«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель директора по научной и
образовательной деятельности
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России
доктор медицинских наук, доцент,
профессор РАН

_____ А.В. Петровский
«_3_» ноября 2026 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ
Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической значимости диссертационной работы Жучкова Владислава Александровича на тему «Нанотела в качестве инструмента контроля развития вирусной инфекции», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Актуальность темы исследования.

Диссертационная работа Владислава Александровича Жучкова посвящена решению актуальной задачи современной молекулярной биологии и биотехнологии - разработке, модификации и всестороннему исследованию биомолекулярных платформ на основе однодоменных антител (VHH-антител, нанотел). Опыт, полученный мировым научным сообществом в ходе пандемии COVID-19, продемонстрировал необходимость создания высокоспецифичных, стабильных и быстро адаптируемых биотерапевтических агентов, способных эффективно блокировать патогены и механизмы их проникновения в клетки-мишени.

Нанотела благодаря уникальным особенностям молекулярный структуры представляют собой перспективную платформу для создания молекул нового поколения. Сфера их применения не ограничивается

использованием в качестве мономерных нейтрализующих агентов, она существенно расширяется за счет возможности конструирования мультивалентных комплексов, конъюгатов с низкомолекулярными нагрузками, а также адаптерных систем, управляющих тропизмом вирусных векторов.

В связи с этим диссертационное исследование В.А. Жучкова, охватывающее весь цикл, от получения иммунных библиотек альпака и отбора панели высокоаффинных нанотел к шиповидному (S) белку SARS-CoV-2 до глубокого функционального анализа их нейтрализующего потенциала, механизмов взаимодействия с вирусом, способов мультимеризации, химической конъюгации и модификации вирусного тропизма, является несомненно актуальным и обладает высокой фундаментальной и прикладной ценностью.

Для достижения поставленной цели автором был сформулирован четкий комплекс из 5 научно-практических задач:

- Отбор панели специфических нанотел к шиповидному белку SARS-CoV-2 методом фагового дисплея.
- Оценка уровня нейтрализующей активности в отношении SARS-CoV-2 у селектированных нанотел в различных тест-системах с использованием разных вариантов вируса.
- Разработка способов модификации молекулярной конструкции нанотел и оценка влияния модификаций на их функциональную активность.
- Разработка новых методов применения нанотел в отношении вирусов.
- Испытание нейтрализующих и модифицированных нанотел в клеточных и живых системах.

Обоснование темы и задач работы логично и не вызывает сомнений. Диссертант комплексно подошёл к решению поставленных задач, применив масштабный арсенал современных методов молекулярной биологии, вирусологии и биохимии.

Научная новизна исследования и полученных результатов.

Научная новизна диссертационной работы заключается в получении ряда оригинальных результатов, имеющих приоритетное значение для молекулярной биологии и биотехнологии. Сформирована и систематически охарактеризована уникальная панель высокоспецифичных нанотел против S-белка SARS-CoV-2, для наиболее перспективных из которых определены константы диссоциации в субнаномолярном диапазоне. Разработана и валидирована концепция селективного ретаргетирования лентивирусных векторов на PD1-экспрессирующие Т-лимфоциты с использованием нанотела, что позволило осуществить адресную доставку shRNA против FOXP3 и подавить супрессивный фенотип регуляторных Т-клеток. Впервые разработана и протестирована биспецифическая адаптерная система на основе нанотела к гликопротеину VSV-G и DARPin к рецептору HER2, обеспечивающая высокоэффективное и управляемое изменение тропизма вирусных частиц без необходимости внесения мутаций в геном самой векторной системы. Проведён комплексный сравнительный анализ влияния формата мультимеризации (ПЭГ-тетрамеры, стрептавидиновые комплексы, Fc-димеры) и архитектуры химических линкеров (расщепляемый Val-Cit-PAB против нерасщепляемых алифатических цепочек) на сохранение нейтрализующего потенциала нанотел при их сшивке с противовирусными (ARVI11) и цитотоксическими (MMAE, барназа) агентами.

Теоретическое и практическое значение работы.

