

ОТЗЫВ

официального оппонента, руководителя группы молекулярно-генетических основ онтогенеза, старшего научного сотрудника лаборатории проблем регенерации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, кандидата биологических наук, Микаеляна Арсена Суреновича на диссертационную работу Горяиновой Оксаны Сергеевны «Получение и использование однодоменных рекомбинантных антител для повышения эффективности исследований белков-маркеров в крови человека», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Актуальность работы

Ранняя диагностика заболеваний является ключевым фактором для лечения с наибольшим потенциалом успеха. Биомаркеры - это индикаторы как нормального состояния организма, так и патогенных процессов или фармакологических реакций на терапевтическое вмешательство. Они играют жизненно важную роль в выявлении ранних стадий заболевания и последующего наблюдения за динамикой лечения.

Клеточные и биохимические компоненты крови играют центральную роль в физиологии человека, и считается, что их динамические уровни коррелируют со здоровым или болезненным состоянием человека. Клинический анализ крови является одной из наиболее распространенных диагностических процедур в медицине. Кровь состоит из 55% плазмы и 45% форменных элементов. В последнее время благодаря впечатляющему развитию новых протеомных стратегий особое внимание ученых сосредоточено на исследовании сигнатуры протеома и поиску новых перспективных биомаркеров в плазме или сыворотки крови. Плазма крови содержит секретируемые белки, происходящие из множества органов и тканей. Таким образом, информация о растворимых белках на основе сыворотки крови может предоставить бесценную клиническую информацию о состоянии пациента и использоваться в качестве диагностического инструмента.

Несмотря на различные технические трудности в существующих технологиях обнаружения биомаркеров, их потенциал недостаточно раскрыт. Некоторые особо информативные биомаркеры часто присутствуют в очень низких концентрациях и находятся в смеси с другими белками, в том числе высокопредставленными, что затрудняет их идентификацию. Антитела являются одним из основных инструментов, используемым в клинической практике для обнаружения биомаркеров. Они должны

соответствовать определенным критериям, а именно: обладать высокой специфичностью к антигену, стабильностью и биологической функциональностью.

Не так давно были обнаружены однодоменные антитела (наноантитела) у верблюдовых и некоторых позвоночных таких, как акулы. Они обладают некоторыми преимуществами по сравнению с каноническими антителами: они имеют небольшой размер, высокую стабильность и уникальность распознавания эпитопов, что дает возможность для разработки новых эффективных биотехнологических приложений. Работа О.С. Горяиновой посвящена разработке уникальных методов и реагентов на основе однодоменных антител, направленных как на поиск и исследование новых биомаркеров, так и на улучшение диагностического потенциала их детекции.

В связи с вышесказанным, актуальность работы кандидатской диссертации О.С. Горяиновой не вызывает сомнений.

Научная новизна работы

Целью работы Горяиновой Оксаны Сергеевны было получение и исследование новых реагентов и методов на основе однодоменных антител, специфически связывающих заданные высокопредставленные или низкопредставленные белки крови, для повышения эффективности диагностических анализов биомаркеров в крови человека.

Для реализации поставленной цели выбранные задачи диссертационной работы логичны и последовательны.

Для получения новых однодоменных рекомбинантных антител, связывающих высокопредставленные белки плазмы крови человека, впервые была использована процедура их последовательного и поэтапного генерирования, в качестве антигенного материала использовалась плазма крови человека. После проведения процедур селекций были отобраны и охарактеризованы новые однодоменные антитела, связывающие сывороточный альбумин, IgG, IgA, IgM, фибриноген, альфа-2-макроглобулин, трансферрин.

Полученные однодоменные антитела были использованы для создания индивидуальных иммуносорбентов, с высокой специфичностью связывающих вышеобозначенные высокопредставленные белки. Иммуносорбенты использовались для специфической предобработки препаратов плазмы крови с целью повышения качества детекции в них методом иммуноферментного анализа некоторых менее представленных белков, что было показано на примере белка лактоферрина. На примере карциноэмбрионального антигена было показано, что использование полученных

иммуносорбентов не приводит к потере этого низкопредставленного диагностически важного белка.

Были получены однодоменные антитела, связывающие белок интерлейкин-6, использование которых может обеспечить специфическое обогащение и выделение как данного белка из плазмы крови человека, так и связанных с ним субпротеомов.

Степень обоснования и достоверности полученных результатов

Исследования О.С. Горяиновой базируются на использовании данных современной биомедицинской науки. В работе использовались современные методы молекулярной биологии и иммунологии. Выводы обоснованы, достоверны и соответствуют содержанию работы.

По результатам работы сделано 8 публикаций, 4 из которых опубликовано в журналах из базы данных Scopus, в том числе 3 из которых включены в перечень изданий, рекомендуемых ВАК. Результаты представлены на нескольких международных конференциях. Также получено 2 патента на изобретение.

Значимость для науки и практики выводов и рекомендаций

Использование отобранных и охарактеризованных новых однодоменных антител и иммуносорбентов, созданных на их основе, способных с высокой специфичностью связывать некоторые высокопредставленные белки плазмы крови человека, имеет большое теоретическое и практическое значение.

Предобработанные и истощённые от некоторых высокопредставленных белков препараты плазмы крови человека могут использоваться как более подходящие образцы для постановки диагностически значимых анализов в условиях клинической лабораторной диагностики. В отличие от исходных препаратов, в таких образцах отсутствуют белки, вызывающие повышение уровня неспецифического, фонового сигнала, и, соответственно, детекция низкопредставленных диагностически ценных белков в такой предобработанной плазме крови будет более достоверна и надёжна.

