



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Мясникова-Масляя, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

29.03.2021
4.10-48-363

«УТВЕРЖДАЮ»
ВРИО Директора Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
академик
Габибов А.Г.
«29» марта 2021 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о диссертационной работе 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 исследования

Белковый состав сыворотки и плазмы крови отличается высоким разнообразием, а количественная представленность отдельных белков может быть использована в качестве критерия для диагностики различных патологических состояний и отслеживания происходящих в организме процессов. Препятствием этому является тот факт, что более 99% массовой доли белков крови составляют 22 высокопредставленных белка. Для точного количественного анализа минорных белковых компонентов крови, а также отдельных протеомных комплексов, ассоциированных с мажорными белками, необходим инструментарий, обеспечивающий выделение либо удаление отдельных белковых фракций. Такую функцию могут выполнять иммуносорбенты на основе однодоменных антител (наноантител). Наноантитела представляют собой компактные фрагменты антигенраспознающих участков особых тяжелоцепочечных антител, которые имеются у представителей семейства Верблюдовые и некоторых хрящевых рыб. Для таких молекул характерна высокая стабильность, хорошая растворимость и высокая способность к

ренатурации, а протяженный участок CDR3 обеспечивает им способность к распознаванию сложных эпитопов, которые могут быть недоступны для антител традиционной структуры. Такой тип молекул сочетает ряд характеристик, с одной стороны облегчающих процесс отбора и получения наноантител к заданному антигену, а с другой – повышающих потенциальные эксплуатационные свойства иммуносорбентов на их основе за счет более широкого диапазона рабочих условий и простоты регенерации.

Работа посвящена получению новых методов выделения отдельных белковых компонентов крови с целью повышения эффективности и надежности проводимых диагностических анализов (в частности, иммуноферментного анализа).

В связи с вышеизложенным, диссертационная работа Горяиновой О.С., "Получение и использование однодоменных рекомбинантных антител для повышения эффективности исследований белков-маркеров в крови человека", посвященная получению и исследованию новых методов выделения отдельных белков крови при помощи наноантител и дальнейшему использованию полученных реагентов и методов для повышения качества диагностических анализов, обладает высокой актуальностью.

Научная новизна работы и практическая ценность результатов

В настоящей работе впервые описан и применен квазициклический процесс последовательного генерирования однодоменных наноантител к основным антигенам комплексной субпротеомной смеси на примере получения наноантител к нескольким высокопредставленным белкам плазмы крови человека. Была проведена последовательная селекция, результатом которой явилось получение новых высокоспецифичных наноантител к ряду мажорных белков – сывороточному альбумину, IgG, IgA, IgM, фибриногену, альфа-2-макроглобулину и трансферрину.

На основе отобранных антител были получены новые иммуносорбенты, которые позволяют проводить высокоспецифичное удаление либо обогащение конкретного белка плазмы. Для полученных сорбентов показана высокая эффективность предобработки плазмы для проведения последующего иммуноферментного анализа на примере диагностически-важного белка лактоферрина. Возможность использования созданных иммуносорбентов для предобработки плазмы и последующего обнаружения конкретных низкопредставленных белков продемонстрирована на примере карциноэмбрионального антигена.

Также в результате работы были отселектированы наноантитела к интерлейкину-6, который является диагностически-важным белком крови, полученные наноантитела могут быть использованы для выделения целевого маркерного белка и ассоциированных с ним молекул.

Связь новизны исследования с планами соответствующих отраслей науки

Диссертационная работа Горяйновой Оксаны Сергеевны выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук в рамках НИР:

1. «Создание новых иммуносорбентов и диагностических методов, основанных на использовании однодоменных антител, для высокочувствительного исследования маркерных белков в крови и/или слюне человека» (№ 0100-2016-0016).

2. «Разработка стратегий диагностики и лечения заболеваний, основанная на познании механизмов иммунной защиты и природы пластичности стволовых клеток» (№ 011-2019-0011).

