

Отзыв

официального оппонента член-корреспондента РАН, доктора медицинских наук Кудлая Дмитрия Анатольевича 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

Несмотря на значительные усилия научного и медицинского сообщества, инфекционные заболевания остаются одним из существенных факторов в структуре общей летальности как в Российской Федерации, так и во всем мире. При этом, в период сезонных подъемов заболеваемости, а также в периоды возникновения пандемий, вызванных новыми инфекционными агентами, риски для системы здравоохранения многократно возрастают. В связи с этим не теряют актуальности исследования, направленные на изучение способов борьбы с инфекционными заболеваниями, изучение новых мишеней и разработку новых средств профилактики и терапии. Моноклональные антитела, являются одним из перспективных инструментов для терапии различных заболеваний и активно применяются в клинической практике. Несмотря на то, что основными областями клинического применения моноклональных антител остаются онкология, аутоимунные заболевания, нейродегенеративные заболевания и патологии, связанные с воспалением, спектр терапевтического применения антител постоянно расширяется, включая борьбу с инфекционными заболеваниями.

При этом, с момента открытия гибридной технологии и начала активного внедрения моноклональных антител в практику, в результате многочисленных исследований в области иммунологии и генной инженерии, для научного и клинического применения стали использовать не только

антитела, имеющие классическое строение, но и их отдельные фрагменты, биспецифические молекулы, конъюгаты антител с различными белками и т.д.

Одним из современных подходов, представленным в рассматриваемой диссертационной работе, может являться использование однодоменных антител, являющихся частью вариабельного фрагмента иммуноглобулинов, найденных у представителей семейства верблюдовых и имеющих неканоническую структуру. Такие антитела характеризуются высокой растворимостью, преимущественным формированием протяженных CDR3 регионов, простотой селекции и модификации. Указанные свойства однодоменных антител могут обеспечивать преимущества при поиске специфических молекул, обладающих нейтрализующей активностью в отношении инфекционных агентов, в том числе молекул к консервативным антигенам высоко изменчивых патогенов. В связи с этим изучение и использование технологической платформы, позволяющей разрабатывать средства терапии и диагностики на основе однодоменных антител является актуальной задачей, а проведение комплексных исследований, посвященных разработке комплекса методологических подходов, позволяющих получать такие препараты является важной и актуальной задачей для отечественного здравоохранения.

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

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, которые содержатся в диссертации, подтверждаются логической целостностью работы, использованием значительного объема эмпирического материала, широкого перечня анализируемых научных публикаций и, не вызывающими сомнения, результатами исследования. Всего по теме диссертации было проанализировано 315 источников.

Автором проведено достаточное количество исследований с использованием широкого спектра иммунологических, биотехнологических и молекулярно-биологических методов, с использованием уникальных моделей

in vivo, большого набора клеточных линий, клинического материала. Объем проведенных исследований достаточен для выработки обоснованных заключений. Все экспериментальные результаты получены с использованием современных методических подходов и оборудования. Результаты проанализированы и обработаны адекватными статистическими методами и достоверны. Выводы обоснованы, вытекают из экспериментальных данных, полученных диссертантом, и в полной мере отражают результаты исследований.

Соискателем проведена положительная апробация результатов исследования на различных международных и всероссийских научных конференциях. Всего по теме исследования было опубликовано 38 статей, 26 из которых - в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для публикации основных научных результатов диссертации, а также 9 патентов РФ на изобретения. Результаты исследования внедрены в учебный процесс в составе лекционных курсов «Основы молекулярной биотехнологии» и «Конструирование лекарственных и диагностических препаратов» кафедры биотехнологии и промышленной фармации ИТХТ им. М.В. Ломоносова Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет», а также внедрены в учебный процесс подготовки научных и научно-педагогических кадров кафедры инфектологии и вирусологии Института профессионального образования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первого московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Таким образом, можно сделать вывод, что научные положения, выводы и рекомендации, которые содержатся в диссертации Щеблякова Д.В., являются в достаточной степени обоснованными и достоверными.

Научная новизна исследования

Диссертация Щеблякова Д.В. направлена на разработку методологии и научных подходов, направленных на применение антител, имеющих неканоническое строение и открытых у семейства верблюдовых, для борьбы с инфекционными агентами. Для достижения данной цели автором были поставлены и решены задачи исследования, а полученные решения нашли свое отражение в научных результатах, которые безусловно содержат элементы научной новизны. В частности, научная новизна исследования обусловлена различными находками автора при создании технологической платформы, позволяющей проводить эффективный поиск однодоменных антител и изучение их терапевтического потенциала. Так, при создании иммунных библиотек для формирования напряженного гуморального иммунного ответа у верблюдовых изучена возможность применения различных схем и антигенного материала, в том числе метода генетической иммунизации с использованием рекомбинантных вирусных векторов (rAd5, rVSV), несущих гены антигенов-мишеней. Кроме того, автором предложен оригинальный подход амплификации переменных доменов неканонических антител из В-клеток верблюдовых. Изучено влияние различных модификаций полученных молекул однодоменных антител на их терапевтическую активность, фармакокинетику и иммуногенность в исследованиях на животных, а также в клинических исследованиях на добровольцах.