Теоретическая значимость диссертационной работы состоит в существенном расширении фундаментальных знаний о механизмах взаимодействия однодоменных антител с вирусными гликопротеинами. Продемонстрировано, как увеличение авидности за счёт мультимеризации VHH позволяет не только повысить сродство к мишени, но и восстанавливать нейтрализующую способность в отношении мутантных штаммов вируса, ускользающих от мономерных форм. Полученные данные о влиянии нанотел

на конформационную динамику и протеолиз S-белка углубляют понимание процессов слияния вирусных и клеточных мембран. Кроме того, расширены теоретические данные о возможностях конструирования различных вариантов молекулярных платформ на основе однодоменных антител.

Практическая значимость работы определяется получением запатентованных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей нейтрализующих нанотел, которые могут послужить основой для создания средств профилактики и экстренной терапии вирусных инфекций. Предложенные технологические схемы сортазного лигирования и безинициаторной клик-химии (SPAAC) представляют собой универсальный инструментарий для наработки стабильных иммуноконъюгатов. Разработанные платформы ретаргетинга лентивирусов открывают широкие перспективы для генной терапии и аутоиммунных патологий путём селективного воздействия на иммунные клетки в опухолевом микроокружении.

Обоснованность и достоверность полученных результатов.

Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. В ходе исследований диссертант использовал обширный комплекс современных экспериментальных подходов: фаговый дисплей, ПЦР, количественную ПЦР, биослойную интерферометрию, ИФА, Вестерн-блот, проточную цитометрию, технологии рекомбинантного синтеза и очистки белков (IMAC, SEC, катионообменная хроматография), методы органического и ферментативного синтеза конъюгатов, тесты на нейтрализацию с использованием псевдовирусных систем и живых штаммов SARS-CoV-2, а также тесты *in vivo* на моделях мышиного ксенотрансплантата и сирийских хомяках.

Сформулированные научные положения и выводы диссертации основаны на обработке достаточного объёма экспериментальных данных, воспроизводимы и полностью аргументированы. Результаты работы достаточно полно отражены в 4 статьях, опубликованных в рецензируемых

научных журналах, индексируемых в международных базах данных, а также защищены 1 патентом РФ на изобретение.

Личный вклад автора.

Все основные результаты диссертационного исследования получены лично автором либо при его непосредственном определяющем участии под руководством к.б.н. С.П. Чумакова. В.А. Жучков лично осуществлял сборку фаговых библиотек, проведение раундов селекции, наработку и многостадийную очистку белковых препаратов, измерение констант диссоциации, проведение клеточных тестов на нейтрализацию и ретаргетинг, сборку модифицированных молекулярных конструктов и анализ получаемых данных. В работе отмечено, что эксперименты с препаратами живого вируса SARS-CoV-2 проводились на базе ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН».

Структура и общая характеристика диссертационной работы

Объём и содержание работы. Диссертация В.А. Жучкова изложена на 185 страницах, оформлена в соответствии с нормативными требованиями и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты и их обсуждение, выводы, список сокращений и список цитируемой литературы (190 источников).

Введение содержит исчерпывающее обоснование актуальности темы, формулировку цели и 5 задач, характеристики научной новизны, практической значимости, положений, выносимых на защиту, а также апробации работы.

Обзор литературы логично разбит на тематические блоки, детально описывающие структуру и свойства нанотел, их поведение *in vivo*, применение в диагностике, визуализации (ПЭТ, ОФЭКТ, флуоресцентные методики) и терапии (CAR-T, CAR-NK, воздействия на макрофаги, заболевания ЦНС и лёгких, инфекционные болезни). Обзор свидетельствует об отличной осведомлённости автора в исследуемой области.

Материалы и методы содержат подробное изложение всех применявшихся протоколов (от генно-инженерных манипуляций и экспрессии в *E. coli* до проведения ИФА, биослойной интерферометрии, клик-химии и вирусологических тестов), что обеспечивает полную воспроизводимость результатов.

Результаты и обсуждение представляют собой основной раздел диссертации, в котором логично и последовательно изложены ключевые этапы исследования:

Отбор кандидатных вариантов нанотел: Описана процедура селекции нанотел из библиотек альпака с применением перекрёстного отбора на S-белке и RBD. Сформировано 13 семейств антител; для лидеров определены константы диссоциации.

Тестирование нейтрализации: Подтверждена нейтрализующая активность кандидатов в конкурентном ИФА (8 образцов), на псевдовирусах (6 образцов) и на живом вирусе дикого типа Ухань (5 образцов). Охарактеризована нейтрализация вариантов Дельта и Омикрон, а также способность блокировать межклеточную передачу вируса.

