

**ОТЗЫВ официального оппонента**  
**на диссертацию на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук Ильиной Екатерины Николаевны**  
**на тему: «Получение и исследование свойств рекомбинантных антител к**  
**гликопротеину вируса бешенства для постэкспозиционной**  
**профилактики заболевания»**  
**по специальности 03.01.08 – «Биоинженерия»**

Рекомбинантные моноклональные антитела (мАТ) на сегодняшний день являются обширным классом лекарственных препаратов, для которых за прошедшие 30 лет доказаны терапевтические свойства по отношению к широкому спектру заболеваний (инфекционные, аутоиммунные, воспалительные и др.). Развитие мАТ берет свое начало с момента открытия в 1975 г. Кёлером и Мильштейном гибридной технологии, в результате чего появилась возможность получать антитела строгой, узкой специфичности. Эволюция терапевтических мАТ была направлена на снижение иммуногенности мышинных мАТ, что привело к созданию гуманизированных мАТ. Однако наиболее подходящим кандидатом для клинического применения являются полностью человеческие мАТ, которые характеризуются наименьшей иммуногенностью.

Одним из самых опасных инфекционных зоонозных заболеваний является бешенство, которое входит в список важнейших угроз для здоровья человека. Количество ежегодных смертельных случаев в мире, регистрируемых ВОЗ и оцененных в 60 000 человек являются неполными в связи с отсутствием соответствующего эпидемиологического надзора и лабораторной инфраструктуры, что особенно остро ощущается в развивающихся странах. Без проведения соответствующих мер профилактики, после проявления клинических симптомов, заболевание является летальным в абсолютном большинстве случаев. Единственным способом предотвращения развития инфекции у людей является

предэкспозиционная профилактика, представленная вакцинами, и постэкспозиционная профилактика, включающая комбинацию вакцинации и введения поликлональных антирабических иммуноглобулинов. Для пассивной иммунизации в настоящее время используются антирабический иммуноглобулин лошади (Equine rabies immunoglobulin, ERIG) и донорский антирабический иммуноглобулин человека (Human rabies immunoglobulin, HRIG). Однако в связи с недостаточным количеством RIG, особенно HRIG, а также по причине иммуногенности (в большей степени ERIG, конечно) и опасности переноса вирусных заболеваний, следуя рекомендациям ВОЗ, необходимо заменить поликлональные сыворотки на столь же эффективный и более безопасный и доступный препарат, которым являются гуманизированные или человеческие мАТ. При этом в связи с большим разнообразием штаммов вируса по всему миру, которые отличаются между собой точечными мутациями, локализованными, в том числе, в антигенных сайтах, продолжает существовать значительная потребность в новых вируснейтрализующих моноклональных антителах человека, имеющих высокий постэкспозиционный профилактический потенциал, в частности антителах, обладающих различной специфичностью по отношению к гликопротеину вируса бешенства. По этой причине актуальность диссертационной работы Ильиной Е. Н., посвященная получению и исследованию свойств рекомбинантных антител к гликопротеину вируса бешенства для постэкспозиционной профилактики заболевания, не вызывает сомнения. Для того чтобы получить кандидатный препарат, который способен эффективно осуществлять нейтрализацию вируса бешенства, обладать минимальной иммуногенностью и длительным временем полувыведения, необходимо разработать как минимум два вируснейтрализующих мАТ, характеризующихся неперекрывающейся специфичностью. Именно это и было сделано в работе Ильиной Е.Н., в которой были получены гуманизированное мАТ 1С5 и человеческое мАТ RabD4. Успешная работа с человеческими В-лимфоцитами иммунного

донора, являющаяся альтернативой дисплейным технологиям или В-клеточному клонированию, позволила выделить новое полностью человеческое мАТ. Стоит отметить, что работа с человеческими В-лимфоцитами сопряжена с рядом ограничений и осложнений, поэтому результаты диссертации Ильиной Е.Н. вносят важный практический вклад в данную область.

Диссертационная работа Ильиной Е.Н. написана по традиционному плану и включает все необходимые разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы из 110 источников. Работа изложена на 115 страницах, снабжена 29 рисунками и 11 таблицами.

