# ОТЗЫВ

официального оппонента, д.б.н. Тиллиба Сергея Владимировича,
на диссертационную работу Жучкова Владислава Александровича на тему
«Нанотела в качестве инструмента контроля развития вирусной инфекции»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

## Актуальность избранной темы

Нанотелами называют рекомбинантные производные антиген-узнающих вариабельных доменов особых антител в норме присутствующих наряду с антителами классической структуры в крови у представителей семейства Верблюдовые. Эти особые антитела состоят из гомодимера укороченной (без CH1-участка) тяжелой цепи при отсутствии легких цепей. Их антиген-узнающий вариабельный фрагмент представлен одним доменом, VHH, который может быть получен в виде отдельного рекомбинантного белка, или нанотела, не содержит пост-трансляционных модификаций и полностью сохраняет свойство исходного антитела специфически узнавать антиген. Нанотела являются в последние годы очень востребованным инструментом для создания новых иммунобиотехнологических, диагностических и иммунотерапевтических средств и методов для очень широкого спектра приложений, решения актуальных задач биомедицины. Их особые свойства во многих приложениях могут дополнять и даже иметь преимущества перед более традиционными препаратами на основе антител и их производных. Нанотела были впервые разработаны 33 года тому назад и производные нанотел уже многие годы рассматриваются как перспективные инструменты для борьбы с вирусными инфекциями. Например, в нашей лаборатории с коллегами из НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи уже в 2012-2014 годах были проведены успешные, опубликованные и запатентованные разработки новых препаратов на основе нанотел, эффективно нейтрализующих вирусы гриппа и бешенства. Нанотела уже тогда мы с коллегами использовали для специфического таргетирования аденовирусов. В период недавней пандемии коронавируса в мире ожидаемо был особый всплеск исследований по разработке препаратов на основе нанотел (коктелей из нескольких нанотел) с целью нейтрализации или блокировки разных текущих и потенциально возможных новых мутантных вариантов вируса SARS-CoV-2. Благодаря их высокой стабильности, нанотела можно доставлять в организм не только инъекциями, но и в виде аэрозолей или назальных спреев (например, для защиты дыхательных путей при респираторных вирусах). На основе нанотел получают многомодульные (би- или олиго-специфичные) конструкции, что может в сотни и тысячи раз усиливать нейтрализующую способность и защищать от

мутаций вируса («ускользания» от иммунитета). Вместе с тем, другие вирусы, например, онколитические, являются очень перспективным инструментом борьбы со злокачественными новообразованиями. Для мишень-направленного таргетирования таких вирусов также удобным инструментом могут служить нанотела. Задачи контроля вирусной инфекции, противостояние вирусным заболеваниям и использование вирусов для терапевтических целей сегодня очень актуальны. Однако остается очень много нерешенных вопросов, и поискам решений некоторых из них посвящена данная диссертационная работа.

**Структура и содержание диссертации.**

Диссертационная работа изложена на 185 страницах, содержит 40 рисунков и 11 таблиц, организована в целом традиционно и содержит следующие разделы: введение, довольно короткий обзор литературы, объемный раздел «материалы и методы», объемный раздел «результаты и обсуждения», выводы, список сокращений и список литературы, включающий 190 источников.

Обзор литературы является самым слабым местом в этой работе, очень краток, не содержит многих принципиально важных опубликованных данных, близких к теме диссертации. В обзоре очень кратко, однобоко и поверхностно даются базовые сведения об однодоменных антителах (нанотелах), и основное внимание уделяется применению нанотел для исследований, диагностики, визуализации антигенных мишеней, в терапии заболеваний человека. Частично недостатки обзора компенсируются в разделе «Результаты и обсуждение», где выявляется значительная дополнительная часть литобзора с множеством дополнительных ссылок, причем это именно обзорные фрагменты текста, которые помещены перед экспериментальными данными на соответствующую тему, а не обсуждение полученных диссертантом результатов в сравнении с литературными данными.

В разделе «Материалы и методы» описаны многочисленные материалы и весьма разнообразные методики, использованные для решения поставленных задач. Следует отметить использование автором очень широкого весьма впечатляющего арсенала самых современных методов молекулярной и клеточной биологии, биохимии, вирусологии и работ с экспериментальными животными.

В разделе «Результаты и обсуждение» диссертант последовательно излагает многочисленные полученные результаты и иллюстрирует их с помощью наглядных рисунков и таблиц. Автор выделяет в этом разделе три основных подраздела: 1) отбор нанотел к шиповидному белку SARS-CoV-2, 2) тестирование нейтрализующей активности отобранных нанотел в отношении связывания S-белка с ACE2, 3) модификации нанотел.

