

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Гуляевой Людмилы Федоровны на диссертационную работу 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 темы диссертационного исследования. Патогенные для человека флавивирусы являются глобальной проблемой современного здравоохранения. Ежегодное количество случаев заболевания людей, обусловленное такими вирусами как вирус денге, вирус Зика, вирус желтой лихорадки, вирус Западного Нила, вирус японского энцефалита и вирус клещевого энцефалита, исчисляется десятками миллионов. Экономический урон, связанный со смертностью и тяжелым течением инфекций, может достигать нескольких процентов от глобального ВВП. Несмотря на высокую опасность, для профилактики ортофлавивирусных инфекций создано ограниченное число разрешенных к применению вакцин. В то же время, использование сывороточной терапии нередко сталкивается с ограничениями в виде развития у пациентов антителозависимого усиления вторичных инфекций. Это требует разработки альтернативных методов противодействия флавивирусным инфекциям, в качестве которых можно рассматривать использование моноклональных антител и производных на их основе, в том числе химерных антител. В настоящее время в мире ведется разработка нескольких препаратов для экстренной терапии флавивирусных инфекций на основе моноклональных антител. Важным условием при создании таких препаратов является структурная характеристика антител, которые выступают их основой. В связи с этим поставленная Даниилом Васильевичем цель работы по изучению широкореактивного моноклонального антитела 10Н10, специфичного к Е белку ортофлавивирусов, и получение его химерного варианта является актуальной задачей современной молекулярной биологии.

Научная значимость и новизна работы, на мой взгляд, не вызывает сомнений. В диссертационном исследовании для локализации эпитопа антитела 10Н10 впервые была получена панель рекомбинантных антигенов четырех ортофлавивирусов, включающая в себя фрагменты оболочечного белка Е и неструктурный белок 1 TBEV, а также фрагменты оболочечного белка WNV, DENV и ZIKV. Впервые было проведено комплексное исследование мышиноного моноклонального антитела 10Н10. Определена аминокислотная последовательность легкой и тяжелой цепи антитела, и на их основе построена трехмерная

модель комплекса VH и VL. На основании полученного комплекса VH/VL впервые было проведено молекулярное моделирование антитела 10H10 с фрагментами оболочечного белка TBEV и ZIKV. Продемонстрировано, что наиболее энергетически выгодным расположением комплекса VH/VL относительно поверхностного белка является такое, при котором происходит сближение паратопа антитела с областью петли слияния белка ортофлавивирусов. Впервые методом фагового дисплея определена первичная структура эпитопа антитела 10H10. Впервые на основе аминокислотной последовательности вариабельных доменов антитела 10H10 проведен дизайн химерного антитела, включающего константные области человеческого антитела. Был сконструирован интеграционный вектор pVEAL3-10H10ch, трансфекция которым клеток CHO-k1 позволила получить продуцент химерного антитела 10H10ch. При помощи метода биослойной интерферометрии впервые определены константы диссоциации мышиного и химерного антитела 10H10.

Важно отметить, что штамм рекомбинантной клеточной линии CHO-k1-10H10ch был депонирован в банке Коллекции культур клеток ГНЦ ВБ Вектор Роспотребнадзора, а также был получен патент РФ на изобретение № 2800471.

Теоретическая и практическая значимость результатов диссертационного исследования. В рамках диссертационного исследования получена панель рекомбинантных фрагментов полипротеина ортофлавивирусов, таких как TBEV, ZIKV, DENV и WNV. Такие антигены можно использовать как для фундаментальных исследований, так и для анализа специфичного гуморального иммунного ответа. Впервые изучена нуклеотидная последовательность и получена аминокислотная последовательность вариабельных доменов антитела 10H10. Последовательности были депонированы в базе GenBank (VH OK483332; VL OL448869). Результат позволил получить рекомбинантный аналог антитела 10H10. В работе предложена схема комплексного изучения линейных антигенных детерминант антител. При помощи этого подхода получена первичная структура эпитопа антитела 10H10, построена трехмерная модель антитела с эпитопом и предсказана структура наиболее энергетически выгодной конформации комплекса «антиген-антитело». Такой подход можно использовать для поиска и исследования линейных эпитопов других антител. Сконструирован интеграционный вектор pVEAL3-10H10ch, и получен стабильный продуцент химерного антитела 10H10ch. Разработанный вектор может быть использован для получения рекомбинантных антител, специфичных в отношении любых других антигенов. Полученное рекомбинантное антитело может быть использовано для создания диагностических тест-систем и терапевтических препаратов широкого спектра действия.

