



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
(ФГБНУ «ИЭМ»)

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук профессора ШАБАНОВА Петра Дмитриевича
на диссертацию Некрасовой Ксении Александровны «Экспериментальное
исследование рекомбинантного антитела, блокирующего активацию
комплемента, при травматическом повреждении головного мозга»,
представленную к публичной защите
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Актуальность проблемы

Поиск и изучение новых биотехнологических препаратов на основе рекомбинантных гуманизированных антител относится к одной из ведущих биомедицинских проблем во всем мире. Это связано с: 1) созданием и внедрением в практику в последние годы лекарственных препаратов на основе антител для лечения сосудистых заболеваний типа пароксизмальной ночной гемоглобинурии (экулизумаб, равулизумаб), макулярной дегенерации (тезидолумаб, авакопан) и других; 2) частичным пересмотром представлений о патогенезе сердечно-сосудистой патологии с акцентом на повышение значения систем врожденного иммунитета, в частности, белков комплемента, выполняющих роль индукторов аутоагрессивных комплексов, способных повреждать собственные клетки и ткани мозга; 3) разработкой альтернативных путей коррекции распространенных вариантов болезней сердца и сосудов (ишемическая болезнь сердца, хроническая недостаточность мозгового кровообращения, ишемические повреждения внутренних органов) с участием препаратов, минимизирующих или преодолевающих защитные функции врожденного иммунитета. Все это послужило отправной точкой в исследовании К.А. Некрасовой, работа которой посвящена анализу оригинальных

Вх. № 48
« 06 » 12 2022 г.
ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России
Диссертационный совет

гуманизированных антител hC34 в качестве ингибиторов комплемента, избирательно блокирующих активацию только альтернативного пути, не затрагивающих каскады классического и лектинового пути, при этом сохраняющих противоинфекционную активность и другие полезные функции системы комплемента.

Диссертационное исследование К.А. Некрасовой фундаментально по сути и направлено на практическое внедрение полученных результатов. Автор поднимает целый новый пласт идей, уточняет методы их реализации, проводит анализ фармакологических возможностей, наконец, формулирует оригинальный подход к лечению травматических повреждений мозга, фактически обосновывая новую технологию лечения, разработанную и продуктивно примененную автором на доклиническом уровне исследований.

Работа выполнена в рамках научно-исследовательских программ, разрабатываемых в ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА РФ, где традиционно уделяют много внимания изучению фундаментальных и прикладных аспектов биомедицинской науки, что лишний раз подтверждает востребованность научного изучения данной проблемы.

Оценка наиболее значимых результатов, полученных автором

Целью исследования диссертанта было экспериментальное обоснование подхода к лечению травматического повреждения головного мозга, основанного на блокировании активации комплемента с помощью рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 к неадетерминанте C3 компонента комплемента человека. На основании цели сформулированы конкретные задачи исследования (их 4), касающиеся главным образом выяснения механизма действия рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 *in vitro*, оценки его специфической фармакологической активности, основных фармакокинетических параметров кандидатного соединения и оценки безопасности лекарственной формы рекомбинантного

гуманизированного антитела hC34 по показателям острой и хронической токсичности, аллергенности и иммунотоксичности.

Для решения этих вопросов автор использовал большой набор современных биотехнологических, фармакологических, биохимических, морфологических и клинико-лабораторных методов исследования. Постановка цели и задач работы понятны, конкретны и логичны. Примененные методы исследования, а также характер и количество полученного материала адекватны цели и задачам диссертации. Значительный объем данных, их статистическая обработка, компоновка и дизайн работы, представление и высокий уровень анализа позволяют считать результаты диссертационной работы достоверными, а положения и выводы вполне обоснованными. Заключение и выводы показывают, что основные цель и задачи исследования, поставленные в работе, достигнуты.

Методология исследований была традиционной и включала биотехнологические и классические методы оценки фармакологической активности нового соединения *in vivo* и *in vitro*, а также оценку его молекулярного механизма действия и фармакокинетической судьбы в организме. Все исследования проведены на сертифицированном оборудовании.

В процессе исследований диссертантом был выявлен ряд важных закономерностей и находок. Так, в работе убедительно доказано, что рекомбинантное гуманизированное антитело hC34 блокирует альтернативный путь активации комплемента в молярном недостатке по отношению к общему количеству C3 в пробах плазмы крови. При этом выявлено, что аналог рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 (моноклональное антитело 3A8, специфичное C3 компоненту комплемента крысы) проявляет церебропротекторную активность в модели закрытой черепно-мозговой травмы у крыс. Важно отметить, что созданная автором лекарственная форма рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 при внутривенном введении в дозах, значимо превосходящих терапевтическую дозу для человека, не токсична для лабораторных

животных в остром и хроническом эксперименте и не обладает аллергизирующими и иммунотоксическими свойствами.

Результаты исследований репрезентативны, объемны, корректно обработаны и представлены и, безусловно, не вызывают сомнений.