Если результаты первых двух разделов были опубликованы в одной статье и патенте, то результаты третьего раздела опубликованы в трех статьях. Третий раздел («модификации нанотел») содержит особенно большое разнообразие полученных результатов. Это создание и тестирование различных конъюгатов нанотел, их мультимеров и димерных вариантов, а также использование нанотел (наряду с другим однодоменным антителом, дарпином) для создания биспецифического адаптера с целью перенаправления (ретаргетирования) лентивирусных векторов на заданные клетки-мишени.

Описание очень большой проделанной работы сделано в основном достаточно понятно, не всегда последовательно, иногда очень детально, а в других случаях чрезвычайно компактно с отсылкой к опубликованным статьям.

Среди основных результатов работы отмечу следующие. Диссертант провел полный комплекс работ по получению и тестированию в различных модельных системах новых высокоаффинных нанотел к рецептор-связывающему домену (RBD) шиповидного поверхностного (S-белка) пандемического коронавируса SARS-CoV-2. На основе этих нанотел созданы и протестированы перспективные варианты препаратов (нанотела с добавленным Fc-фрагментом антитела, различные коъюгаты, димеры, мультимеры и другие), которые эффективно блокируют взаимодействие вируса с рецептором ACE2 и подавляют инфекционность вируса. Противовирусная активность полученных препаратов нанотел помимо прямого ингибирования протестирована также в экспериментальных модельных клеточных системах передачи вирусной инфекции от клетки к клетке и при тестировании натурального вируса на модели экспериментальных животных. В представленной работе были также использованы конструкции, создаваемые на основе других ранее полученных нанотел (к PD-1, CD47, к гликопротеину G вируса везикулярного стоматита – VSV-G). Разработана биспецифическая адаптерная молекула, которая с одной стороны связывается с VSV-G на поверхности вирусного вектора, а с другой — с заданным рецептором на поверхности целевой клетки (в исследовании тестировался онкомаркер ERBB2 / HER2). Подход позволяет использовать один и тот же вариант лентивирусного вектора, перенаправляя его на нужные клетки путем предварительного связывания с биспецифическим адаптером.

В разделе «Выводы» подведены итоги работы. Выводы, хотя и сформулированы довольно громоздко и далеко не оптимально, полностью соответствуют полученным результатам и не вызывают сомнений.

**Научная новизна, обоснованность, достоверность и значимость результатов.**

Научная новизна результатов данной работы обеспечивается, в первую очередь,

использованием новых уникальных инструментов на основе нанотел, полученных диссертантом. Наличие патента подтверждает, что в работе были получены новые нанотела, связывающие определенные варианты коронавируса SARS-CoV-2 и препятствующие связыванию вируса с рецепторм ACE2. Проведена большая экспериментальная работа с использованием широкого арсенала самых современных методов с целью получить и досконально исследовать полученные нанотела и большое разнообразие их производных (разных конъюгатов, ди- и мультимеров) в различных тест-системах, включая клеточные модели и модели на грызунах. Диссертант уделил внимание большому числу актуальных дебатируемых экспериментальных подходов в данной области и получил интересные результаты, которые могут быть полезными для разработчиков подобных новых биомедицинских препаратов на основе нанотел. Диссертант довольно честно сообщает о выявленных неудачах, несоответствиях ожиданиям в результатах ряда экспериментов. Вместе с тем, получено достаточно много результатов, указывающих перспективные направления использования нанотел, их модификаций и производных конструкций.

Достоверность и новизна проделанной работы подтверждается четырьмя публикациями в высокорейтинговых рецензируемых научных журналах, одном российском и трех международных, а также одним российским патентом. В трех из этих четырех статей диссертант – первый автор.

Полученные диссертантом результаты и разработки, безусловно, имеют большое значение как для фундаментальной науки в области молекулярной иммунологии и вирусологии, так и для прикладных биомедицинских исследований и разработки новых диагностических и лекарственных средств.

**Замечания**

Принципиальных замечаний по сути данной работы и по сделанным выводам у меня нет. Однако, помимо многих выявляемых грамматических и стилистических ошибок, небрежностей в написании и оформлении отдельных частей работы, я бы хотел сделать ряд более важных замечаний и сформулировать некоторые вопросы, возникшие при ознакомлении с текстом данной диссертации.

