

Отзыв

официального оппонента доктора биологических наук Бровко Федора Александровича на диссертацию Деркаева Артема Алексеевича на тему: «Однодоменные антитела специфичные к токсину *C. botulinum* и изучение возможности их применения для терапии ботулизма», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология (биологические науки).

Актуальность темы исследования

Ботулизм – заболевание, вызываемое белковыми токсинами, продуцируемыми микроорганизмами *Clostridium botulinum* и характеризующееся высоким уровнем летальности. Различают два основных типа заболевания: ботулизм, связанный с пищевыми отравлениями, когда люди употребляют в пищу не качественные продукты, содержащие один из видов ботулотоксина. Вторым вариантом заболевания является ботулизм инфантов, которым болеют незначительное количество детей раннего возраста. При младенческом ботулизме, желудочно-кишечный тракт колонизирует вегетативная форма бактерии, продуцирующая токсин, который, также как и при пищевом отравлении, преодолевает барьерные системы и попадает в кровоток. При обоих типах заболевания, необходимо нейтрализовать токсин в кровотоке. В случае ботулизма пищевых отравлений это достигается путем однократного введения токсин-нейтрализующих антител. А при ботулизме инфантов, учитывая, что токсин может поступать в течение продолжительного времени, необходимо многократное введение. Поэтому актуальным является вопрос какие антитела использовать. Конечно, наиболее предпочтительным является использование полностью человеческих антител. При этом важно время нахождения антител в кровотоке. Используемые во многих странах мира Fab фрагменты антител животных имеют низкую стоимость, технология производства проста, но имеют важные недостатки: короткое время жизни в кровотоке, высокая иммуногенность для человека и невозможность повторных введений препарата. Для лечения ботулизма инфантов используются полноразмерные

антитела иммунизированных доноров, они выделяются из сыворотки иммунных доноров, их очень мало и требуется сертификация каждой новой партии антител. Получение антител с невысокой иммуногенностью и продолжительным временем жизни в кровотоке является актуальной задачей. На решение этой задачи и направлена настоящая работа.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В результате проведенных автором исследований получены результаты, несомненно, представляющие научный интерес для специалистов, занимающихся конструированием рекомбинантных антител и экспрессией антител в клетках животных. Выводы автора получены в результате проведенных им экспериментов, обоснованы, не вызывают сомнения.

Научная новизна исследования

Автором проведена новая и интересная работа по получению рекомбинантных антител к наиболее опасному ботулиническому нейротоксину А, летальность которого для людей составляет около ~ 1 нг/кг при пероральном введении. Антитела – это класс белковых молекул с возможностью синтеза в организме человека 10^{18} вариантов. Создание новых конструкторов белковых молекул на основе антител это в каждом случае новое исследование. Это же касается и подбора условий экспрессии и выделения препаратов антител. Автор провел ряд этапов доклинических исследований, которые проведены в соответствии Российскими и международными требованиями для исследования такого типа терапевтических соединений. Это трудоемкая и скрупулезная работа, требующая знаний и терпения.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Несмотря на то, что около трети рынка биотехнологических препаратов представлено рекомбинантными антителами и молекулами на их основе, получение антител и тем более разработка технологии продукции является важной научной задачей со многими неизвестными. Рассматриваемая работа,

включая используемые разработки и методики, имеет высокое научное значение, и полученные при ее выполнении знания могут быть основой для разработки новых продуктов. Учитывая вышеперечисленные особенности и недостатки антиботулинических препаратов на основе антител животных есть высокая вероятность использования разработанного препарата в клинической практике.

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Диссертация, выполненная Деркаевым Артемом Алексеевичем, соответствует пунктам 6 и 7 паспорта научной специальности 3.2.7. Иммунология.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

Материалы диссертации полно представлены в печати. По материалам диссертационной работы опубликовано три статьи в высокорейтинговых международных рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК для публикации к защите. В двух статьях Деркаев А. является первым автором. Так же по теме диссертации получены два патента Российской Федерации, что важно, учитывая предполагаемое создание на базе разработки терапевтического препарата. Материалы диссертации докладывались автором диссертации на научных конференциях.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа построена по классическому принципу и включает разделы введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований и обсуждение полученных результатов, а также выводы. Список литературы включает 225 источников, 10 опубликованы в отечественных научных журналах и 215 в международных научных журналах. Работа включает 182 страницы, содержит 41 рисунков и 22 таблицы.

