

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биологии гена Российской академии наук  
(ИБГ РАН)

Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334

Тел.: (499)135-60-89, (499)135-98-84 Факс: (499)135-41-05

e-mail: [info@genebiology.ru](mailto:info@genebiology.ru); <http://www.genebiology.ru>

ОКПО 00244660 ОГРН 1027739618037 ИНН/КПП 7736020369/773601001

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)  
академик Георгиев П.Г.



13 июля 2020 года

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)

Диссертация Горяиновой Оксаны Сергеевны «Получение и использование однодоменных рекомбинантных антител для повышения эффективности исследований белков-маркеров в крови человека» выполнена в лаборатории молекулярных биотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН).

В 2013 году Горяинова О.С. окончила биологический факультет федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный университет» (с 2015 года – федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева») по специальности «Биология». После окончания университета Горяинова О.С. проходила обучение в аспирантуре Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова с 2013 по 2017 год. В период подготовки диссертации соискатель Горяинова Оксана Сергеевна работала в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии гена Российской академии наук, в лаборатории молекулярных биотехнологий старшим лаборантом с 2014 до 2016 года и младшим научным сотрудником с 2016 года по сегодняшний день.

Соискатель успешно окончила аспирантуру, кандидатские экзамены сданы в полном объеме. Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана в 2017 году Московским государственным университетом им. М.В. Ломоносова. 18 ноября 2019 года после сдачи кандидатского экзамена по специальности 30.06.01 - «Фундаментальная медицина», по

специальности 14.03.09 - «клиническая иммунология, аллергология» Федеральным бюджетным учреждением науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека выдана справка об обучении № 419.

Научный руководитель – доктор биологических наук Тиллиб Сергей Владимирович, заведующий лабораторией молекулярных биотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук.

По итогам рассмотрения диссертации принято следующее заключение:

Представленная диссертационная работа является самостоятельно выполненной, законченной научно-исследовательской работой, посвященной получению и использованию однодоменных рекомбинантных антител с целью повышения эффективности исследований белков-маркеров в крови человека.

## **1. Актуальность работы**

Создание новых инструментов и методов для улучшения качества диагностики и терапии - одна из наиболее актуальных на сегодняшний день задач. В клинической диагностике плазма и/или сыворотка крови являются одними из наиболее часто используемых биологических жидкостей. При этом кровь представляет собой сложную смесь белков, количественное распределение которых весьма разительно. Так, всего лишь около 20 белков составляют 99% тотальной белковой массы крови. И, несмотря на то, что такие белки сами по себе являются диагностически ценными маркерами, имеет место быть их значительный вклад в создание ложных результатов при анализах менее представленных белков, являющихся ценными маркерами различных заболеваний и патологических процессов. Создание иммуносорбентов на основе однодоменных антител, позволяющих с высокой специфичностью удалять заданные высокопредставленные белки, не теряя при этом целевые низкопредставленные антигены, которые будут использоваться в последующих диагностических анализах, видится актуальной и востребованной задачей сегодняшнего дня.

## **2. Новизна и практическая значимость**

В рамках выполнения диссертационной работы впервые получены и охарактеризованы однодоменные антитела и иммуносорбенты на их основе, специфически связывающиеся с рядом мажорных белков плазмы крови. Идентифицированы их мишени, такие как сывороточный альбумин, IgG, IgA, IgM, фибриноген, альфа-2-макроглобулин, трансферрин. С помощью новых, полученных автором, иммуносорбентов показана эффективность детекции названных мажорных белков крови методами твердофазного иммуноферментного анализа и иммуноаффинной хроматографии. Продемонстрирована высокая эффективность и специфичность работы полученных иммуносорбентов для предобработки препаратов крови. На примере иммуноферментной детекции в препаратах крови продемонстрирована возможность снижения неспецифического фона путем специфического истощения препаратов крови с помощью полученных иммуносорбентов.

В ходе выполнения данной работы получены рекомбинантные однодоменные антитела, являющиеся надёжным инструментарием для создания на их основе иммуносорбентов, обладающих потенциалом для их использования в различных приложениях. В качестве матрицы для создания подобных иммуносорбентов могут использоваться сефароза, магнитные

частицы, мембраны из различных материалов. Полученные в ходе выполнения диссертационной работы данные об эффективности предобработки плазмы крови с помощью иммуносорбентов на основе однодоменных антител могут использоваться для повышения качества клинической лабораторной диагностики, для снижения вероятности ложноположительных и ложноотрицательных результатов при постановке диагностически важных анализов, в частности, иммуноферментного анализа.