Подготовленный автором обзор литературы включает подробное описание строения и патогенеза вируса бешенства, особое внимание уделяется строению гликопротеина вируса бешенства и его антигенным свойствам, рассматриваются существующие способы профилактики заболевания бешенства у людей, обсуждаются их плюсы и минусы. Отдельная глава посвящена способам получения терапевтических мАТ к гликопротеину вируса бешенства, выделены основные требования, которым должны соответствовать такие мАТ. Также представлена современная эпидемиологическая ситуация по бешенству в мире и в России. Таким образом, предлагаемый обзор хорошо раскрывает обозначенную проблему, подготавливая к изложению экспериментальных данных. Ясно, что автором проработан и проанализирован большой объем материала, который ему удалось представить ёмко и понятно.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробное описание методов, которые были использованы автором. Список методов обширен: работа с первичными культурами клеток (выделение человеческих клеточных субпопуляций, получение иммунных В-лимфоцитов, создание

гетерогбридом), разнообразные генно-инженерные работы, хроматографические методы, работа с культурой клеток млекопитающих – СНО и иммунохимические методы.

Соответствие использованных методов и технологий поставленным задачам не вызывает сомнения. Использование для характеристики МАТ, полученных Ильиной Е.Н., стандартных международных методов в этой области, а также конструирование и выделение МАТ CR57 и МАТ CR4098 (компания Crucell), которые применялись в работе для определения специфичности МАТ 1C5 и RabD4 и в качестве положительных контролей, подтверждает достоверность данных, выносимых на защиту.

В разделе «Результаты и обсуждение» автор подробно описывает итоги проделанной работы. Ознакомившись с этой главой, становится понятно, что все поставленные задачи выполнены. Авторам удалось получить новые высокоаффинные МАТ, изучить их специфичность, установить нейтрализующую активность по отношению к вирусу бешенства штамм CVS-11 как в *in vitro* экспериментах, так и в модели на мышах *in vivo*. Также использование клеток СНО для экспрессии рекомбинантных полноразмерных МАТ способствует дальнейшей реализации проекта. Публикации соответствуют тематике выполненной работы, опубликованные данные вытекают из результатов исследования.

По диссертации имеются некоторые замечания.

В Выводе 2 вместо фразы "Использованный метод *in vitro* стимуляции и иммортализации В-лимфоцитов» следовало использовать более конкретное описание метода.

Очень важным моментом диссертации явилось использование антител сравнения CR57 и CR4098 (Crucell), однако вынесение в виде отдельного вывода диссертации информации о синтезе генов этих известных антител мне представляется излишним. Я считаю, что этот вывод можно было бы опустить.

Вывод 7 является содержательным и точным. В нем говорится не только о нейтрализующей активности полученных антител, но также приводятся численные значения этой нейтрализующей активности. В отличие от этого выводы 4 и 6 являются слишком общими и не содержат необходимой конкретики. В Положении, выносимым на защиту №5 ясно декларируется, что должны быть получены антитела с высоким значением константы диссоциации комплекса мАТ-ГПВБ:  $6,6 \times 10^{-9}$  М и  $2,2 \times 10^{-9}$  М. Судя по Результатам работы эти показатели были достигнуты автором, и соответственно должны быть отражены в Выводах.

Имеются также замечания по терминологии и оформлению диссертации. Следует заметить, что «иммуноблоттингу» (стр 93) подвергается антиген, а не антитела. Спорной является фраза на стр 11 «легкая цепь каппа-изотипа». Рисунки 15 – 17 называются как «SDS-ПААГ образцов». В подписях к рисункам следовало уточнить образцов чего.

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

### **Заключение**

Диссертационная работа Екатерины Николаевны Ильиной «Получение и исследование свойств рекомбинантных антител к гликопротеину вируса бешенства для постэкспозиционной профилактики заболевания», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством кандидата химических наук Алиева Теймура Кантамировича и доктора биологических наук Долгих Дмитрия Александровича. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.08 – «Биоинженерия» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в

Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Ильина Е.Н. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.08 – «Биоинженерия».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,  
заведующий лабораторией иммунохимии  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
«Государственный научный центр «Институт иммунологии»  
Федерального медико-биологического агентства России  
Филатов Александр Васильевич

*Филатов*  
18 ноября 2019

Контактные данные:

тел.: +7-916-396-04-13, e-mail: avfilat@yandex.ru  
Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:  
14.00.36 – Аллергология и иммунология

Адрес места работы:

115522, (Российская Федерация) г. Москва, ул. Каширское шоссе, д. 24,  
ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России  
Тел.: +7 (499) 311-67-78; e-mail: info@nrcii.ru

Подпись *Филатова А. В.*  
**ЗАВЕРЯЮ**  
Учёный секретарь ФГБУ  
«ГНЦ Институт иммунологии»  
ФМБА России  
*Александр Васильевич*  
18 ноября 2019