Обоснованность и достоверность результатов исследования

Представленный большой объем экспериментальных данных (исследования выполнены с применением биотехнологических приемов и рекомбинантных технологий для получения рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 на основе клеток-продуцентов CHO-humC34, анализом самих антител и их лекарственной формы в виде лиофилизата для приготовления раствора для внутривенного введения, оценки видовой кросс-реактивности антител hC34 с сыворотками крови человека и различных животных методом ИФА, изучения специфической фармакологической активности антител на крысах, перенесших черепно-мозговую травму, изучением фармакокинетики антител у крыс после внутривенного введения, наконец, оценке безопасности на основании острой и хронической токсичности, аллергенности и иммунотоксичности у животных), соответствие дизайна исследования критериям доказательной медицины, комплексное обследование биотехнологических соединений с использованием современных методов, включая корректную статистическую обработку полученных данных, четкое представление материалов диссертации в виде рисунков, таблиц и обстоятельного описания, а также достаточный анализ позволяет квалифицировать результаты диссертационной работы как достоверные, а основные положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации как вполне обоснованные.

Научная новизна

Диссертант описывает в работе оригинальные данные о создании инновационного рекомбинантного гуманизированного антитела к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека и изучении его

механизма действия. Важно отметить, что в экспериментах *in vitro* в гемолитическом тесте антитело не блокирует классический путь активации комплемента, но блокирует альтернативный путь активации в молярном недостатке по отношению к общему количеству C3 в пробах плазмы крови. Методом плазмонного резонанса выявлен участок связывания с антителом hC34, локализованный на формах C3i, C3b и C3c. Как оказалось, выбранный автором для фармакологического исследования аналог рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 (моноклональное антитело 3A8, специфичное C3 компоненту комплемента), обладает нейропротекторной фармакологической активностью в модели закрытой черепно-мозговой травмы, что подтверждено поведенческими и морфологическими методами на крысах.

Рецензируемая работа может быть квалифицирована как доказательное обстоятельное исследование в области фундаментальной и клинической фармакологии, иммунологии, внутренней медицины и медицинской науки в целом.

Теоретическая и научно-практическая значимость

Теоретическое значение рецензируемой работы состоит в обосновании оригинального подхода к лечению травматического повреждения головного мозга, основанного на блокировании активации комплемента с помощью рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 к неадетерминанте C3 компонента комплемента человека. Автор провел практически полный объем доклинических исследований лекарственной формы рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 (моноклональное антитело 3A8, специфичное C3 компоненту комплемента), включая изучение специфической активности, механизма действия, фармакокинетики, острой и хронической токсичности, а также аллергенности и иммунотоксичности. При этом убедительно доказано, что как сами рекомбинантные гуманизированные антитела hC34, так и их предлагаемая лекарственная форма при внутривенном введении в дозах, на два порядка превышающих терапевтическую дозу для человека, не

оказывает токсического действия на лабораторных животных и не обладает аллергизирующими и иммунотоксическими свойствами. Созданный лекарственный препарат автор относит к III классу (малоопасных) лекарственных препаратов. Все представленное позволило диссертанту рекомендовать лекарственную форму рекомбинантного гуманизованного антитела hC34 в качестве основы для разработки средств лечения травмы головного мозга и профилактики осложнений, ассоциированных с избыточной активацией системы комплемента.

Представленные в диссертации данные следует рассматривать как новые, имеющие важное теоретическое и практическое значение для базисной и клинической фармакологии, неврологии и иммунологии.

Результаты исследований К.А. Некрасовой могут быть полезны для научно-исследовательских работ, проводимых в Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербургской государственном медицинском педиатрическом университете МЗ РФ, НИИ фармакологии им. В.В. Закусова (Москва), Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ (Санкт-Петербург), учреждениях Российской академии наук, Министерства здравоохранения и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Структура и оформление работы

Работа изложена на 168 страницах машинописи, иллюстрирована 18 рисунками и 27 таблицами. Построение диссертации традиционное и соответствует ГОСТу РФ и требованиям ВАК. Диссертация включает введение (С.5-11), обзор литературы (С.12-39), главу материалов и методов исследования (С.40-70), главу результатов исследований, подразделенную на 5 подглав (С.71-127), заключение, содержащее обсуждение полученных результатов (С.128-137), выводы (С.138-139), перечень сокращений (С.140), список использованной литературы (С.141-168). Литературный указатель содержит 217 ссылок (17 отечественных и 200 иностранных) на работы,

опубликованные в основном за последние 10 лет. Диссертация написана хорошим литературным языком и легко читается.

Статистика

Полученные данные корректно обработаны с применением современных методов статистики. Используемые статистические методы позволяют адекватно оценивать полученные результаты.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 научных работы, из них 2 статьи, включенные в журналы, рекомендованные ВАК, и 2 работы в сборниках научно-практических конференций. Публикации в целом отражают основные результаты, полученные в диссертационной работе.

Автореферат

Основные положения автореферата диссертации полностью соответствуют разделам и содержанию диссертационной работы.

