

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента, заведующего лабораторией иммунохимии (№23) Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, доктора биологических наук, профессора, Филатова Александра Васильевича о научно-практической значимости диссертационной работы Горяиновой Оксаны Сергеевны на тему «Получение и использование однодоменных рекомбинантных антител для повышения эффективности исследований белков-маркеров в крови человека», представленной к защите в диссертационный совет Д.208.046.02 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 - клиническая иммунология, аллергология.

### **Актуальность темы диссертационной работы**

Диссертационная работа Горяиновой Оксаны Сергеевны посвящена получению новых реагентов на основе однодоменных рекомбинантных антител и разработки методов их использования с целью повышения эффективности анализов, используемых в клинической лабораторной диагностике (в частности, иммуноферментного анализа). Плазма или сыворотка крови, которые зачастую используется в такого рода исследований — это многокомпонентная смесь, содержащая в себе большое количество белков и других биомолекул. При этом представленность различных белков весьма неоднородна. 99% тотальной белковой массы крови составляют всего 20 белков, тогда как диагностически ценные белки, маркеры различных заболеваний, содержатся в ней в значительно меньших концентрациях. Несмотря на то, что выше обозначенные высоко представленные белки также являются маркерами ряда патологий и диагностически значимы, их присутствие в плазме или сыворотке крови затрудняет детекцию и исследование менее представленных белков. Использование специальных инструментов, например, иммуносорбентов, для специфической предобработки исследуемого биоматериала (крови) может повысить надёжность проводимых анализов.

Изложенное выше подтверждает, что диссертационная работа Горяиновой Оксаны Сергеевны, направленная на усовершенствование методов

лабораторной диагностики путём получения новых рекомбинантных однодоменных антител, создания на их основе высокоспецифичных иммуносорбентов, связывающих заданные белки плазмы крови и их последующего использования для предобработки плазмы крови с целью её дальнейшего анализа, является значимой и актуальной.

### **Научная новизна исследования и полученных результатов**

Научная новизна диссертационной работы Горяиновой Оксаны Сергеевны не вызывает сомнений.

Впервые описана процедура последовательного поэтапного генерирования однодоменных антител к различным высоко представленным белкам крови. Примечательно, что в качестве антигенного материала здесь использовалась сложная субпротеомная смесь — плазма крови человека.

В результате проведённых селекций получены новые однодоменные антитела, специфически узнающие и связывающие некоторые высоко представленные белки плазмы крови человека, такие как сывороточный альбумин, иммуноглобулины классов G, A и M, фибриноген, альфа-2-макроглобулин, трансферрин.

На основе отобранных однодоменных антител созданы новые иммуносорбенты, которые с высокой специфичностью связывают вышеназванные белки плазмы крови человека.

На примере диагностически важного белка лактоферрина показана эффективность использования полученных иммуносорбентов для предварительной обработки плазмы крови человека с целью последующего иммуноферментного анализа.

На примере диагностически ценного белка карциноэмбрионального антигена показано, что полученные иммуносорбенты могут использоваться для предобработки плазмы крови с целью последующей детекции в иммуноферментном анализе низко представленных белков.

Получены однодоменные антитела к низко представленному белку интерлейкину-6, которые планируется использовать для специфического обогащения или выделения данного цитокина и связанных с ним молекул.



## **Степень обоснованности и достоверности полученных результатов**

Диссертационная работа Горяиновой Оксаны Сергеевны выполнена на высоком методическом уровне. Полученные в диссертационной работе результаты обсуждены с учетом современных данных медицинской и биологической науки. Выводы, представленные в диссертации, научно обоснованы и подтверждены полученными экспериментальными данными.

Основные результаты диссертационной работы Горяиновой Оксаны Сергеевны опубликованы в рецензируемых научных журналах, представлены на нескольких международных конференциях. По результатам проведённых исследований получено два патента.

## **Научная и практическая значимость полученных результатов**

Представленные Горяиновой Оксаной Сергеевной результаты обладают высокой теоретической и практической значимостью. Генерирование новых однодоменных антител и их использование для различных медико-биологических приложений является перспективным направлением исследований современной молекулярной иммунологии. Полученные новые реагенты и разработанные методы могут использоваться для исследовательских, диагностических и, потенциально, терапевтических целей.

Предобработка плазмы крови с использованием полученных однодоменных антител и иммуносорбентов на их основе может повысить эффективность анализа исследуемых белков с помощью различных методов: масс-спектрометрических, иммунохимических (иммуноферментного анализа) и др. Предобработанная плазма и/или сыворотка крови может рассматриваться в качестве более подходящего и адаптированного препарата для проведения иммуноферментного анализа по сравнению с исходным образцом за счёт отсутствия в первой белков, вызывающих неспецифический (фоновый, интерферирующий) сигнал. Использование такой предварительно обработанной плазмы/сыворотки крови может серьёзно повысить достоверность и эффективность проводимых в диагностических целях анализов.

Новые технологии и подходы на основе использования полученных в данной работе однодоменных антител и иммуносорбентов на их основе имеют важное практическое значение. Их использование обеспечивает возможность как специфического удаления белков, которые вносят дополнительный фоновый

сигнал при проведении диагностических анализов, так и выделения заданного высоко представленного белка и связанных с ним молекул, субпротеомов.

Используя однодоменные антитела и иммуносорбенты на их основе, связывающие сывороточный альбумин, иммуноглобулин G, иммуноглобулин A, иммуноглобулин M, фибриноген, альфа-2-макроглобулин, трансферрин, возможно исследование субпротеомов и антигенов, которые находятся в связанном состоянии (например, в составе комплексов) с выше обозначенными белками.

