

Отзыв

официального оппонента члена-корреспондента РАН, доктора медицинских наук, профессора Костинова Михаила Петровича на диссертацию Щеблякова Дмитрия Викторовича на тему «Разработка универсальной технологической платформы для создания средств терапии и диагностики инфекционных заболеваний на основе однодоменных антител», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 3.2.7. Иммунология (биологические науки), 1.5.6. Биотехнология (биологические науки)

Актуальность темы исследования

Одним из перспективных подходов в терапии различных заболеваний остается использование моноклональных антител с заданными свойствами. На сегодняшний день объем рынка антител оценивается более чем в 200 млрд. долларов США и будет значительно прогрессировать, что связано с распространенностью заболеваний, растущей научно-исследовательской деятельностью, высокими темпами внедрения моноклональных антител в практику. Тем не менее, основными областями применения моноклональных антител до сих пор остается терапия рака, бронхолегочных, сердечно-сосудистых и аутоиммунных заболеваний, заболеваний крови. В начале XXI века в результате возникновения пандемий и эпидемий, вызванных новыми вирусами, для которых нет эффективных средств терапии, разработка препаратов на основе моноклональных антител для борьбы с инфекционными заболеваниями является актуальной задачей.

В последние годы, наряду с классическими моноклональными антителами, имеющими каноническую структуру, активно исследуются альтернативные аналоги (одноцепочечные антитела, отдельные фрагменты иммуноглобулина, биспецифические антитела, антитела, конъюгированные с ферментами или другими химическими соединениями и т.д.). Кроме того,

особую актуальность представляют фрагменты антител, имеющих неканоническое строение и найденные у семейства верблюдовых. Ряд физико-химических свойств и особенностей строения антител, имеющих однодоменную структуру, делает такие молекулы интересными объектами при разработке средств диагностики и терапии различных заболеваний.

В связи с этим разработка технологии получения однодоменных антител и создания на их основе кандидатных препаратов, направленных на борьбу с инфекционными заболеваниями, является актуальной задачей, имеющей не только теоретическую и научную значимость, но и очевидный практический потенциал.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертация содержит достаточный объем экспериментальных и клинических данных, изученный с применением современных методических подходов и лицензированного оборудования, что в совокупности дает необходимое обоснование научным положениям. Достоверность обусловлена методологически корректным дизайном исследования с использованием современных методов статистической обработки материала, принятых в медицинской статистике и адекватной интерпретацией результатов.

Автором проведено большое количество исследований с использованием широкого спектра иммунологических, биотехнологических и молекулярно-биологических методов. В ходе исследования были применены современные подходы к анализу библиотек нуклеотидных последовательностей, молекулярно-генетического клонирования, уникальные модели *in vivo* для оценки биологической активности антител, большого набора клеточных тестов. Отдельно стоит отметить большой объем данных, полученных в ходе выполнения клинических исследований с использованием общеклинических, биохимических, лабораторных, инструментальных методов исследования. Объем проведенных исследований достаточен для обоснования основных выводов и заключения.

Выводы обоснованы, вытекают из экспериментальных данных, полученных диссертантом, и в полной мере отражают результаты исследований. Объем материала и его качество являются достаточными для решения поставленных задач, обеспечивают достоверность результатов исследования и сформулированных выводов.

Научная новизна диссертационной работы продемонстрирована как в ходе выполнения основных методических подходов, направленных на разработку препаратов на основе однодоменных антител с определенными свойствами, так и в ходе исследования их свойств на многочисленных моделях.

Автором изучены различные схемы иммунизации, обеспечивающие формирование специфических антител, имеющих неканоническое строение. При этом стоит отметить, что работа по получению иммунных библиотек однодоменных антител была выполнена с использованием животных семейства верблюдовых (альпаки и двугорбый верблюд) и различных методов иммунизации (рекомбинантные вирусные векторы, несущие гены антигенов, рекомбинантные белки, отдельные фрагменты и/или белковые фракции, выделенные из микроорганизмов). Кроме того, автором продемонстрирована эффективность разработанных оригинальных подходов для создания генетических конструкций, содержащих нуклеотидные последовательности однодоменных антител в составе фагмидных векторов, способов получения библиотек бактериофагов, с высокой долей рекомбинантных частиц, несущих однодоменные антитела на поверхности, способов проведения селекции и последующей модификации молекул антител под различные задачи.

