

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Хаснатинова Максима Анатольевича на диссертацию Шаньшина Даниила Васильевича «Получение и характеристика широкореактивного химерного антитела 10Н10 специфичного к Е белку ортофлавивирусов» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Актуальность работы. К роду *Orthoflavivirus* в настоящее время относят 53 вида вирусов (ICTV taxonometry report 2022) многие из которых являются опасными патогенами человека. Ежегодно по всему миру ортофлавивирусы вызывают порядка 60 миллионов подтвержденных случаев заболевания человека, в том числе лихорадкой Денге, желтой лихорадкой, японским энцефалитом, лихорадкой Зика. При этом с учетом легких и бессимптомных случаев заражения, общее расчетное количество случаев инфицирования в мире может достигать 390 млн. человек ежегодно. В Европе и северной Азии, в том числе в Российской Федерации, наиболее опасным ортофлавивирусом является вирус клещевого энцефалита (*Orthoflavivirus encephalitidis*, ВКЭ), который, по данным Всемирной Организации Здравоохранения, вызывает порядка 10000 – 12000 клинических случаев клещевого энцефалита (КЭ) в год.

В настоящее время основным способом предотвращения флавивирусных инфекций является вакцинация, а для специфического лечения и постэкспозиционной профилактики применяют донорские иммуноглобулины человека. Несмотря на доказанную эффективность препаратов иммуноглобулина, они обладают рядом критических недостатков: повышенный риск заражения своевременно не выявленными патогенами от донора, повышенная вероятность анафилактических реакций, ограниченный период эффективного воздействия, высокие требования к условиям транспортировки и хранения препарата, для ряда ортофлавивирусов показана возможность антителозависимого усиления инфекции. Вследствие этого, разработка новых средств надежной терапии и

профилактики заболеваний, вызываемых ортофлавивирусами, является актуальнейшей научной и практической задачей.

Диссертационная работа Даниила Васильевича Шаньшина посвящена изучению фундаментальных свойств мышиногo моноклонального антитела (МКАТ) 10Н10 специфичного к Е белку ортофлавивирусов и проявляющего широкий диапазон перекрестных реакций с ортофлавивирусами разных видов. Одной из задач исследования является также создание и характеристика его химерного варианта МКАТ 10Н10, содержащего переменные домены МКАТ 10Н10 мыши и консервативные домены нормального иммуноглобулина человека и, в конечном итоге, направлена на повышение безопасности, эффективности и доступности препаратов иммуноглобулина. Вследствие этого актуальность работы не вызывает сомнений.

Достоверность полученных результатов и степень обоснованности научных положений и выводов.

Достоверность результатов работы Даниила Васильевича применением комплексного подхода к изучению взаимодействий антиген-антитело, применением широкого спектра современных экспериментальных молекулярно-биологических и иммунохимических методов, а также биоинформационных методов моделирования *in-silico*. Для статистической обработки результатов использованы адекватные поставленным задачам методы описательной и аналитической статистики. Работа выполнена на современном оборудовании с использованием высококачественных реактивов и расходных материалов.

Результаты исследования корректно интерпретированы, выводы и научные положения соответствуют поставленным задачам и логично вытекают из полученных результатов. Результаты работы Даниила Васильевича неоднократно представлены и обсуждены на научных конференциях международного уровня и опубликованы в высокорейтинговых научных журналах (WoS JCR Q1-2).

Научная новизна исследования.

В работе Даниила Васильевича впервые проведено комплексное исследование широкоспецифичного моноклонального антитела 10Н10, в

частности, определена аминокислотная последовательность легкой и тяжелой цепи антитела, построена трехмерная модель комплекса VH/VL и смоделировано взаимодействие антитела 10H10 с пептидами оболочечного белка ВКЭ и вируса Зика. Впервые высказано предположение, что наиболее энергетически выгодным расположением комплекса VH/VL МКАТ 10H10 относительно поверхностного белка является такое, при котором происходит сближение паратопа антитела с областью петли пептида слияния белка ортофлавивирусов. Определена первичная структура эпитопа антитела 10H10. На основе аминокислотной последовательности переменных доменов антитела 10H10 разработана схема создания химерного МКАТ 10H10, включающего константные области человеческого АТ и переменные области мышиного АТ. Впервые охарактеризованы константы диссоциации мышиного и химерного антитела 10H10 с целевыми антигенами.

Практическая значимость исследования.

Работа имеет существенное практическое значение, поскольку в ходе ее выполнения был разработан и предложен ряд методических решений для изучения взаимодействий антиген-антитело и синтеза рекомбинантных антител *in-vitro*. Предложен метод определения аффинности антител различного происхождения на основе биослойной интерферометрии. Основным практическим результатом работы является создание интеграционного вектора, экспрессирующего МКАТ 10H10ch и получение стабильного продуцента химерного антитела на основе клеточной линии СНО-K1 (патент на изобретение РФ №2800471 от 13.10.2022г). Автор также уточняет, что разработанный вектор может быть использован для получения рекомбинантных антител, специфичных к другим антигенам.

Представление результатов работы.

Результаты диссертационной работы Д.В. Шанышина опубликованы в 7 статьях в журналах, включенных в перечень ВАК РФ, представлены на 8 конференциях международного или всероссийского уровня. Практические

разработки защищены 1 патентом РФ на изобретения. Уровень представленности результатов исследований можно оценить как высокий.