Полученные однодоменные антитела к высоко представленным белкам плазмы крови человека могут использоваться в качестве составных агентов в биспецифических антителах или в других биоконъюгатах. Использование этих однодоменных антител позволит увеличить период циркуляции биоконъюгата в крови и осуществить доставку терапевтического препарата в целевые органы и ткани.

Удаление некоторых высоко представленных белков из препаратов плазмы крови может обеспечить их более высокую стабильность и сохранность в лабораторных условиях хранения.

Высокоспецифичные однодоменные антитела, связывающие интерлейкин-6, могут быть использованы в клинической лабораторной диагностике в качестве дополнительных инструментов для его детекции и исследования.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, внедрение результатов в практику, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и список литературы. Диссертационная работа Горяиновой Оксаны Сергеевны изложена на 167 страницах, иллюстративный материал включает 22 рисунка и 3 таблицы. Список литературы включает в себя 176 работ, из которых отечественных — 10 источников, иностранных — 166.

Во введении автор излагает цели и задачи исследования, его актуальность и научно-практическую значимость, научную новизну и основные положения, выносимые на защиту.



Обзор литературы написан с учётом современных научных данных, обосновывает методические подходы, используемые при проведении работы.

В главе «Материалы и методы» автором описываются методические подходы, использованные в работе, которые включают в себя современные методы молекулярной биологии, молекулярной иммунологии и микробиологии.

В главе «Результаты» изложены результаты, полученные автором: описана новая процедура последовательного поэтапного генерирования однодоменных антител к некоторым высоко представленным белкам плазмы крови человека, описана процедура получения новых иммуносорбентов на основе отобранных однодоменных антител, приведены результаты использования новых полученных реагентов и их производных для специфической предобработки плазмы крови с целью снижения уровня фонового сигнала в последующем иммуноферментном анализе.

В главе «Обсуждение результатов» представлены интерпретация полученных результатов и их обсуждение.

Выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы логично следуют из поставленных задач, соответствуют основным положениям диссертации и полностью отражают результаты исследования.

Автореферат диссертации полностью отражает основное содержание работы.

#### **Замечания по диссертационной работе**

1. В диссертационной работе совершенно справедливо указывается, что разработанные методы будут очень полезны при проведении протеомного анализа плазмы крови человека. Было бы очень выигрышным для работы привести несколько конкретных примеров такого анализа. Это можно было бы сделать с использованием двумерного электрофореза и/или масс-спектрометрии. Эти примеры могли бы наглядно продемонстрировать насколько предложенные методы могут увеличить глубину протеомного анализа плазмы глубина в результате предварительной сорбции высоко представленных белков.
2. В работе был использован адьювант Adjuvant LQ, «Gerbu Biotechnik», который не является широко распространённым реагентом. Было бы не лишним более подробно описать его состав, упомянув, что он

представляет собой суспензию положительно заряженных липидных микрочастиц.

3. На стр. 61 диссертации написано «ПЦР-продукт, соответствующий размеру VHN (~650 кДа)». Это видимо опечатка. Не 650 кДа, а 650 пар нуклеотидов.
4. Рис. 12, 13 и 14 диссертации озаглавлены как «Анализ связывания отобранных наноантител». Считаю, что более уместно эти рисунки было бы назвать как «Анализ специфичности отобранных наноантител».
5. В автореферате диссертации некоторые рисунки приведены с невысоким разрешением. Это несколько затрудняет их восприятие. Из-за низкого разрешения обозначения на многих рисунках читаются с трудом.

Высказанные замечания не затрагивают полученных результатов и сущности сделанных выводов, а также не влияют на общую положительную оценку рассматриваемой диссертации.

### **Заключение**

Диссертация Горяйновой Оксаны Сергеевны «Получение и использование однодоменных рекомбинантных антител для повышения эффективности исследований белков-маркеров в крови человека» представляет собой самостоятельное законченное научно-квалификационное исследование. Оно направлено на решение важной научной проблемы — получение и исследование новых реагентов, а также разработка методов на основе однодоменных антител, специфически связывающих заданные высоко представленные или низко представленные белки крови, для повышения эффективности диагностических анализов биомаркеров в крови человека. Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты могут использоваться для повышения качества и достоверности анализов, проводимых в условиях клинической лабораторной диагностики.

Диссертационная работа Горяйновой Оксаны Сергеевны «Получение и использование однодоменных рекомбинантных антител для повышения эффективности исследований белков-маркеров в крови человека» представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 — клиническая иммунология, аллергология, по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований соответствует требованиям пункта 9 «Положения о



присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335, от 02 августа 2016 года № 748, от 29 мая 2017 года № 650, от 28 августа 2017 года № 1024, от 01 октября 2018 года №1168 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 — клиническая иммунология, аллергология, а ее автор Горайнова Оксана Сергеевна заслуживает присуждение ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 — клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент:

заведующий лабораторией иммунохимии

Федерального государственного бюджетного учреждения

«Государственный научный центр «Институт иммунологии»

доктор биологических наук

(14.00.36 – аллергология и иммунология),

профессор

*Филатов*

Филатов Александр Васильевич

Дата: «24» марта 2020 года



Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства

115522, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24. Тел.: +7 (499) 311-67-78. e-mail: [info@nrcii.ru](mailto:info@nrcii.ru); сайт: <http://www.nrcii.ru/>