Разработанная автором технологическая платформа с использованием различных инфекционных моделей показала свою эффективность при разработке препаратов, направленных как на борьбу с инфекционными заболеваниями, так и целей диагностики. В частности, получены антитела обладающие вируснейтрализующей активностью в отношении вируса Эбола

и коронавируса SARS-CoV-2, токсин-нейтрализующей активностью в отношении ботулотоксина А, а также антитела к токсину В *C.difficile* и ABC-транспортеру *M.hominis*, обладающие как диагностическим, так и терапевтическим потенциалом.

В ходе выполнения диссертационной работы автором впервые были разработаны и эффективно применены различные модели оценки терапевтического потенциала полученных препаратов. В частности, разработана модель оценки вируснейтрализующей активности антител к белку GP вируса Эбола на модели летальной инфекции мышей псевдотипированным рекомбинантным вирусом везикулярного стоматита; показана возможность использования рекомбинантных бактериофагов, несущих на поверхности однодоменные антитела, для оценки протективной активности однодоменных антител на модели летальной интоксикации мышей ботулотоксином типа А; изучена роль различных модификаций однодоменных антител (димеры, Fc-фьюжн однодоменные антитела) в усилении их терапевтической активности на модели летальной инфекции вирусами Эбола и SARS-CoV-2, а также интоксикации ботулотоксином типа А или токсином В *C.difficile*.

Для ряда полученных антител были идентифицированы специфические мишени и изучены механизмы нейтрализующей активности. В частности, установлен механизм подавления инфекции, вызванной вирусами Эбола и SARS-CoV-2, путем блокирования прикрепления вируса к поверхности клеток хозяина за счет прямой конкуренции за связывание поверхностных вирусных гликопротеинов с клеточными рецепторами. Для перспективного клона, обладающего нейтрализующей активностью в отношении ботулотоксина типа А методом молекулярного докинга и молекулярной динамики предложена возможная модель нейтрализации – ганглиозид связывающий сайт, участвующий в рецептор опосредованном транспорте токсина в клетки. Для оригинальных однодоменных антител, связывающиеся с *M.hominis* идентифицирована специфическая мишень - субстрат-

связывающий белок ABC-транспортера *M. hominis*, функции которого не до конца изучены и, учитывая антимикробные свойства отобранных антител, может являться перспективной мишенью для разработки средств антимикробной терапии. Кроме того, автором впервые показано, что присоединение к найденным антителам Fc-фрагмента иммуноглобулина мыши изотипа G2a, обеспечивает доставку химерных молекул VHH-Fc на поверхность слизистой оболочки урогенитального тракта и оказывает защитный эффект на модели экспериментальной урогенитальной инфекции у мышей, вызванной *M. hominis*.

Теоретическая и практическая значимость исследования заключается в разработке комплекса методологических и технологических подходов, позволяющих создавать препараты на основе однодоменных антител, для терапии инфекционных заболеваний, вызванных патогенами как вирусной, так и бактериальной природы. В результате изучения возможности применения технологической платформы был получен ряд кандидатных препаратов, имеющих перспективы их практического применения. Так, автором разработан препарат «ГамКовиМаб» для экстренной профилактики и этиотропной терапии COVID-19, проведены доклинические исследования эффективности и безопасности, а также клинические исследования 1-2 Фазы; разработан препарат для экстренной профилактики и этиотропной терапии лихорадки Эбола, созданный на основе нейтрализующих моноклональных антител. При этом, несмотря на каноническую структуру антител, включенных в состав этого препарата для клинического использования, ряд модификаций, примененных автором для обеспечения протективного эффекта, являются неотъемлемой частью комплекса методических подходов, направленных на разработку средств борьбы с инфекциями на основе моноклональных антител; разработан препарат для терапии интоксикации ботулотоксином типа А. Проведены доклинические исследования эффективности и безопасности препарата, а также проводятся клинические исследования Фазы 1, что также свидетельствует о высокой перспективности

используемых автором подходов. Кроме того, в ходе выполнения клинических исследований Щебляковым Д.В. был получен большой объем данных о безопасности, переносимости, фармакокинетики, иммуногенности препаратов на основе антител, имеющих неканоническое строение, что имеет огромное значение для понимания перспектив возможного практического применения антител подобного класса.