Благодаря использованию новых однодоменных антител и иммуносорбентов на их основе возможно выделение субпротеомов и молекул, находящихся в связанном состоянии с такими белками плазмы крови как альбумин, иммуноглобулины А, G и М, фибриноген, альфа-2-макроглобулин, трансферрин.

Полученные реагенты и методы могут использоваться для создания биспецифических конструкторов с целью повышения времени циркуляции лекарственного препарата в крови или же для адресной доставки терапевтического агента в определенные ткани и органы.

Новые однодоменные антитела, связывающие интерлейкин 6, могут использоваться для его детекции в условиях лабораторной диагностики, а также для определения молекул, находящихся в связанном с ним состоянии.

Оценка оформления, содержания и завершенности диссертации

Диссертационная работа, изложенная на 167 стр., включает 176 литературных источников, 22 иллюстрации и 3 таблицы. Диссертация имеет стандартную структуру, представленную главами: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Заключение», «Выводы», «Практические рекомендации, внедрение результатов в практику и перспективы дальнейшей разработки темы», «Список сокращений» и «Список литературы».

Обзор литературы состоит из двух основных разделов и девяти подразделов. В обзоре достаточно подробно и полно освещено современное состояние науки в области изучения и перспектив применения однодоменных антител. Первый раздел литературного обзора посвящен структурно-молекулярной характеристике и методам получения однодоменных антител. Сравнительный анализ пространственной организации и молекулярной структуры канонических и однодоменных антител дает полное представление о возможностях и перспективах применения последних в клинической практике. Необходимо отметить, что особый интерес имеет раздел, посвященный клонированию нуклеотидных последовательностей, кодирующих однодоменные антитела. В этом разделе автор показывает перспективы получения уникальных библиотек-антител с полным спектром паратопов к антигенам чужеродных белков.

Вторая часть обзора посвящена протеому крови. Раздел написан подробно и раскрывает все аспекты современных исследований и методологических подходов как для анализа белков, так и для диагностики и поиска новых биомаркеров крови.

В завершении хотелось бы отметить, что литературный обзор написан хорошим научным языком и хорошо структурирован.

Однако несмотря на то, что обзор написан достаточно подробно, у меня есть два вопроса, касающиеся темы диссертации:

1. Какова биологическая роль однодоменных антител у верблюдовых? Известно, что у них есть и классические антитела.
2. На сколько перспективны наноантитела для таргетной терапии, учитывая их уникальные характеристики.

Глава **«Материалы и методы»** содержит список методов и подходов, использованных в работе. Все методы соответствуют цели и решению поставленных задач.

В главе **«Результаты»** последовательно приведены данные, полученные в ходе эксперимента в соответствии с поставленными задачами. Данный раздел хорошо аргументирован и убедителен. Сначала диссертант отработал метод получения рекомбинантных антител с помощью белка маркера макрофагов F4/80. Автором была проведена серия иммунизаций верблюда рекомбинантным белком F4/80, затем из плазмы крови животного были выделены лимфоциты и моноциты, из которых была выделена мРНК. На основе мРНК синтезировалась кДНК и клонировалась в фаговый вектор рНЕН4. В результате были получены фаговые частицы, на поверхности которых экспрессировались наноантитела. Селекция проводилась с помощью фагового дисплея. В результате вышеперечисленных процедур автор получил 9 клонов несущих наноантитела к белку F4/80. Полученные наноантитела были охарактеризованы и протестированы на специфичность к антигену.

Автор применил схожий подход для получения однодоменных антител к плазме человека. Принципиальным моментом здесь было то, что для иммунизации верблюда использовалась сложная белковая смесь – плазма крови человека. В результате этой работы О.С. Горяиновой были получены клоны наноантител к высокопредставленным белкам плазмы крови человека. Полученные антитела к мажорной белковой фракции плазмы позволили автору разработать оригинальный метод предобработки препаратов крови человека с целью повышения эффективности диагностического анализа маркерных белков крови (что было показано на примере белка лактоферрина).

В заключение нужно отметить, что достоверность полученных результатов не вызывают сомнений. Все процедуры проведенных экспериментов подробно описаны и содержат все необходимые контроли.

Глава **«Обсуждение результатов»** содержит обсуждение полученных автором результатов. В главе автор рассматривает возможные преимущества выбранных подходов и разработок полученных результатов.

Главы **«Заключение»** и **«Выводы»** согласуются с полученными результатами и соответствуют поставленным задачам данной работы.

Диссертационная работа О.С. Горяиновой представляет собой завершённое исследование, посвящённое актуальной теме, выполненное на высоком современном методическом уровне, имеет существенное теоретическое и практическое значение.

Таким образом, диссертационная работа Оксаны Сергеевны Горяиновой «Получение и использование однодоменных рекомбинантных антител для повышения эффективности исследований белков-маркеров в крови человека» является законченной работой, отвечающей требованиям ВАК пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (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 Оксана Сергеевна Горяинова заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Официальный оппонент, старший научный сотрудник
лаборатории Проблемы регенерации
ФГБУН Институт биологии развития
им. Н.К.Кольцова Российской академии наук,
кандидат биологических наук
Ул. Вавилова, 26; 119334 Москва, Россия
E-mail: arsmikael@gmail.com
Телефон (раб.): +7(499)1353203



Микаелян Арсен Суренович

29.03.2021

Подпись к.б.н. Микаеляна А.С.
«Удостоверяю»
Ученый секретарь ИБР РАН
кандидат биологических наук



Хабарова Марина Юрьевна