Выводы и практические рекомендации

Диссертация содержит 6 выводов. Все выводы и рекомендации (включены в раздел заключения) обоснованы и логично вытекают из основного содержания диссертации. Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и заключений соискателя следует признать высокой, что обеспечивается как количественной стороной изученного материала, так и качеством его обработки.

Вопросы и замечания

Принципиальных замечаний и возражений по диссертационной работе нет. Вместе с тем, в ходе рецензирования диссертационной работы возникли некоторые замечания и следующие вопросы, требующие дополнительного пояснения и уточнения:

1. Замечание 1 касается подачи материала. Работа большая, объемная, добротная, современная, но описание специфической

активности (раздел 3.3, стр.87-96) выглядит довольно скромно и включает лишь скрининговые методы оценки высшей нервной деятельности на небольшом числе крыс (n=39): описание условной реакции пассивного избегания, которая выполняется в одной пробе за 3 мин, нанесение черепно-мозговой травмы падающим на голову грузом, оценка процента выживших и погибших животных (стр.87-88, табл.3.3.1). Правда, далее достаточно подробно описываются результаты морфологического исследования, подтверждающие нейропротекторную активность исследуемого препарата (стр.88-96), что частично компенсирует недостаток описания поведенческих данных.

2. Замечание 2. В выводе 3 диссертации (стр.138) автор констатирует, что «Аналог рекомбинантного гуманизированного антитела hC34 – моноклональное антитело 3A8, специфичное С3 компоненту комплемента крысы – *обладает фармакологической активностью* в модели закрытой черепно-мозговой травмы...», что не совсем понятно, какая это фармакологическая активность – защитная (протекторная), ноотропная (мнеотропная), противоотечная или какая-либо еще. Тем более, для пояснения активности используются такие расплывчатые характеристики, как «четкая тенденция к сохранению памятного следа у животных, перенесших ЗЧМТ» и прочее.

3. Вопрос: как автор видит потенциальное место предполагаемого препарата на основе моноклональных антител 3A8, специфичных С3 компоненту комплемента, в схеме лечения последствий черепно-мозговой травмы: это применение в острый или подострый период травмы? В отдаленный период травмы? Периодическое курсовое назначение после перенесенной травмы? Как часто и каким курсом? В виде монотерапии или в составе комплексной терапии? Как элемент базисной терапии, вспомогательной терапии, лечения отдельных проявлений? С чем комбинировать и для каких целей? Просьба пояснить более подробно.

4. По-видимому, стоимость таких препаратов, как гуманизированные антитела к С3 компоненту комплемента, будет

немаленькая, смогут ли они конкурировать с уже существующими препаратами, такими как ноотропы (рацетамы, ноопепт, кортексин) и ноотропоподобные (мексидол, эмоксипин, метапрот) в лечении последствий травм мозга?

В целом, работа производит весьма благоприятное впечатление, как по сути, так и по оформлению.

Все приведенные вопросы и замечания не затрагивают существа работы и сформулированы в плане дискуссии.

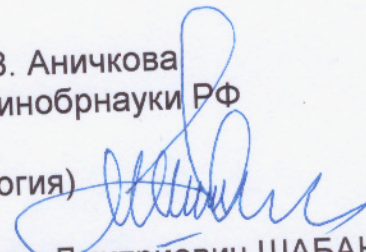
Заключение

Диссертация Некрасовой Ксении Александровны на тему «Экспериментальное исследование рекомбинантного антитела, блокирующего активацию комплемента, при травматическом повреждении головного мозга», выполненная под научным руководством кандидата биологических наук А.М. Ищенко и представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, является завершённой, самостоятельно выполненной научной квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной научной задачи в области экспериментальной и клинической фармакологии, состоящей в создании и изучении лекарственного средства на основе рекомбинантных гуманизированных антител к неопредетерминанте С3 компонента комплемента человека и изучении его механизма действия, что имеет большое значение для фармакологии, клинической фармакологии, иммунологии и медицинской науки в целом. Работа полностью соответствует паспорту специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология (п.4 «Исследование взаимодействий между организмом и лекарственными средствами, изучение их фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма»). Научная новизна и практическая значимость результатов исследования позволяют утверждать, что данное исследование соответствует п.9 Положения ВАК Министерства образования РФ, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (редакция от 21.04.2016 г. №335 и от 20.03.2021 г. №426)

о порядке присуждения ученых степеней на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Некрасова Ксения Александровна, по своей эрудиции, компетенциям, авторитету, научному и практическому опыту достойна присуждения искомой степени.

Официальный оппонент:

Заведующий отделом нейрофармакологии им. С.В. Аничкова
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» Минобрнауки РФ
доктор медицинских наук профессор
(3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология)



Петр Дмитриевич ШАБАНОВ
тел. 8-921-900-1951, e-mail: pdshabanov@mail.ru
Санкт-Петербург, 197376, ул. Акад. Павлова, 12

«02» декабря 2022 года