Кроме того, для ряда оригинальных антител, полученных автором, также показан и диагностический потенциал для выявления инфекционных агентов. Так, для однодоменных антител, специфичных CROPS домену токсина TcdB *C.difficile* показана возможность их использования для разработки биосенсоров для детекции токсина *Clostridioides difficile* методом плазмонного резонанса и продемонстрированы преимущества однодоменных антител в указанном способе детекции. При этом практической ценностью является разработка проектной документации и проведение испытаний тест-системы «Однодомен-Био» на основе полученных биосенсоров. Кроме того, при выполнении исследования были созданы и зарегистрированы две тест-системы: Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина S (spike) коронавируса SARS-Cov-2 «SARS-Cov-2-RBD-ИФА-Гамалеи», №ПЗН 2020/10393 и Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина S (spike) коронавируса SARS-Cov-2 «ГАМ-COVID-анти-RBD», №ПЗН 2021/14488.

В ходе выполнения диссертационной работы автором были получены 9 патентов на изобретения (представлены в списке работ, опубликованных по теме диссертации).

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертации, используются в учебном процессе в составе лекционных курсов «Основы молекулярной биотехнологии» и «Конструирование лекарственных и диагностических препаратов» кафедры биотехнологии и промышленной фармации ИТХТ им.

М.В. Ломоносова, федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет». Материалы также внедрены в учебный процесс подготовки научных и научно-педагогических кадров кафедры инфектологии и вирусологии Института профессионального образования Первого московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ.

Соответствие диссертации паспортам научных специальностей

Диссертация, выполненная Щебляковым Дмитрием Викторовичем, соответствует пунктам 6, 7, 9 паспорта специальности 3.2.7 – Иммунология (Биологические науки); и пунктам 1, 4, 8, 16 паспорта специальности 1.5.6. Биотехнология (Биологические науки).

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем

По материалам диссертационной работы опубликовано 38 печатных работ, 26 из которых - в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для публикации основных научных результатов диссертации, а также 9 патентов РФ на изобретение. Результаты исследований представлены на 14 научно-практических конференциях международного и всероссийского уровней. Опубликованные работы и содержание автореферата полностью соответствует основным положениям текста диссертационной работы.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа построена по классическому принципу и включает разделы введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований и обсуждение полученных результатов, а также выводы. Список литературы включает 315 источников. Работа изложена на 358 страницах, содержит 85 рисунков, 25 таблиц.

Введение включает актуальность исследования, степень ее проработанности, цели и задачи, описание теоретической и практической значимости, внедрение полученных результатов в практику, а также методологию и методы исследования, достоверность результатов, положения, выносимые на защиту, данные по апробации работы и личный вклад автора.

В главе обзор литературы представлена информация о моноклональных антителах и их модификациях, описание особенностей структуры, свойств и технологии получения однодоменных антител, а также опыте их практического применения в диагностике и терапии различных заболеваний. Кроме того, в разделе представлено описание вирусных и бактериальных объектов, которые были использованы автором для проведения исследований.

В главе материалы и методы представлен перечень используемого оборудования, микроорганизмов и рекомбинантных вирусных векторов, линий клеток млекопитающих, животных, плазмидных векторов, антител, рекомбинантных белков, различных реактивов для молекулярно-биологических процедур, сред для культивирования. Описаны основные методы, используемые автором для получения и исследования свойств однодоменных антител как *in vitro* так и *in vivo*. Указаны основные методические руководства, используемые при проведении доклинических исследований, и наименования протоколов клинических исследований, разработанных в ходе работы препаратов.