Предложен метод определения аффинности антител различного происхождения на основе биослойной интерферометрии. Продemonстрировано, что константа диссоциации химерного антитела при взаимодействии с различными рекомбинантными антигенами находится в наномолярной области.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Выводы и рекомендации диссертационной работы корректны и в полной мере отражают полученные результаты. Большая часть исследований проведена лично автором. Автор принимал непосредственное участие в статистическом анализе, интерпретации данных, представлении результатов на конференциях, а также публикации результатов в рецензируемых журналах. Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на 8-ми российских и международных конференциях. По результатам диссертации опубликовано 14 научных статей в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 6 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций.

Характеристика диссертации

Диссертационная работа Шанышина Даниила Васильевича изложена на 142 страницах машинописного текста и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 4-х глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 31 рисунками и 8 таблицами, а также 9-ю приложениями. Список литературы содержит 297 источников.

Введение написано в соответствии с требованиями ВАК. Здесь автор обосновывает актуальность тематики проведенной работы, приводит информацию о степени разработанности решаемой научной проблемы, четко формулирует цель и задачи для ее решения, подчеркивает научную новизну исследования, а также обозначает теоретическую и практическую значимость исследования, методологию и методы исследования, дает информацию о степени достоверности результатов, их апробации, а также личном вкладе в проведенное исследование. Во введении представлены положения, выносимые на защиту, список конференций, на которых были представлены результаты работы и информация о личном вкладе автора.

В главе «Обзор литературы» автор приводит современные представления о проблеме инфекций, вызванных ортофлавирусами. Здесь приводятся общие сведения о данных вирусах, эпидемиологии и их жизненном цикле. В этой главе кратко

рассматриваются иммунологические механизмы противодействия ортофлавирирусным инфекциям. Рассматриваются механизмы врожденного иммунитета, антителозависимого усиления инфекции, а также В- и Т- клеточный иммунного ответа. Также описывается феномен широкореактивных антител на примере различных вирусных инфекций. В заключительной части обзора литературы автором рассматривается структура антител и механизмы получения химерных антител.

Вторая глава «Материалы и методы исследования» содержит информацию об используемых реагентах, клеточных линиях, штаммах бактерий и вирусов. Значительная часть главы содержит описание используемых методов. Это современные методы молекулярной биологии и биохимии, такие как: дизайн и конструирование плазмидных векторов, трансфекция клеток СНО-K1, наработка и хроматографическая очистка рекомбинантных белков, белковый электрофорез и иммуноблоттинг, фаговый дисплей, выделение мРНК, биослойная интерферометрия, а также методы биоинформатического анализа такие как: моделирование трехмерной структуры, молекулярный докинг и молекулярная динамика. Здесь также представлены иммунологические методы, необходимые для исследования иммуногенных свойств рекомбинантного белка. В целом, методы, используемые в работе, позволяют решить поставленную цель и задачи. Результаты получены на достаточном количестве экспериментального и теоретического материала. Методы статистической обработки результатов выполнены корректно с использованием современных подходов.

В главе 3 «Результаты» представлены результаты собственных исследований. Автором сконструированы и получен ряд экспрессионных плазмидных векторов и получены штаммы продуценты рекомбинантных белков TEF1, TEF2, TEF3, NS1, ZEF1, DEF1, WEF1. Показано, что полученные рекомбинантные белки содержат эпитоп антитела 10H10. Автором определена нуклеотидная последовательность вариабельных доменов антитела 10H10. На основе выведенной аминокислотной последовательности построена теоретическая трехмерная структура комплекса VH и VL. Молекулярный докинг комплекса антиген/антитело позволил выявить аминокислотные остатки, теоретически участвующие во взаимодействии. Такие взаимодействия характеризуются межмолекулярными связями, при этом преобладающими взаимодействиями являются водородные связи, солевые мостики и π - π стекинговые связи. Для определения точной локализации эпитопа антитела 10H10 автором был проведен биопенинг. В результате фаговой аффинной селекции были отобраны фаготопы и определены аминокислотные остатки пептидов, экспонированных на поверхности р3 белка. В результате анализа полученных последовательностей (GYAGWGNSWGLF, ALRYEGLFGAPW,

SFDRGLWGLWSM, LPWGRWDALFGR) был выделен консенсусный мотив вида DRGWGNXXGLFGR, где X соответствует любому аминокислотному остатку. Полученные бактериофаги использовались для оценки взаимодействия с антителом 10H10 при помощи ИФА. Помимо этого для описания взаимодействия отобранных пептидов с паратопом антитела 10H10 был проведен молекулярный докинг. Финальной частью работы стало конструирование плазмидного вектора pVEAL3-10H10ch и получение с его помощью клеточной линии CHO-K1-10H10ch, продуцента рекомбинантного антитела 10H10ch. Методом биослойной интерферометрии установлено, что мышинное и химерное антитело 10H10 связывается с рекомбинантными антигенами, при этом равновесная константа диссоциации МКА 10H10 с белками TEF1, ZEF1, DEF1 и WEF1 составили 1,94 нМ, 3,93 нМ, 2,91 нМ и 5 нМ соответственно, а в случае химерного антитела 10H10ch аналогичные значения составили 10 нМ, 12 нМ, 48 нМ и 33 нМ соответственно.