1) Стр. 11 «*У 6 нанотел подтверждена нейтрализующая активность в отношении вируса SARS-CoV-2 варианта Ухань. По два образца проявили нейтрализующий эффект в отношении вируса вариантов Дельта и Омикрон.*»

- Здесь и во многих других местах не корректно говорить о нейтрализации вируса полученными нанотелами, речь скорее идет о блокировании взаимодействия вируса с

рецептором ACE2. Хотя основным и наиболее изученным рецептором для проникновения вируса SARS-CoV-2 в клетки человека остается ACE2, вирус способен поражать ткани и типы клеток, где ACE2 практически не экспрессируется. Так, рецептор трансферрина человека (TfR1) может служить независимыми от ACE2 входными воротами для SARS-CoV-2. Ряд других поверхностных белков клеток человека способен самостоятельно связывать вирус и обеспечивать его интернализацию (CD147, AXL, KREMEN1, ASGR1, лектины, TMEM106B, NPC1).

2) Стр. 15 *«Уникальный тип строения антител был обнаружен **в 1989 году** у семейства Camelidae [2]. В данном случае у антител полностью отсутствуют лёгкие цепи, из-за чего они получили название антитела из тяжелых цепей (HCAb). В данной форме присутствуют **только два константных домена (CH1 и CH2)**, а также один гипервариабельный домен VHH, отвечающий за связывание с антигеном. Он является аналогом Fab фрагмента IgG консервативной структуры. **Антитела** с отсутствующей лёгкой цепью и константным доменом CH1 также были обнаружены у представителей хрящевых рыб [3]. **Они носят название V-NAR**.»*

- В особых антителах Верблюдовых, представляющих собой гомодимер укороченной тяжелой цепи иммуноглобулина, отсутствует именно первый константный участок CH1, присутствуют CH2 и CH3. Особые антитела у хрящевых рыб в цитируемой работе имеют не один, а пять константных доменов. V-NAR – это не антитело, а вариабельный домен в этих особых антителах у хрящевых рыб.

3) На рисунке 1 (стр. 16) справа неверно схематично отражены пропорции константных и гипервариабельных участков в VHH-нанотеле.

4) На стр. 17 ссылки 5, 6, 7 и 8 не соответствуют тексту литобзора о структуре нанотел. При этом не указаны ссылки на ключевые обзоры от разработчиков этой технологии. Почему-то в тексте говорится только об одном конкретном варианте дополнительной S-S связи в нанотеле, тогда как в реальности выявлено их большое разнообразие (в разных позициях внутри CDR и между разными CDR).

5) На стр. 18: «*Экспрессия белков в периплазму позволяет получать молекулы с правильной укладкой и необходимыми дисульфидными связями в своей структуре. Выход в таких случаях может достигать **нескольких десятков миллиграмм с литра культуры**.*»

- При наработке в периплазме такой выход вряд ли возможен. При этом после этого заявления, а также после других заявлений на той же странице вообще нет подтверждающего цитирования работ. Существует много подробных «классических»

обзоров по нанотелам, в том числе на русском языке, но они не отражены в тексте диссертации.

6) Подразделы «1.1.2.3.5. Нанотела в заболеваниях лёгких и *1.1.2.3.7. Нанотела в инфекционных заболеваниях»* занимают в литобзоре всего две страницы текста и содержат 10 ссылок на работы, выполненные в основном до пандемии. А ведь именно эти разделы, связанные с использованием нанотел для борьбы с вирусными инфекциями , особенно с SARS-CoV-2, должны были бы стать основой обзора, согласно тематике диссертации.

7) В подразделах 2.1-2.3 материалов и методов весьма поверхностно описаны процедуры иммунизации, взятия иммунной крови, выделения РНК и создания VHH-кДНК библиотек.

Удивительно, что использовали только неполный адъювант Фройнда и только три этапа иммунизации. Какой объем финальной иммунной крови и соответствующей доли выделенной РНК брали для ПЦР-клонирования библиотек VHH? Как определяли титр именно особых антител? Выделяли ли поли $(A)^+$ -РНК? Не описаны детали сборки и проведения реакций ПЦР для клонирования VHH. Каковы были соотношения VH и VHH при их ПЦР-клонировании?

8) Стр. 48 *«Белковый препарат барназы был получен при помощи наработки в бактериальной культуре…»*

- Известно, что барназа без барстара токсична и для бактерий. Как же на самом деле ее нарабатывали?

9) Стр. 76 *«Для элюирования связавшегося бактериофага в пробирку добавляли 1 мл свежеприготовленного раствора 100 мМ триэтиламина, закупоривали пробирку и* ***инкубировали 1 час*** *на вращающемся роторе при комнатной температуре.»*

- Здесь серьезная методическая ошибка. Известно же, что в 100 мМ водном растворе триэтиламина бактериофаги сохраняют жизнеспособность лишь кратковременно – не более 5-10 мин. Возможно, эту процедуру сам диссертант не делал?