Во введении описывается: актуальность темы и степень ее разработанности; цель работы – получение однодоменного антитела, модифицированного Fc-фрагментом IgG1 человека, нейтрализующего ботулинический нейротоксин типа А, и изучение возможности его применения для терапии и экстренной профилактики ботулизма. Описываются успехи во внедрении полученных результатов в практику. Коротко описывается методология и научные подходы к проведению исследования. Раздел «Положения, выносимые на защиту» описывает основные этапы работы и оценку их значимости. Раздел степень достоверности описывает приемы статистической обработки результатов исследования. Разделы апробация и публикации описывают в каких журналах и научных собраниях докладывалась работа и публиковались результаты исследования по теме диссертации.

Раздел «Обзор литературы» описывает распространенность заболеваний, вызываемых ботулиническими токсинами, структуру и функциональное значение частей молекулы токсина. Значительное внимание автор уделил важности избранного подхода к терапии заболеваний вызываемых ботулиническим токсином А. Подробно описывается значение однодоменных антител и их преимущества при конструировании рекомбинантных антител. Обзор представляет интерес, но и содержит ряд спорных заключений. Так на странице 44 приводится описание «Одним из существенных недостатков scFv является их происхождение от грызунов, поскольку их получение осуществляется гибридным методом». Это не корректно, так как в настоящее время основная часть антител получается при использовании библиотек антител человека в формате фагового дисплея. Использование мышиных моноклональных антител предпочтительно при получении рекомбинантных антител к антигенам, имеющим сродство с антигенами *E. coli*.

В главе 2 отражены материалы и методы исследования, использованные в диссертационной работе. Автор подробно описывает использованные в

работе материалы, описывает животных и работу с ними с учетом требований и правил гуманного обращения с животными. Подробно рассматриваются клеточные линии, использованные для создания продуцентов рекомбинантных антител. Описываются метод клонирования и создания панели рекомбинантных антител.

Подробно описан набор оборудования, использованного на этапах работы.

Автор хорошо описал аналитические и препаративные методы, использованные в работе. Приведенные методики являются вариантами хорошо зарекомендовавших себя и достоверных методов. Есть некорректное название, влияющее на смысл используемых методов. Так в разделе 2.4.8 и 2.4.9 автор определяет не чистоту антител, как им указано в названии, а наличие в препарате антител мономерной и олигомерных форм антител. В дальнейшем тексте автор это и обсуждает.

В разделе 2.4.12 Исследование пирогенности антитела, автор определяет наличие в препарате примесей бактериальных эндотоксинов, а не пирогенность. Для оценки пирогенности используется другой набор методов, включая контроль за изменениями температуры животных при введении терапевтических препаратов.

Бошое внимание автор уделил фармакокинетическим свойствам антител и влиянии антител на жизненно важные системы животных.

В главе «Результаты собственных исследований» автор поэтапно рассматривает выполнение работы, начиная с получения рекомбинантных антител на основе однодоменных антител альпака к ботулиническому нейротоксину А.

Важным моментом работы является оптимизация продукции антител и получение максимального выхода с единицы культуры. Из таблицы 16 следует, что эксперимент прекращался при повышении показателя гибели

клеток, но в это же время прирост продукции был наибольшим. Почему автор не продолжил работу культивирования клеток продуцентов и наращивания антител в режиме непрерывного культивирования?

Интересные результаты получены автором при разработке метода выделения антител и анализе их мономерности. Для анализа чистоты препаратов использовали метод электрофоретического анализа. Существует большое количество вариантов методов электрофоретического анализа белков какой из них использовал автор, кроме того, что это метод вертикальный не видно.

Значительное внимание в работе уделено изучению гликозилирования антител. Было показано отсутствие высоко галактозилированных форм гликанов, которые потенциально могут повышать иммуногенность препарата.