Часть из полученных однодоменных антител запатентована. Результаты и данные, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, используются для проведения экспериментов в лаборатории молекулярных биотехнологий ИБГ РАН, а также в рамках обучения студентов бакалавриата 4 курса на занятиях «Практикум по иммунологии». В частности, студентами изучается ряд методов и разработок, которые непосредственно использовались для получения результатов диссертационной работы Горяиновой Оксаны Сергеевны, как то: генерирование и селекция рекомбинантных антител методом фагового дисплея, проведение их селекции/«паннинга», а также функциональный анализ отбираемых клонов.

### **3. Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации**

Темой данного исследования автор занимается с момента поступления в аспирантуру (с 2013 года). Автор принимал непосредственное участие во всех основных этапах работы. Процедуры иммунизации верблюда плазмой крови человека проводились научным руководителем соискателя - Тиллибом С.В. Стадии селекции, отбора, анализа, наработки и очистки отбираемых однодоменных антител, создание специфических иммуносорбентов на их основе, отработка условий иммуноферментного анализа препаратов плазмы и (или) сыворотки крови проводились автором лично.

### **4. Степень достоверности результатов проведенных исследований**

О достоверности полученных результатов свидетельствует значительный объём проделанных исследований с применением высокотехнологичных современных биотехнологических и иммунологических методов исследований. Основные результаты опубликованы в рецензируемых научных журналах и представлены на нескольких международных конференциях.

### **5. Научная зрелость соискателя**

За время работы Горяиновой О.С. были освоены разнообразные современные методы молекулярной биологии, иммунологии, биотехнологии. Горяинова О.С. проявила себя как ответственный, высококвалифицированный специалист, способный к решению новых сложных научных задач. По теме диссертации соискатель имеет 8 публикаций, из них 4 статьи в журналах, индексируемых в базе данных Scopus, в том числе 3 работы в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 4 тезисов научных конференций, а также оформлено 2 патента.

### **6. Специальность, которой соответствует диссертация**

Диссертационная работа Горяиновой О.С. «Получение и использование однодоменных рекомбинантных антител для повышения эффективности исследований белков-маркеров в крови человека», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук, по своей теме, содержанию и полученным результатам соответствует

специальности 14.03.09 – «клиническая иммунология, аллергология». Тема диссертации была утверждена в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова (протокол №8 заседания Ученого совета Биологического факультета от 26 октября 2017 г.).

## **7. Перечень работ, в которых отражены основные научные результаты диссертационной работы**

### **Публикации:**

1. Тиллиб С.В. Получение и характеристика рекомбинантных однодоменных антител из ламы, специфически связывающихся с интерлейкином-6 человека / Тиллиб С.В., Ефимов Г.А., Губернаторова Е.О., Горяйнова О.С., Иванова Т.И., Бочаров А.А., Гончаров А.Г., Розе-Ион Штефан, Круглов А.А., Друцкая М.С., Недоспасов С.А. // Российский иммунологический журнал. – 2015. - т. 9. - № 18. С. 400-409.
2. Мохонов В.В. Новые биспецифические белки, связывающие цитокины и поверхностные маркеры миелоидных клеток. / Мохонов В.В., Шилов Е.С., Корнеев К.В., Атретханы К-С Н., Горшкова Е.А., Жданова А.А., Василенко Е.А., Горяйнова О.С., Купраш Д.В., Тиллиб С.В., Друцкая М.С., Ефимов Г.А., Недоспасов С.А. // Российский иммунологический журнал. – 2015. - т. 10. - № 19. - С. 378-385.
3. Горяйнова О.С. Новый метод, базирующийся на использовании иммобилизованных однодоменных антител для удаления определенных мажорных белков из плазмы крови, способствует уменьшению неспецифического сигнала в иммуноанализе / Горяйнова О.С., Хан Е.О., Иванова Т.И., Тиллиб С.В. // Медицинская иммунология. - 2019. - т. 21 – № 23 - С. 567-575.
4. Горяйнова О.С. Метод параллельного и последовательного генерирования однодоменных антител для протеомного анализа плазмы крови человека / Горяйнова О.С., Иванова Т.И., Рутовская М.В., Тиллиб С.В. // Молекулярная биология. – 2017. - т. 51. - № 6 - С. 985-996.