Значимость для науки и производства полученных автором диссертации результатов

Полученные в результате выполнения диссертационной работы методологические результаты, связанные с разработкой технологии создания и адаптации наноантител для решения конкретных медицинских и биологических задач позволяют проводить получение принципиально новых материалов для диагностики, исследования, а также создания иммунотерапевтических препаратов и вакцин. Предварительная обработка комплексной смеси белков, например, плазмы крови, иммуносорбентами, может позволить существенно улучшить качество анализов биомаркеров при помощи масс-спектрометрии: обедненные мажорными белками препараты плазмы и сыворотки крови могут позволить проводить более чувствительную детекцию при помощи иммунохимических методов, в частности, иммуноферментного анализа за счет снижения уровней неспецифического сигнала и вероятности интерференции компонентов смеси, удаление отдельных мажорных белков может также повысить стабильность препаратов и обеспечить их более длительное хранение.

В практическом плане, полученные в результате работы наноантитела к высокопредставленным белкам крови могут использоваться для их специфического удаления из смеси перед проведением анализа, либо же специфического выделения протеомных комплексов, ассоциированных с конкретным мажорным белком для их последующего исследования. Таким образом возможно выделение протеомных комплексов, ассоциированных с сывороточным альбумином, иммуноглобулином G, иммуноглобулином A, иммуноглобулином M, фибриногеном, альфа-2-макроглобулином и трансферрином для последующего определения отдельных антигенов, ассоциированных с тем или иным протеомным комплексом.

Полученные результаты могут быть использованы для создания бивалентных биспецифических молекул, связывающихся с мажорным белковым компонентом крови для модификации времени полувыведения и доставки лекарственных молекул в определенные органы или ткани, а наноантитела к интерлейкину-6, который является провоспалительным

цитокином, могут быть применены для повышения чувствительности методов его детекции в лабораторной диагностике.

Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается достаточным объемом исследований и применением самых современных инструментальных исследовательских методов. Работа апробирована на межлабораторном семинаре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН) — протокол №1 от 18 июня 2020 г.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 8 научных работах, в том числе, в 4 статьях в научных журналах, включенных в базу данных Scopus и в 3 статьях в рецензируемых научных изданиях, рекомендуемых ВАК, 4 тезисах научных конференций, доложены на 19-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2015), на 20-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2016), по результатам исследований получено 2 патента на изобретение. Полученные результаты достоверны, выводы аргументированы.

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертационная работа написана хорошим и грамотным научным языком и построена по традиционной форме. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, внедрения результатов исследования в практику, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы и благодарностей. Диссертация изложена на 167 страницах, иллюстрирована 22 рисунками и тремя таблицами, в библиографическом указателе приведено 176 литературных источников. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации и отражает основные результаты диссертационного исследования.

Замечания к работе

К работе не имеется принципиальных замечаний. Некоторым недостатком можно считать, что в списке опубликованных работ отсутствуют публикации в зарубежных изданиях. Работа заслуживает положительной оценки.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Горяиновой Оксаны Сергеевны "Получение и использование однодоменных рекомбинантных антител для повышения эффективности исследований белков-маркеров в крови человека" является полной и законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора биологических наук


Тиллиба Сергея Владимировича, содержащей разработку 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, представленной к защите 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 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 Горайнова Оксана Сергеевна несомненно заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология.

Отзыв на диссертационную работу Горайновой Оксаны Сергеевны обсужден и одобрен на семинаре отдела пептидно-белковых технологий Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (протокол №1 от 25 марта 2021 года).

Старший научный сотрудник

группы экспрессии белковых факторов роста и дифференцировки

к.б.н.

 Чумаков Степан Петрович

Подпись к.б.н. Чумакова С.П. заверяю

Ученый секретарь института

доктор физико-математических наук



 Олейников Владимир Александрович

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук
117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10