заболевания которыми также регистрируются на территории РФ.

Основные вопросы и замечания по рассматриваемой работе

По материалам диссертации имеются незначительные замечания:

1. В названии работы стоит исправить обозначение «*C. Botulinum*» на корректное и полное научное наименование бактерии, чтобы соответствовать принятым стандартам оформления.
2. На стр16 указано, что «Существует 6 форм ботулизма в зависимости от пути интоксикации», а перечислено 5 форм: «пищевой, раневой, младенческий, ингаляционный, а также кишечная колонизация у взрослых».
3. Эпидемиологические данные по заболеваемости ботулизмом, представленные на странице 16, охватывают период только до 2018 года. Эти сведения обладают низкой степенью актуальности (более 7 лет).
4. На странице 18 приводится неполная классификация ботулинических нейротоксинов, ограничивающаяся семью известными серотипами (A–G). В данном обзоре отсутствует упоминание о недавно идентифицированном варианте, серотипе X, который, несмотря на аналогичный механизм действия (ингибиование SNARE-комплекса), представляет собой важный объект для актуального эпидемиологического и токсикологического анализа.
5. Утверждение о том, что номенклатура для химерных моноклональных антител заканчивается суффиксом «ксимаб» (-ximab) на стр 35, является исторически верным, но не является актуальным для новых препаратов в 2025 году. ВОЗ и USAN (United States Adopted Names) отказались от использования суффиксов, указывающих на происхождение антитела (таких как -ximab — химерные, -zumab — гуманизированные, -umab — человеческие). С декабря 2021 г. введена новая номенклатура международных непатентованных наименований, в которой префикс уникален для каждого препарата, значимая часть слова указывает на его мишень (например, опухоль или цитокин), а

суффикс классифицирует антитело по его структурной сложности, типу инженеринга и специфичности (моно- или мультиспецифическое).

6. На странице 149 обнаружено грамматическое дублирование в описании метода очистки: "при помощи аффинной хроматографии на на сорбенте Protein A (Белок A) sepharose"

7. На странице 107, в подписи к Рисунку 14 ("Динамика изменения концентрации антитела B11-Fc, экспрессируемого клоном B7, в течение 60 пассажей"), отсутствует ключевая информация о нумерации или идентификации конкретного пассажа, к которому относятся представленные данные.

По материалам диссертации имеются вопросы:

1. В представленной методологии указано, что очищенный ботулинический токсин не подвергался процедуре стабилизации, а определение летальной дозы (LD 50) проводилось непосредственно перед каждым экспериментом. Учитывая общепризнанную низкую стабильность нативного нейротоксина в растворе, а также потенциальную кинетику деградации активности в течение периода, необходимого для определения LD 50 (несколько дней), требуется дополнительное обоснование. Какими мерами контроля или подтверждающими исследованиями вы обосновываете сохранение постоянной удельной активности препарата на протяжении всего цикла экспериментальной работы?

2. При исследовании генетической стабильности клона-продуцента моноклонального антитела выводы основывались на анализе объемной продуктивности антитела. Изменение концентрации антитела оценивали в динамике, что затрудняет точный подсчет количества антител при достижении одинаковой плотности клеток-продуцентов. Почему не был проведен анализ удельной продуктивности, отражающей истинную метаболическую эффективность клеточного клона?

3. В настоящей диссертации продемонстрировано, что антитело B11-Fc обладает высокой аффинностью связывания с различными классами

человеческих Fc-рецепторов, включая FcRn, CD16a, CD16b, CD32a, CD32b и γ RI. Однако детальный анализ и обсуждение этих результатов отсутствуют. Между тем, в научной литературе широко признано, что для антитоксических моноклональных антител предпочтительно характеризоваться профилем effector-null, то есть минимальной или отсутствующей эффекторной активностью. Считаете ли вы необходимым снижение аффинности антитела B11-Fc к Fc-рецепторам (за исключением неонатального)?

4. Какие формулирующие компоненты были применены для предотвращения агрегации и денатурации моноклонального антитела, и каково их количественное содержание в составе для гарантированного сохранения нативной конформации и терапевтической эффективности препарата?

Замечания не уменьшают значимость проведенного исследования. Диссертационная работа базируется на обширном массиве экспериментальных данных и применении широкого спектра современных методов исследования. Проведенные доклинические исследования обеспечивают высокую степень надежности и валидности полученных результатов.

Заключение

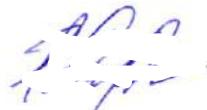
Таким образом, диссертация Деркаева Артема Алексеевича на тему: «ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИЕЛА СПЕЦИФИЧНЫЕ К ТОКСИНУ С.BOTULINUM И ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ТЕРАПИИ БОТУЛИЗМА», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. – Иммунология, является научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение актуальной научной задачи - создание препарата для терапии и экстренной профилактики ботулизма, имеющей существенное значение для иммунологии в области изучения нейтрализующей активности антител, в

работе изложены научно обоснованные технологические решения и разработки препарата, имеющие существенное значение для биотехнологического развития страны, что соответствует критериям, установленным п. 9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. №842 (со всеми последующими редакциями Постановлений Правительства РФ), а ее автор Деркаев Артем Алексеевич заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология (биологические науки).

Отзыв обсужден и одобрен на заседании Ученого Совета ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора (протокол № 7 от 23.10. 2025 г.).

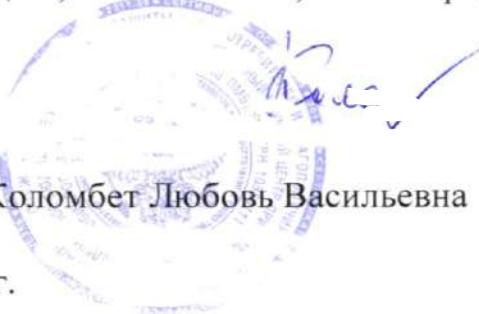
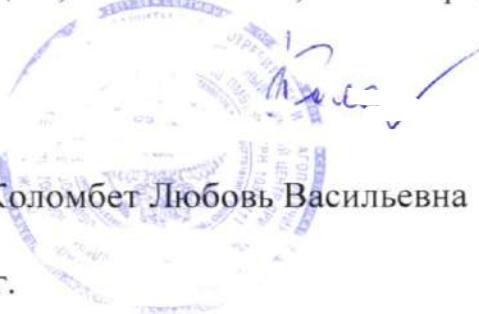
Главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора
Территория «Квартал А», д.24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279
тел. (4967) 36-00-03
Email: info@obolensk.org

доктор биологических наук,
Фирстова Виктория Валерьевна



Подпись Фирстовой В.В. заверяю:

Ученый секретарь ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора
Территория «Квартал А», д.24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279
тел. (4967) 36-00-69
Email: info@obolensk.org



доктор биологических наук Коломбет Любовь Васильевна

«28» октября 2025 г.