



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук  
(ИМБ РАН)**

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,  
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: [isinfo@eimb.ru](mailto:isinfo@eimb.ru)  
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

*Исх. от 12.05.2025 № 12312-13/192*



**«УТВЕРЖДАЮ»  
Заместитель директора ИМБ РАН  
Член-корреспондент РАН**

**В.А. Митькевич**  
2025 г.

**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

на диссертационную работу **Трегубчак Татьяны Владимировны** «Свойства искусственных вариантов белка ортопоксвирусов, связывающего фактор некроза опухоли», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

**Актуальность темы исследования и ее связь с планами отраслевой науки**

Гиперпродукция фактора некроза опухоли (ФНО) является причиной ряда тяжелых заболеваний человека, среди которых наибольшую социальную значимость имеет ревматоидный артрит. Согласно современным представлениям, именно цитотоксическими эффектами ФНО обусловлены основные проявления заболевания, в том числе поражения хряща и кости. В настоящее время от него страдают около 57 млн человек по всему миру. В группу риска попадают люди в возрасте от 30 до 50 лет.

Для лечения данного заболевания главным образом применяются ингибиторы ФНО, полученные на основе клеточных рецепторов ФНО и моноклональных антител. Однако, несмотря на продемонстрированную эффективность применения существующих анти-ФНО препаратов при лечении ревматоидного артрита, существует необходимость разработки новых препаратов. Такая необходимость обусловлена ограниченной доступностью данных препаратов для населения из-за высокой стоимости, а также потерей чувствительности к лекарственному средству в процессе лечения.

Диссертационная работа Трегубчак Татьяны Владимировны посвящена изучению биологических свойств рекомбинантных вариантов ФНО-связывающего

белка CtmB ортопоксвирусов. Белок CtmB ортопоксвирусов рассматривается в качестве основы для разработки новых ФНО-блокаторов. Идея рассмотрения вирусных белков в терапевтических целях в первую очередь обоснована их высокой эффективностью связывания с белками-мишенями поражаемого организма.

Таким образом, актуальность темы диссертационной работы Трегубчак Татьяны Владимировны, связанной с изучением свойств рекомбинантных белков, полученных на основе ФНО-связывающего белка CtmB ортопоксвирусов не вызывает никаких сомнений.

Диссертационная работа Трегубчак Татьяны Владимировны выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы, проводимой в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

**Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Автором впервые представлены данные о биологических свойствах рекомбинантных вариантов белка CtmB ортопоксвирусов. Была изучена функциональная значимость различных доменов белка CtmB для проявления ФНО-нейтрализующей активности – впервые было показано, что PLAD-субдомен белка значим для нейтрализации биологических эффектов ФНО. Кроме того, в экспериментах *in vitro* было показано, что удаление хемокин-связывающего домена белка CtmB ортопоксвирусов не приводит к потере ФНО-нейтрализующих свойств таких вариантов белков. В диссертационной работе описано получение рекомбинантных вариантов белков на основе функциональных доменов белка CtmB как в эукариотической системе экспрессии, так и в прокариотической, описаны преимущества и недостатки использования каждой из упомянутых систем экспрессии при наработке белков. Впервые при помощи методов сайт-направленного мутагенеза изучены видоспецифичные отличия в отношении ФНО-нейтрализующей активности между белками CtmB вируса натуральной оспы и CtmB вируса оспы коров – установлена значимость пролина в 7-й позиции PLAD-субдомена белка CtmB вируса натуральной оспы для проявления ФНО-нейтрализующей активности относительно ФНО человека. Кроме того, большой блок работ посвящен изучению иммуногенных свойств белка CtmB вируса натуральной оспы, впервые показано, что белок CtmB вируса натуральной оспы с удаленным хемокин-связывающим доменом обладает сниженными иммуногенными свойствами относительно полноразмерного белка CtmB вируса натуральной оспы. Также в диссертационной работе изложены результаты работ по применению подходов генной терапии на модели коллаген-

индуцированного артрита у крыс. В данных экспериментах в качестве терапевтического средства использовалась рекомбинантная плазмидная ДНК на основе вектора pcDNA, содержащая ген, кодирующий белок CtmB вируса натуральной оспы с удаленным хемокин-связывающим доменом.

Полученные данные имеют фундаментальное значение и вносят существенный вклад в современные представления о ФНО-связывающих белках ортопоксвирусов. Также полученные данные раскрывают терапевтический потенциал вирусных рецепторов ФНО для лечения патологических состояний человека, опосредованных гиперпродукцией ФНО. Таким образом, научная новизна диссертационной работы Трегубчак Татьяны Владимировны не вызывает никаких сомнений.