На время жизни антител в кровотоке и проникновение в ткани организма влияют много факторов и пожалуй наиболее важным – это способность антител взаимодействовать с рецепторами антител. Автор уделил этому значительное внимание, детально проанализировал константы взаимодействия антител с основными вариантами Fc-рецепторов антител человека. Одним из элементов удаления иммунных комплексов является распознавание их системой комплимента. Показано, что изучаемые автором антитела в широком диапазоне концентраций взаимодействуют с фактором C1q, этот факт позволяет предположить, что система комплимента будет и в организме распознавать и удалять иммунные комплексы, образуемые данным антителом с ботулотоксином А.

Подробно изложена работа по функциональному исследованию антител. Автор использовал две модели действия токсина на организм животного. Такой подход позволят достоверно оценить токсин-нейтрализующую способность антител. Использование в качестве положительного контроля сертифицированных и применяемых для

нейтрализации токсина антител подчеркивает правильность выбранной методологии и высокое качество разрабатываемого препарата.

Результаты фармакокинетического анализа демонстрируют, что даже на шестые сутки в кровотоке сохраняются исследуемые антитела. Это важный и интересный результат работы.

Введение изучаемых антител животным не выявило значимого влияния на исследуемые показатели и развитие патологических нарушений. Из результатов исследования можно предположить, что антитела безопасны.

В разделе Обсуждение результатов, автор на 12 страницах текста детально проанализировал работу и полученные в ней результаты.

Выводы, сделанные автором на основании результатов работы, обоснованы и не вызывают сомнения.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат полностью отражает основные результаты и содержание диссертации.

Основные замечания и вопросы по рассматриваемой работе

На странице 44 приводится описание «Одним из существенных недостатков scFv является их происхождение от грызунов, поскольку их получение осуществляется гибридным методом». Это положение не корректно, так как в настоящее время основная часть антител получается при использовании библиотек антител человека в формате фагового дисплея.

В разделе 2.4.8 и 2.4.9 автор определяет не чистоту антител, как им указано в названии, а наличие в препарате антител мономерной и олигомерных форм антител. В дальнейшем тексте автор это и обсуждает.

В разделе 2.4.12 Исследование пирогенности антитела, автор определяет наличие в препарате примесей бактериальных эндотоксинов, а не пирогенность. Для оценки пирогенности используется другой набор

методов, включая контроль за изменениями температуры животных при введении терапевтических препаратов.

Существует большое количество вариантов методов электрофоретического анализа белков какой из них использовал автор, кроме того, что это метод вертикальный не ясно.

Из таблицы 16 следует, что эксперимент прекращался при повышении показателя гибели клеток, но в это же время прирост продукции антител был наибольшим. Почему автор не продолжил работу культивирования клеток продуцентов и наращивания антител в режиме непрерывного культивирования?

Заключение

Диссертационная работа Деркаева Артема Алексеевича, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. – Иммунология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой найдено новое решение проблемы создания препарата антител для лечения пациентов при интоксикации ботулиническим нейротоксином А. Найдены оригинальные решения по оценке проверки фармакологических параметров препарата антител и показана принципиальная возможность использования разрабатываемых антител как терапевтического средства. Таким образом, диссертационная работа Деркаева Артема Алексеевича «ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА СПЕЦИФИЧНЫЕ К ТОКСИНУ С. BOTULINIM И ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ТЕРАПИИ БОТУЛИЗМА» по своей актуальности, новизне и практической значимости соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 и последующих редакций Постановлений Правительства РФ (№335 от 21.04.2016; №748 от 02.08.2016; №1024 от 28.08.2016; 1168 от

01.10.2018; №426 от 20.03.2021; 1539 от 11.09.2021; №1690 от 26.09.2022; № 101 от 26.01.2023; № 415 от 18.03.2023; №1786 от 26.10.2023 № 1382 от 16.10.2024, с изменениями и дополнениями, вступившими в силу с 01.01.2025), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Деркаев Артем Алексеевич заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

Бровко Федор Александрович

доктор биологических наук, гл.н.с., руководитель лаборатории иммунохимии

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Государственного научного центра Российской Федерации Института

биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.

Овчинникова Российской академии наук (Филиал ГНЦ ИБХ РАН).

Почтовый адрес: 142290, г. Пущино, Московская область, проспект Науки, 6

Контактный телефон: +7 (4967) 73-08-53; 8(916) 5861625

e-mail: brovko@bibch.ru



10 НОЯ 2025

СПЕЦИАЛИСТ ОТДЕЛА
КАДРОВ
ЛИЗГУНОВА А.М.