### **Патенты:**

1. Патент 2599423 Российская Федерация, МПК С07К 16/28 (2006.01), G01N 33/53 (2006.01), А61К 39/395 (2006.01), А61К 47/46 (2006.01). Рекомбинантные однодоменные антитела, специфически связывающие белок F4/80, способ их получения и использования для детекции этого белка. / Тиллиб С.В., Недоспасов С.А., Ефимов Г.А., Розов Ф.Н., Горяйнова О.С., Иванова Т.И., Рутовская М.В. Заявители и патентообладатели: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН) (RU), Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН) (RU). - № 2015131073/10; заявл. 28.07.2015; опубл. 10.10.2016, Бюл. № 28. -19с.
2. Патент 2603269 Российская Федерация, МПК С07К 16/24 (2006.01), С12N 15/13 (2006.01). Рекомбинантные однодоменные антитела, специфически связывающие интерлейкин-6 человека, способ их получения и использования для детекции этого белка / Тиллиб С.В., Недоспасов С.А., Ефимов Г.А., Друцкая М.С., Круглов А.А., Горяйнова О.С., Иванова Т.И. Заявители и патентообладатели: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН) (RU). - № 2015145831/10; заявл. 26.10.2015; опубл. 27.11.2016, Бюл. № 33. -15с.

### Тезисы конференций:

1. Горяйнова О.С., Иванова Т.И., Тиллиб С.В. Наноантитела как перспективный новый инструмент для повышения эффективности анализа белков плазмы крови // Сборник тезисов 19 международной Пушкинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука 21 века», 20-24 апреля 2015 г. / Пущино, 2015. - С. 15
2. Горяйнова О.С., Иванова Т.И., Тиллиб С.В. Комбинаторное использование создаваемых иммуноафинных колонок для повышения эффективности анализа протеома сыворотки крови человека // Сборник тезисов 20 международной Пушкинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука 21 века», 18-22 апреля 2016 г. / Пущино, 2016. - С. 220-221.
3. Тиллиб С.В., Иванова Т.И., Горяйнова О.С., Бурлин А.И., Хан Е.О., Добролюбова Ю.О. Перспективные направления использования однодоменных антител // Научные труды. Объединённый научный форум, включающий Международную научную конференцию по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды»: научные труды, 18-22 сентября 2017 г. / ИБХ РАН – Москва, 2017. – 46 с.
4. Tillib S.V., Goryainova O.S., Burlin A.I., Khan E.O., Ivanova T.I. Single-Domain Antibodies for Immunosorbent Ligands, Antigen Tracking in vivo Probes and for Antigen Mimicry // Abstract book: 1st Bonn Nanobody Symposium 2019, 5-6 september 2019 / University of Bonn – Bonn, Germany, 2019. – P. 37.

В диссертации соблюдены требования, установленные п. 14 (об отсутствии заимствований без ссылок на источник и авторов) "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650). Диссертация соответствует направлению 30.06.01 - «Фундаментальная медицина», по специальности 14.03.09 - «клиническая иммунология, аллергология».

Основные материалы диссертации изложены в работах, опубликованных соискателем ученой степени и соответствуют требованиям пп. 11-13 "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842).

Апробация диссертации Горяйновой О.С. проведена на заседании межлабораторного семинара ИБГ РАН 18.06.2020 г. Присутствовало на заседании 17 человек, из них докторов наук – 5 человек, кандидатов наук – 9 человек. Результаты голосования: "за" - 17 человек, "против" - 0 человек, "воздержалось" - 0 человек (протокол № 1 от «18» июня 2020 г).

Диссертация «Получение и использование однодоменных рекомбинантных антител для повышения эффективности исследований белков-маркеров в крови человека» Горяйновой Оксаны Сергеевны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.09 - «клиническая иммунология, аллергология».

Заместитель директора ИБГ РАН  
по научной работе  
д.б.н.

Ученый секретарь ИБГ РАН  
д.б.н.



Кангидзе О.Л.

Набирочкина Е.Н.