Синцитиеобразование и АЗУИ: Установлена и описана способность нанотела 1D10 усиливать образование синцитиев, предположительно, путём активации расщепления S-белка до формы S2′. Проведена оценка риска антителозависимого усиления инфекции при экспрессии VHH на поверхности клеток.

Модуляция тропизма векторов: Продемонстрирован эффективный ретаргетинг лентивирусов на $PD1^+$ Т-клетки с помощью нанотела nb102c3 для сайленсинга FOXP3, а также применение адаптера на основе anti-VSV-G VHH и anti-HER2 DARPin.

Модификации VHH: Оценено влияние мультимеризации (Fc-димеры, ПЭГ- и стрептавидиновые тетрамеры) и конъюгации с цитостатиками/противовирусными соединениями (MMAE, ARVI11, барназа)

с анализом различных типа линкеров на сохранение нейтрализующей способности.

Выводы сформированы подробно, грамотно, полностью отражают суть работы, логически вытекают из результатов и отвечают всем поставленным задачам.

Замечания

При общей чрезвычайно высокой оценке диссертационного исследования В.А. Жучкова следует отметить некоторые незначительные замечания и вопросы:

1. В подразделе 3.3.1.2 при обсуждении конъюгатов нанотел с барназой зафиксирован эффект усиления инфекции в клеточных тестах, который автор связывает с высоким базовым значением изоэлектрической точки барназы (pI ≈ 9.2) и её неспецифическим электростатическим связыванием с мембранами. Желательно было бы подкрепить эту гипотезу дополнительными экспериментами.
2. В диссертации присутствуют единичные редакционные опечатки и погрешности оформления: в частности, наблюдается сбой нумерации подраздела 4.6.6.3 (с. 112), находящегося внутри раздела 3.2.6, а также встречаются опечатки.
3. В таблицах с оценкой нейтрализующей активности на живом вирусе (Таблица 8) для части проб не указаны стандартные отклонения (SD), что обусловлено полным совпадением результатов в двух независимых повторах, однако представление данных с указанием доверительных интервалов выглядело бы более строго.

Отмеченные замечания носят преимущественно частный дискуссионный характер и ни в коей мере не снижают высокое качество, фундаментальность и практическую ценность полученных автором результатов.

Заключение

Результаты диссертационного исследования В.А. Жучкова имеют существенное значение для молекулярной биологии, вирусологии и биотехнологии. Они могут быть внедрены в научно-исследовательскую работу профильных институтов РАН, ВУЗов и крупных медицинских центров, таких как ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, ФГБУН «Институт биологии гена РАН», ФГБУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» и др.

Диссертационная работа Жучкова Владислава Александровича «Нанотела в качестве инструмента контроля развития вирусной инфекции» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научном и методическом уровне, которой решена важная задача совершенствования методов создания высокоаффинных антител_____к вирусным белкам для контроля вирусной инфекции. По своему объёму, актуальности, научной новизне, глубокой проработке результатов и практической значимости диссертация полностью соответствует критериям пп. 9-14, "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями Постановлений Правительства Российской Федерации от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539, от 26 октября 2023 г. №1786, от 25 января 2024 г. №62), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Жучков Владислав Александрович, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Отзыв о диссертационной работе Владислава Александровича Жучкова был обсуждён и одобрен на совместном научном семинаре лаборатории драйверов и маркеров канцерогенеза и лаборатории молекулярной биологии вирусов отдела трансляционной онкологии НИИ экспериментальной

онкологии и канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России «2» ноября 2026 года, протокол № 6 от 2 ноября 2026 г.

Заведующая лабораторией драйверов и маркеров канцерогенеза
отдела трансляционной онкологии
НИИ экспериментальной онкологии и канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
профессор, доктор биологических наук
(1.5.3. Молекулярная биология)

Лазаревич Наталия Леонидовна

Подпись доктора биологических наук, профессора Лазаревич Н.Л. удостоверяю:
Ученый секретарь
ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России
к.м.н. И.Ю. Кубасова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина" Минздрава России)
115522, г. Москва, Каширское шоссе 24, тел. 499-324-11-14, E-mail: info@ronc.ru, сайт: https://www.ronc.ru/