В главе 4 автор обсуждает полученные результаты с современных научных позиций. Отмечается, что, несмотря на высокую гомологию ортофлавириусов, всего два региона имеют достаточно протяженный участок, свидетельствующий о высокой степени идентичности. Совокупные результаты молекулярного моделирования показали, что моноклональные антитела 10H10 могут образовывать стабильные комплексы с участком расположения петли слияния белка ETBEV и EZIKV, которые включают различные межмолекулярные взаимодействия, включая водородные связи, солевые мостики и π - π стекинг. Результаты же картирования показывают, что наличие консенсусного мотива вне окружающего аминокислотного контекста не всегда может давать наибольшую степень сродства антигена с антителом. Вероятнее всего во взаимодействии антигена с антителом более важными являются отдельные аминокислоты, их доступность, и, соответственно, их окружение. Было высказано предположение, что активный центр связывания находится в областях 98-DRGWGN-103 и 106-GLFGK-110. При обсуждении результатов по характеристике химерного антитела 10H10, полученного с применением клеток CHO-K1, автор приводит сравнение взаимодействия полученных вариантов антител как с рекомбинантными так и цельновирионными антигенами. Также в качестве инструмента для сравнения силы связывания был использован метод биослойной интерферометрии и разница в K_d для одного и того же антигена для разных вариантов антител заметно варьирует: так, для TEF1, ZEF1, DEF1 и WEF1 разница в значениях 5,15, 3,05, 16,49 и 6,60 раз соответственно. Наблюдаемые различия могут говорить о разной степени влияния процесса химеризации на взаимодействие с разнообразными антигенами. Возможно, замена константной области мышинного антитела на человеческое вносит стерические изменения в расположение вариабельной части легкой и тяжелой цепи антитела.

Изменение в углах влияет на конформацию антигенсвязывающего центра, препятствуя формированию оптимального комплекса «паратоп – эпитоп».

Представленная диссертация написана хорошим научным языком, выполненные этапы исследования описаны логично. Рисунки полностью отражают полученные данные и позволяют не сомневаться в их достоверности. Выводы из проведенного исследования логичны и полностью соответствуют результатам.

Содержание автореферата полностью соответствует диссертационной работе, отражает ее содержание и соответствует требованиям пункта 25 «Положения о присуждении учёных степеней».

Принципиальных замечаний к диссертационной работе у меня нет. При прочтении работы у меня появились вопросы дискуссионного характера:

1. В главе «Обзор литературы» автор описывает проникновение ортофлавивируса (стр. 14) посредством эндоцитоза, опосредованного рецепторами клеточной поверхности. Однако он не приводит информацию о таких рецепторах. Между тем, этот нераскрытый аспект инфицирования также важен для терапии.

2. Анализируя K_d комплексов моноклонального антитела 10H10 и гуманизированного 10H10ch с белками TEF1, ZEF1, DEF1 и WEF1, автор говорит о незначительных различиях, хотя речь идет о 2,5-6-кратных различиях. Делает ли это его перспективным для терапии и почему такие свойства 10H10ch способствуют его адресной доставке, как это предполагает автор (стр. 78)?

3. Хотелось бы знать мнение автора, насколько пригодно созданное гуманизированные антитела к Е белку ортофлавивирусов для терапии.

Заключение

Диссертационная работа Шаньшина Даниила Васильевича на тему: «Получение и характеристика широкореактивного химерного антитела 10H10 специфичного к Е белку ортофлавивирусов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология, является законченной научной работой, в которой получены и охарактеризованы широкореактивные химерные антитела 10H10, специфичные к Е белку ортофлавивирусов. По актуальности, новизне, научной и практической значимости, а также методологическому и методическому уровню полученных результатов рассматриваемая диссертационная работа полностью соответствует критериям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени

полученных результатов рассматриваемая диссертационная работа полностью соответствует критериям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук согласно п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор Шаньшин Даниил Васильевич заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

Гуляева Людмила Федоровна

Дата: «11» августа 2025 г.

Подпись д.б.н., профессора Гуляевой Людмилы Федоровны

Заверяю:

Руководитель службы персонала ФГБНУ ФИЦ ФТМ



Хабарова Маргарита Викторовна

Дата: «11» августа 2025г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» 630117, Россия, Новосибирская область, г. Новосибирск, улица Тимакова, 2. Телефон: +7 (383) 274-95-80. E-mail: director@frcftm.ru. Сайт: www.frcftm.ru.