ОТЗЫВ

официального оппонента
на диссертационную работу Жучкова Владислава Александровича
“ Нанотела в качестве инструмента контроля развития вирусной инфекции”,
представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Актуальность темы диссертационной работы. Вирусные агенты вызывают существенную часть инфекционных заболеваний у людей. Наличие среди вирусов таких агентов, которые отличаются высокой скоростью эволюции, делает своевременную разработку специфических вакцин крайне сложной задачей, особенно с учетом современных требований к их официальному одобрению. В связи с этим необходимо одновременно с разработкой вакцин создавать противовирусные препараты, причем в случае вирусов, для которых характерна быстрая смена генетических и серологических вариантов (SARS-CoV2, норовирусы, вирусы гриппа, энтеровирусы и т.д.) требуются препараты, инактивирующие большинство вариантов вирусов, в том числе и широконейтрализующие антитела.

Белковые молекулы, включая различные антитела, наряду с химическими соединениями, входят в основной тренд при поиске и создании противовирусных препаратов. Однодоменные антитела верблюдовых (VHH) являются уникальной природной платформой для создания как диагностических, так и терапевтических конструкций с возможностью разработки препаратов, обладающих одновременно обоими свойствами. В связи с вышесказанным, не вызывает сомнений актуальность диссертационной работы Жучкова Владислава Александровича, которая посвящена получению VHH против к SARS-CoV2 и их анализу, а также разработке панели VHH с различными модификациями.

Научная новизна исследования и практическая значимость полученных результатов. В диссертационной работе Жучкова В.А. впервые показана возможность эффективного ретаргетинга лентивирусных векторов на PD1-экспрессирующие Т-лимфоциты с использованием VHH, что позволило подавить иммуносупрессивный потенциал Treg-клеток. Предложена оригинальная адаптерная система на основе VHH к гликопротеину VSV-G и DARPin к HER2, обеспечившая перенаправление вирусного тропизма без изменения генома самого вектора.

Проведён систематический анализ влияния типа линкера и способа конъюгации (сортазное лигирование и SPAAC клик-химия) на сохранение вируснейтрализующего потенциала VHH при сшивке с низкомолекулярной противовирусной компонентой ARVI11 и монометилауристатином E. Выявлен и описан феномен образования синцитий, индукцированный VHH, и показано, что он связан с ускорением протеолитического разрезания S-белка до формы S2′.

Практическая значимость полученных результатов состоит в том, что была получена и запатентована панель VHH против SARS-CoV2, обладающих вируснейтрализующими свойствами. Также разработан комплекс методов для усиления противовирусной активности конструкций на основе VHH, в том числе, за счет адресной доставки.

Таким образом, полученные Владиславом Александровичем в ходе выполнения диссертационной работы результаты, несомненно, являются важными как для дальнейших фундаментальных исследований, так и для разработки новых терапевтических средств.

Структура и общая характеристика диссертационной работы.

Диссертация Жучкова В.А. имеет традиционную структуру и содержит следующие главы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждения, а также Выводы, благодарности, список сокращений. Диссертация изложена на 185 страницах; список цитированной литературы содержит 190 источников.

Во введении обоснована актуальность исследования; оно содержит все необходимые разделы, включая цели и задачи, научную новизну и практическую значимость, положения, выносимые на защиту и т.д.

Обзор литературы краток (26 страниц) и содержит классическое описание структуры типичных IgG и антител верблюдовых, а также использование VHH в диагностике. Важной частью обзора является краткое описание имеющихся данных о разработке подходов к применению VHH в терапии, хотя не всегда по тексту легко различить действительное применение в клинике от исследований *in vivo*. К сожалению, обзор не содержит разделы, описывающие уже осуществленные модификации VHH, а также результаты разработок противовирусных препаратов на основе VHH и, в частности, что было сделано на основе VHH против SARS-CoV2.

Привлечение этих данных при составлении обзора было бы полезно для самого соискателя.

В главе «Материалы и методы» соискатель достаточно четко и подробно приводит описание использованных методов. Вообще, эта глава вызывает уважение, поскольку соискатель при выполнении работы использовал очень широкий спектр методов: конструирование комбинаторных фаговых библиотек, отбор специфических комбинаторных антител методом фагового дисплея и их характеризация методами *in vitro* и *in vivo*, различные способы модификации VHH, конструирование лентивирусов и их модификация, эксперименты с эукариотическими клетками, эксперименты на животных моделях и т.д.

Глава «Результаты и обсуждения» формально состоит из трех разделов. В первом разделе описана ставшая уже классической работа по конструированию комбинаторных фаговых библиотек VHH антител на основе РНК из мононуклеарных клеток периферической крови альпак, иммунизированных RBD и полноразмерным гомотримером S-белка SARS-CoV2, а также отбору специфических VHH, в том числе и обладающих наномолярной аффинностью.

Второй раздел посвящен исследованию противовирусных свойств отобранных VHH, причем соискатель не ограничился проверкой вируснейтрализующей активности с использованием псевдотипированного лентивируса, но и протестировал отобранные VHH в классической реакции ингибирования бляшкообразования (PRNT) жизнеспособного SARS-CoV2 (несколько линий) на культуре клеток. К сожалению, получить широконейтрализующие VHH не удалось. На основе одного из VHH было сконструировано полноразмерное антитело VHH-Fc и исследованы его свойства. Особенно интересны эксперименты с оценкой вируснейтрализующих свойств сконструированных антител в модели передачи вируса от клетки к клетке, а также оценка потенциальной способности полученных антител вызывать антителозависимое усиление инфекции (ADE). Оказалось, что наиболее перспективное антитело способно вызывать ADE. Также в этом разделе описаны оригинальные эксперименты по ретаргетированию лентивирусного вектора. Именно последняя часть не только детально описана, но и хорошо обсуждена.