В главе результаты исследований приведены основные разделы с описанием экспериментальных данных - результаты получения и оценки нейтрализующих свойств однодоменных антител специфических вирусам лихорадки Эбола, коронавирусу SARCoV-2, ботулотоксину типа А, токсину В *C.difficile* и микоплазме *M.homonis*. Для каждого объекта описан процесс получения специфических антител, способы их модификации, разработка препаратов для доклинического и клинического использования, а также

испытания их активности на культурах клеток, животных моделях и клинических исследованиях на добровольцах. Для препаратов, прошедших Фазу 1 клинических исследований, представлены основные выводы о переносимости, однако полные данные, по-видимому, по причине сокращения объема диссертации, не представлены. Глава содержит основные экспериментальные данные применения разработанной платформы для получения молекул на основе неканонических однодоменных антител, имеющих диагностический потенциал. В частности, на моделях *M.hominis* и токсина *Clostridioides difficile* показана возможность использования однодоменных антител для детекции материала, содержащего патоген различными методами (ИФА, окрашивание колоний, проточная цитофлуориметрия, методом плазмонного резонанса).

В четвертой главе приведено обсуждение полученных в исследовании результатов, а также изложены перспективы дальнейшего применения основных результатов исследования. Работа завершается общим заключением и 5 основными выводами, которые обобщают основные результаты исследования.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с требованиями и полностью отражает основные результаты и содержание диссертации.

По представленной диссертационной работе принципиальных замечаний нет, однако стоит отметить большое число стилистических и орфографических ошибок, не полное описание подписей к некоторым рисункам, а также ограниченный формат представления некоторых данных (полные данные о проведенных доклинических и клинических исследованиях). Однако, указанные недостатки не оказывают существенного влияния на общую положительную оценку данного диссертационного исследования. По мере знакомства с основными результатами работы, возникают следующие вопросы:

1. Каковы перспективы применения препаратов на основе однодоменных антител в клинической практике для борьбы с инфекционными заболеваниями?

2. Несмотря на то, что автор не ставил задачу проведения сравнительных исследований однодоменных антител и антител, имеющих каноническое строение, можно ли провести сравнительную оценку их эффективности для борьбы с инфекционными агентами. Какова длительность сохранения клинического эффекта препаратов на основе однодоменных антител?

3. Имеет ли разработанная автором технологическая платформа завершённый вид и каковы перспективы ее дальнейшего развития?

Заключение

Диссертация Щеплякова Дмитрия Викторовича на тему «Разработка универсальной технологической платформы для создания средств терапии и диагностики инфекционных заболеваний на основе однодоменных антител» является завершённой научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований, была разработана универсальная технологическая платформа, позволяющих проводить отбор оригинальных специфических антител, имеющих неканоническое строение, а также создавать и тестировать препараты на их основе для борьбы с инфекционными заболеваниями человека. В условиях глобальных проблем инфекционной безопасности, проведенная научно-исследовательская работа демонстрирует перспективы практического использования разработанного методологического комплекса для решения задач отечественного здравоохранения.

По своей актуальности, новизне, научно-практической значимости диссертация Щеплякова Дмитрия Викторовича на тему «Разработка универсальной технологической платформы для создания средств терапии и диагностики инфекционных заболеваний на основе однодоменных антител» соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание

ученой степени доктора наук согласно п. 9-14 «Положение о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 и последующих редакций Постановлений Правительства РФ включая N 415 от 18.03.2023, N 1786 от 26.10.2023, N 62 от 25.01.2024 и N 1382 от 16.10.2024), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Щебляков Дмитрий Викторович заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальностям 3.2.7. Иммунология (биологические науки), 1.5.6. Биотехнология (биологические науки).

Заведующий лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова», д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН



Костинов Михаил Петрович

«03» марта 2025

Я, Костинов Михаил Петрович, даю согласие на обработку моих персональных данных в отзыве и размещение их в сети Интернет.

Подпись д.м.н., профессора Костинова М.П. заверяю.

Заместитель директора ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова»

к.м.н.

«__» _____ 2025



Артемьева Ольга Владимировна

Адрес: Россия 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а

Тел.+7 (495) 917-49-00

mech.inst@mail.ru



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ «НИИВС им.И.И. Мечникова»)