10) На рис.2 (стр. 87) нет контроля преиммунной сыворотки. Что такое точка И? Почему в этой точке оптическая плотность равна 0, ведь у сыворотки обычно есть заметный фон в ИФА? Не указано, какое использовали разведение сывороток? Определяли ли титр именно особых антител, которые могут составлять малую часть всех антител и в результате иммунизации их титр может варьировать по-другому?

11) Очень важная процедура упомянута на стр. 88: *«Дополнительно было проведено предварительное обогащение библиотеки за счёт селекции фракции В-клеток. Были отделены субфракции, способные связываться с иммобилизованным на микроносителях S-белком.»*

- Какое количество лимфоцитов (из какого объема иммунной крови) было использовано и каков был процент обогащения? Определяли ли долю особых (тяжелоцепочечных) антител до и после проведенной селекции (это можно установить с помощью ПЦР)? Эта стадия, по-видимому, поспособствовала заметному повышению эффективности клонирования нанотел с заданной специфичностью! Однако есть опасения, что в этой процедуре будут иметь преимущество лимфлоциты с антителами классической структуры.

12) Как проводили ( или не проводили?) амплификацию рекомбинаннтных VHH-фагов между первым и вторым раундами селекции?

13) Стр. 95 «*Для подтверждения способности отобранных вариантов нанотел специфически связываться с целевым белком был проведён ИФА* ***с использованием растворимой формы антитела для каждого кандидатного варианта***.» и
Стр. 96 «*Были получены чистые белковые препараты 11 отобранных кандидатных варианта нанотел, способных специфически связываться с шиповидным белком коронавируса*.»

- В работе нет подтверждающих данных о том, как переклонировали, нарабатывали выделяли и чистили эти нанотела. Нет даже картинки в геле, как выглядят эти очищенные нанотела. Так как именно их нарабатывали, в периплазме или в цитоплазме клеток E.coli Rosetta-Gami? Использование дополнительных доменов (для биотинилирования и работы Сортазы) могут сильно влиять на растворимость нанотел и их способность к аггрегации с другими белками. Это могло отразиться на получаемых результатах, которые могли поэтому сильно различаться/варьировать в различных тестах для различных наработок и модификаций нанотел.

14) На рис. 5 (стр. 98) на оси абсцисс указана масса (нанотела?) в мкг. Здесь правильнее указать их концентрацию. Опять-таки, как определяли концентрацию и качество используемых нанотел?

15) Нет данных, растворимы ли конъюгаты нанотел с барназой. Может быть это аггрегаты и поэтому могут приводить к неожиданному усилению вирусно инфекции?

16) В экспериментах, отраженных на рис. 26 (стр. 139) отсутствует контроль: например, контрольное нанотело с иной специфичностью (не к коронавирусу), конъюгированное с PEG-4-Arm.

17) Нанотело 2F12 в начальных экспериментах (рис.5) не было активно для блокировки взаимодействия S-белка с ACE2 в конкурентном ИФА. Позднее (рис. 28 на стр.144), именно это нанотело оказалось наиболее активным на модели заражения хомяка.

Возможно ли, что это следствие очень разного качества выделяемых нанотел (или их производных) в каждом из этих экспериментов?

18) На рис 30 (стр. 148) не указано, какой белок-антиген иммобилизовали в лунке. Вообще, большинство рисунков в работе подписано не полно. Не ясно, как в данном случае измеряли активность биотинилированного нанотела.

19) На рис. 32 (стр. 151) почему-то нет мономеров нанотел 2F8 и 1D10, но представлены все димеры. Не ясно, растворимы ли эти димеры, может быть проводили их анализ путем гель-фильтрации? Нет описания особенностей их получения и доказательного анализа качества полученных препаратов.

20) На рис. 33 (стр. 152) не ясно, с каким белком-мишенью проводили связывание моно- и димерных нанотел.

**Заключение**

Сделанные замечания касаются в основном оформительского плана и не снижают высокой оценки данной очень интересной многоплановой работы, выполненной на высоком методическом уровне. Диссертационная работа Жучкова Владислава Александровича «Нанотела в качестве инструмента контроля развития вирусной инфекции» соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением 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; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Официальный оппонент:
д.б.н. по специальностям 1.5.3. - «молекулярная биология»,
главный научный сотрудник, зав. лаб. молекулярных биотехнологий
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии гена Российской академии наук
Адрес: 119334, город Москва, улица Вавилова, дом 34/5
e-mail: tillib@genebiology.ru; телефон: 8-903-791-8997

Тиллиб Сергей Владимирович

10 ноября 2026 г.

Подпись д.б.н. Тиллиба С.В. заверяю:
Ученый секретарь ИБГ РАН
доктор биологических наук Набирочкина Елена Николаевна