#### **Значимость для науки и производства (практики) полученных автором диссертации результатов**

Работа Трегубчак Татьяны Владимировны имеет важное практическое значение. В настоящее время на рынке биологических препаратов отсутствуют ФНО-блокаторы отечественного производства, которые используются для лечения патологий, обусловленных гиперпродукцией ФНО. Результаты, полученные в диссертационной работе, свидетельствуют о том, что рекомбинантный вирусный белок CtmB вируса натуральной оспы и полученные на его основе рекомбинантные варианты белков могут быть использованы как основы для создания отечественных ФНО-блокаторов. Использованная прокариотическая система экспрессии для получения рекомбинантных вариантов белков CtmB ортопоксвирусов может значительно снизить себестоимость такого препарата, так как импортные препараты в основном нарабатываются на культуре клеток CHO.

#### **Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключений**

Достоверность результатов работы, представленной в диссертации Трегубчак Татьяны Владимировны обеспечена применением современных методик, правильным выбором модельных объектов и применением адекватных методов статистической обработки полученных результатов. Цели и задачи сформулированы кратко и ёмко, они соответствуют теме диссертационного исследования по указанному профилю.

Положения, выносимые на защиту, и выводы полностью соответствуют поставленным задачам и полученным результатам. Обсуждение результатов выполнено на основе современных представлений о вирусных ФНО-связывающих белках и о терапии заболеваний, обусловленных гиперпродукцией ФНО. Список

литературных источников включает в себя современную и актуальную для обсуждаемой проблематики научную литературу.

Результаты работы Трегубчак Татьяны Владимировны были представлены на многочисленных российских и международных конференциях. Кроме того, по теме диссертационной работы было опубликовано 5 статей в журналах из перечня, рекомендованного ВАК.

### **Общая оценка работы**

Диссертационная работа Трегубчак Татьяны Владимировны имеет традиционную структуру и состоит из списка сокращений и условных обозначений, введения, основной части, включающей обзор литературы, описание выполненных работ, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена по монографическому типу, объем работы составляет 161 страницу, включает 17 таблиц, 37 рисунков, 242 библиографических ссылки.

Во введении автор лаконично излагает актуальность темы исследования, степень ее разработанности, цель и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробации результатов. Также во введении приводится информация о вкладе автора в работу.

Раздел «Обзор литературы» содержит структурированный материал о биологической роли ФНО, о механизмах развития патологических состояний, опосредованных гиперпродукцией ФНО (ревматоидного артрита, псориатического артрита и септического шока). Подробно описаны молекулярные каскады, которые запускаются в результате связывания ФНО с соответствующими рецепторами. Детально описаны лабораторные модели ревматоидного артрита, как наиболее социально значимого заболевания, вызванного гиперпродукцией ФНО. На основании проведенного анализа литературных данных о существующих моделях ревматоидного артрита сделано заключение, что «золотым стандартом» среди разработанных моделей является модель коллаген-индуцированного артрита. Далее описаны пять основных препаратов, применяемых для лечения заболеваний, опосредованных гиперпродукцией ФНО, и подходы, которые применяются при разработке новых анти-ФНО-препаратов. Кроме того, описаны свойства всех известных к настоящему времени ФНО-связывающих белков ортопоксвирусов и их уникальные характеристики относительно клеточных рецепторов ФНО. Следует заметить, что обзор литературы дает исчерпывающую информацию по предмету исследования. Переходы между главами очень лаконичны.

Раздел «Материалы и методы» содержит информацию об использовавшихся в работе реактивах, материалах и лабораторных животных. Раздел написана очень подробно и содержит большое разнообразие использованных в работе методов. Использованные методологические подходы адекватны поставленным задачам.