Последний раздел главы «Результаты и обсуждения» содержит описание экспериментов по получению различных модификаций VHH и оценке свойств полученных вариантов. Соискатель создал разные варианты мультимерных VHH и различные конструкции VHH-цитотоксические компоненты. Некоторые из мультимерных вариантов были проверены в животной модели, однако ход инфекции оценивали только по изменению массы тела; вирусную нагрузку в органах не оценивали. В этом же разделе описаны оригинальные эксперименты по изменению тропизма псевдовируса без изменения его генома. Этот подход может иметь широкие приложения как для исследований, так и для практического применения. Вместе с тем, этот раздел содержит подглавку «3.3.2.3.1. Получение тетрамера к CD47 на основе стрептавидина», целью которой являлось создание и оценка препарата для лечения онкозаболеваний, что не входило в цель и задачи диссертационной работы.

Стоит отметить значительный объем проведенных исследований и привлечение широкого спектра методов и подходов, часть из которых отработаны в ходе выполнения данной работы. Результаты неплохо проиллюстрированы. Такую многоплановую работу стоило бы сопроводить Заключением, но оно в этой диссертации отсутствует.

Выводы, сделанные на основе полученных результатов, как и положения, выносимые на защиту, обоснованы. Текст автореферата отражает основные результаты и принципиальные положения диссертации. Все исследования, описанные в диссертации, выполнены на современном мировом уровне. По результатам этой диссертационной работы получен патент РФ и опубликовано четыре статьи в уважаемых научных журналах, причем; в трех статьях соискатель является первым автором, что свидетельствует о его существенной роли в этих исследованиях. Автореферат в целом отражает содержание диссертации.

Замечания. К основным недостаткам данной диссертационной работы можно отнести следующее:

1. В Обзоре литературы лишь 13% статей – это публикации 2021-2025 годов; статьи 2026 года отсутствуют, хотя сам автор утверждает, что: «В настоящее время новые способы применения нанотел активно изучаются…». Также обращает внимание отсутствие как в Обзоре литературы, так и в обсуждении

полученных результатов, ссылок на работы российских ученых, исследующих как VHH, так и антитела против SARS-CoV2.

2. Раздел «Научная новизна и практическая значимость работы» составлен расплывчато. Очень трудно выделить из краткого перечисления всего того, что сделал соискатель, те результаты/конструкции/подходы, которые действительно были сделаны впервые в мире.
3. В главе Результаты и обсуждение описаны эксперименты, не относящиеся к поставленной цели. Если эти эксперименты действительно необходимо было выполнить, то следовало четко прописать это в задачах. Или при описании результатов можно было бы указать на то, что «Ранее в нашей работе было показано…» и ограничиться ссылкой на публикацию.
4. Конкурентный иммуноферментный анализ не входит в список методов для «проверки вируснейтрализующей активности», как это утверждает автор. Это именно анализ конкуренции за связывание с тем или иным сайтом.
5. К части рисунков можно высказать претензии по чрезмерной краткости подрисуночной подписи, не дающей исчерпывающей информации.
6. В Автореферате во Введении отсутствует раздел «Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации».
7. Присутствует некоторое количество неудачных терминов, типа «ночник» вместо общепринятого термина «ночная культура (overnight culture).

Также, при знакомстве с диссертацией возник вопрос, на который хотелось бы получить ответ. Почему автор делал восемь библиотек, а не смешал попарно соответствующие библиотеки от обоих животных? Тем более, что доли специфичных клонов в соответствующих парах (рисунок 4 в тексте диссертации или рисунок 1 в Автореферате) оказались близкими. Не обсуждена и тенденция отбора наиболее аффинных и вируснейтрализующих VHH из библиотек определенного типа.

Вместе с тем, диссертационная работа Жучкова Владислава Александровича является полноценной научно-квалификационной работой. Диссертация является комплексным научным исследованием, в котором решена задача разработки различных методов модификации VHH с целью применения их в качестве противовирусных агентов. Цели и задачи данной работы, положения, выносимые на

защиту, а также сформулированные выводы обоснованы полученными результатами. Диссертация полностью соответствует заявленной специальности 1.5.3 – Молекулярная биология, а именно, по направлениям исследований: 6. Молекулярная вирусология и антивирусные вещества, а также 7. Генная, белковая и клеточная инженерия.

Заключение. Таким образом, 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; 26.09.2022 г. № 1690; 26.01.2023 г. № 101; 25.01.2024 № 62), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор, Жучков Владислав Александрович, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Официальный оппонент:
заведующий лабораторией молекулярной микробиологии,
главный научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре
Сибирского отделения Российской академии наук
д.б.н. Тикунова Нина Викторовна

630090, г. Новосибирск, ул. Ак. Лаврентьева, 8
Тел. (383) 363-51-50. E-mail: tikunova@1bio.ru

Подпись д.б.н. Тикуновой Н. В. «Удостоверяю»
Ученый секретарь
Института химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук
к.б.н. Логашенко Е.Б.

9.11.2026