Общая характеристика диссертации

Диссертация Д.В. Шанышина построена по традиционной схеме и состоит из введения, четырех глав («Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение»), заключения и выводов. Диссертация изложена на 142 страницах, проиллюстрирована 31 рисунком и 8 таблицами, а также включает 9 приложений на 12 страницах. В работе проанализировано 297 литературных источников, из них 1 на русском языке и 296 на английском.

Во Введении Даниил Сергеевич кратко обосновывает актуальность работы, формулирует цель и определяет 5 задач для достижения цели работы. Цель обоснована и сформулирована ясно, задачи соответствуют поставленной цели. Помимо этого во введении представлены 4 положения, выносимые на защиту, дается краткое описание методологии и методов исследования, приводится информация о новизне и научно-практической значимости работы, публикации и апробации результатов исследования, структуре и объеме диссертации, а также о личном вкладе автора в работу.

Раздел «Обзор литературы» написан лаконично, полноценно характеризует современный уровень научных знаний о молекулярной биологии и иммунологии флавиврусных инфекций. В итоге, на основе анализа литературных данных обоснован выбор использованных подходов и методов исследования.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны использованные материалы и реактивы, использованные в работе, приведена информация о свойствах и происхождении плазмидных векторов, штаммов бактерий и бактериофагов. Дано детальное описание большого количества экспериментальных и биоинформационных методов, использованных автором в работе (методам исследования посвящен 41 (!) подраздел главы 2), что характеризует Даниила Васильевича как квалифицированного, эрудированного и многогранного исследователя в области молекулярной биологии. В целом, в работе использованы хорошо разработанные общепринятые методы и подходы,

стандартные штаммы бактериальных векторов, а также надежный и хорошо охарактеризованный продуцент рекомбинантных антител – иммортализованная линия клеток яичника китайского хомячка СНО-K1, что повышает достоверность и надежность полученных результатов.

Глава «Результаты» содержит 5 разделов, в которых приводятся основные результаты работ по получению панели рекомбинантных белков ортофлавивирусов для уточнения локализации эпитопа антитела 10H10, расшифровке аминокислотных последовательностей и построению трехмерной модели переменных доменов антитела 10H10, моделированию комплекса переменных фрагментов антитела 10H10 с поверхностным белком Е ортофлавивирусов, картированию эпитопа при помощи технологии фагового дисплея и получению и характеристике химерного варианта антитела 10H10ch.

В главе «Обсуждение» Даниил Васильевич проводит теоретический анализ и интерпретацию полученных результатов, а также оценивает их в свете известных научных данных.

В Заключение автор обобщает и структурирует полученные результаты.

Выводы сформулированы четко, соответствуют задачам исследования и полностью отражают результаты исследования. Содержание автореферата соответствует рукописи диссертации.

Замечания и вопросы. Работа Даниила Васильевича Шаньшина оценивается положительно, однако к тексту диссертации есть замечание. Автором не раскрыта современная таксономия сем Flaviviridae. Так, по тексту и в названии автор использует корректное современное наименование рода *Orthoflavivirus*, однако в обзоре литературы приведена только устаревшая таксономия сем. Flaviviridae с двумя родами *Alphavirus*. и *Flavivirus*. Научные видовые названия вирусов - объектов исследования также ни разу не упомянуты в рукописи, что некорректно, поскольку аббревиатуры названий соответствующих вирусов (TBEV, ZIKV, DENV3, WNV) широко используются по тексту. Следовало бы при первом упоминании вирусов привести полное биологическое название на

латинском языке в соответствии с международной таксономией вирусов в пересмотре 2022г с указанием используемых далее в тексте аббревиатур.

Кроме того, возникли два вопроса, имеющих скорее дискуссионный характер.

1). На мой взгляд, положения 1 и 2, выносимые на защиту, сформулированы с избыточной осторожностью и отражают скорее процесс исследования, нежели результат. Так, например, положение 1 более точно отражало бы суть достижений автора в формулировке «Эпитоп, с которым взаимодействует антитело 10H10 локализован в регионе петли слияния 98-DRGWGNHCGLFGK-110 белка Е ортофлавивирусов».

2). Моделирование взаимодействия МКАТ 10H10 с белком Е вируса клещевого энцефалита и вируса Зика было проведено на основе структур PBD 1SVB и PDB 5H37 соответственно. Обе эти структуры получены на основе структурного анализа белка Е в нативной рН-нейтральной конформации. Известно, что, в структуре нативного вириона при нормальной рН среды, белок Е существует в виде димера. При этом петля пептида слияния каждого мономера и прилегающие регионы скрыты (“buried”) доменом 3 парного мономера и малодоступны для антител. Учитывалось ли автором конформационное состояние белка Е при 3D моделировании и в экспериментах по картированию эпитопа для МКАТ 10H10 при помощи технологии фагового дисплея?

Заключение: диссертация Шаньшина Даниила Васильевича «Получение и характеристика широкореактивного химерного антитела 10H10 специфичного к Е белку ортофлавивирусов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является квалификационной научно-исследовательской работой. Автором получены новые знания о молекулярных механизмах взаимодействия антител млекопитающих с оболочечным белком Е ортофлавивирусов. Полученные результаты могут быть применены на практике. Содержание диссертация соответствует научной специальности 1.5.3 – Молекулярная биология. По своей актуальности, научной новизне, методическому уровню, объему выполненных исследований и уровню научных

五