Раздел «Результаты и их обсуждение» содержит 11 глав, в которых изложены все результаты работы. В главе 3.1 приводится описание результатов, полученных при изучении иммуногенных свойств полноразмерного белка CrmB вируса натуральной оспы – показано, что белок CrmB вируса натуральной оспы при многократном введении мышам обладает высокой иммуногенностью. Главы 3.2-3.6 описывают получение рекомбинантных вариантов белков CrmB ортопоксвирусов в бакуловирусной системе экспрессии. Из 6 полученных рекомбинантных вариантов белков, в качестве наиболее перспективного белка для создания ФНО-блокатора, рассматривается белок CrmB вируса натуральной оспы. Такой вариант белка сохраняет способность нейтрализовать действие ФНО как *in vitro*, так и *in vivo*. Главы 3.7-3.9 содержат результаты по получению белка CrmB вируса натуральной оспы в прокариотической системе экспрессии, а также по изучению свойств полученного белка. Такой вариант белка сохраняет способность нейтрализовать действие ФНО *in vitro* и обладает сниженными иммуногенными свойствами относительно полноразмерного белка CrmB вируса натуральной оспы. Глава 3.10 описывает изучение видоспецифичных отличий между белками CrmB вируса натуральной оспы и CrmB вируса оспы коров – проведено моделирование белок-белковых взаимодействий между ФНО и вирусными рецепторами. В прокариотической системе экспрессии получены мутантные варианты белка CrmB вируса оспы коров и проведен SPR-анализ (измерение  $K_D$  методом поверхностно-плазмонного резонанса) эффективности взаимодействия рекомбинантных вирусных белков с ФНО мыши и человека. Глава 3.11 посвящена изучению применения подхода генной терапии для лечения артрита у крыс.

Следует отметить, что очень подробно описаны все этапы работы, обоснованы логические переходы между главами и правомерны сделанные выводы и положения, выносимые на защиту.

#### **Замечания к диссертационной работе**

Замечания к данной диссертационной работе незначительны и имеют в большей степени дискуссионный характер:

1. В обзоре литературы очень подробно и полно описаны современные стратегии разработки новых анти-ФНО препаратов, однако, в тексте

диссертационного исследования отсутствует пояснение, почему в качестве вектора доставки TNF-BD ВНО использовали плазмиду pcDNA3.1. На мой взгляд, не хватает хотя бы сжатого описания векторов, используемых для генной терапии.

2. В разделе «Материалы и методы» отсутствует описание гистологических исследований.

3. В таблице 3.12 приводится сравнительная характеристика анти-ФНО препаратов. При сравнении экономичности наработки действующего вещества утверждается, что затраты на наработку белкового продукта TNF-BD ВНО в бактериях *E.coli*, позволит сократить затраты минимум в 2 раза, по сравнению с затратами, необходимыми для наработки белка в эукариотических клетках. На мой взгляд, необходимо пояснить, каким образом проводился расчет.

Данные замечания не влияют на выводы работы и не снижают значимость полученных результатов.

#### **Соответствие автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат Трегубчак Татьяны Владимировны полностью отражает содержание диссертационной работы, изложен на 24 страницах и включает все основные разделы. Текст четко структурирован, результаты проведенных исследований хорошо проиллюстрированы.

#### **Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати**

Результаты диссертации отражены в 20 опубликованных работах, включая 5 статей, опубликованных в журналах списка, рекомендованного ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, 14 тезисов в сборниках конференций, 1 патент Российской Федерации.

#### **Заключение**

Диссертационная работа Трегубчак Татьяны Владимировны «Свойства искусственных вариантов белка ортопоксвирусов, связывающего фактор некроза опухоли», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология, является законченной научно-квалифицированной работой, в которой представлены новые данные о биологических свойствах рекомбинантных вариантов белков, полученных на основе ФНО-связывающего белка CrmB ортопоксвирусов.

Выполненная работа по своей актуальности, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов полностью соответствует п. 9 «Положение о порядке присуждения ученых степеней»,

утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а автор представленной диссертации Трегубчак Татьяна Владимировна заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Диссертационная работа Трегубчак Т.В. «Свойства искусственных вариантов белка ортопоксвирусов, связывающего фактор некроза опухоли», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология, заслушана и обсуждена на объединенном научном семинаре профильных лабораторий ИМБ РАН 23 апреля 2025 г. (протокол №3).

Отзыв на диссертацию составила:

Заведующая лабораторией

механизмов и контроля трансляции

Института Молекулярной Биологии

им. В.А. Энгельгардта РАН,

ведущий научный сотрудник,

кандидат биологических наук

Электронная почта: [alkalaeva@eimb.ru](mailto:alkalaeva@eimb.ru)



Алкалаева Е.З.

« 12 » мая 2025 г.

Подпись к.б.н. Алкалаевой Е.З. удостоверяю

Ученый секретарь ИМБ РАН, к.ф.-м.н.

« 12 » мая 2025 года



Коновалова Е.В.

#### Сведения об организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

Почтовый адрес: ГСП-1, 119991, Российская Федерация, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32. ИМБ РАН.

Тел. : +7(499) 135-23-11, +7(499) 135-11-60

Адрес официального сайта: <https://www.eimb.ru>

Электронная почта: [isinfo@eimb.ru](mailto:isinfo@eimb.ru)