Существенной заслугой автора в части научной новизны является получение ряда оригинальных генетических конструкций, а также подходов при выделении и очистке антигенов, используемых для получения иммунных библиотек. В процессе разработки платформы автором на 5 инфекционных агентах (вирус Эбола, коронавирус SARS-Cov-2, *C.botulinum*, *C.difficile*, *M.hominis*) была продемонстрирована возможность её применения как для борьбы с инфекционными заболеваниями, так и для детекции патогена. В частности, выделены антитела, обладающие вируснейтрализующей активностью в отношении вируса Эбола и коронавируса SARS-cov-2,

разработаны модели оценки протективной активности нейтрализующих однодоменных антител с использованием летальной инфекции мышей, хомяков, макак-резусов, изучено влияние модификаций антител (димеризация, конъюгация однодоменного антитела с Fc-фрагментом различных изотипов, содержащим мутации, модулирующие аффинность к Fc-рецепторам) на их защитную эффективность. Кроме того, эффективность используемых подходов была подтверждена и с использованием бактериальных моделей. В частности, получена оригинальная иммунная библиотека однодоменных антител альпака (Lama Pacos), специфичных к ботулотоксину серотипа А *C.botulinum*. При отборе специфичных к ботулотоксину типа А антител, впервые показана возможность использования рекомбинантных бактериофагов, несущих на поверхности однодоменные антитела, для нейтрализации ботулотоксина на модели летальной интоксикации мышей. Для наиболее перспективного клона методом молекулярного докинга и молекулярной динамики предложена возможная модель нейтрализации – взаимодействие антител с ганглиозид- связывающим сайтом ботулотоксина, участвующего в рецептор- опосредованном транспорте токсина в клетки. Также, как и на предыдущих моделях, автором изучена роль различных модификаций однодоменных антител (димеры, Fc-фьюжн однодоменные антитела) в усилении их терапевтической активности на модели летальной интоксикации ботулотоксином типа А. Указанные модификации позволили значительно повысить терапевтический потенциал отобранных антител (терапевтическая доза менее 1 мкг/мышь).

Научной новизной работы также является получение оригинальных однодоменных антител, связывающихся с *M.hominis*, и идентификация специфической мишени для связывания – субстрат-связывающего белка ABC-транспортера *M. hominis*, функции которого не до конца изучены и который, учитывая антимикробные свойства отобранных антител, может являться перспективной мишенью для разработки средств антимикоплазменной терапии. Впервые показано, что присоединение к VHH Fc-фрагмента

иммуноглобулина G2a мыши, обеспечивает доставку химерных молекул VHH-Fc на поверхность слизистой оболочки урогенитального тракта. Впервые показано, что генетическая пассивная иммунизация оказывает защитный эффект на модели экспериментальной урогенитальной инфекции у мышей, вызванной *M. hominis*.

Кроме того, автором было показано, что полученные антитела к токсину В *C.difficile* способны подавлять цитотоксическое действие TcdB в условиях *in vitro* на культуре клеток Vero и также могут иметь терапевтический потенциал. Кроме того, автором показано, что полученные молекулы однодоменных антител могут быть использованы в диагностике для создания биосенсоров, в частности на модели детекции токсина В *C.difficile* методом плазмонного резонанса.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Одним из основных практических результатов, полученным в ходе выполнения исследования является разработка технологической платформы для создания и тестирования препаратов на основе однодоменных антител, позволяющая решать конкретные задачи, встающие перед отечественным здравоохранением в области контроля и терапии инфекционных заболеваний. При ее создании автором были применены ряд оригинальных находок и ноу-хау.

С использованием разработанной методологии, автором получены оригинальные препараты имеющие перспективы практического применения. Так, автором получен препарат «ГамКовиМаб» для экстренной профилактики и этиотропной терапии COVID-19, успешно проведены доклинические и клинические исследования II фазы данного препарата. Кроме того, разработан препарат «ГамЭмаб» для экстренной профилактики и этиотропной терапии лихорадки Эбола, созданный на основе моноклональных антител, показавших наибольшую протективную активность на макаках-резусах. Проведены доклинические и клиническое исследование I фазы. Также разработан препарат для терапии интоксикации ботулотоксином типа А. Проведены

доклинические исследования эффективности и безопасности препарата, а также проводится клиническое исследование I-II фазы. Следует отметить, что показанные автором результаты практического применения однодоменных антител в значительной степени нивелируют часто озвучиваемый скепсис в отношении перспектив использования препаратов на основе антител такого класса в клинической практике. Очевидно, что вариабельные домены неканонических антител верблюдовых (VHH), в результате широких возможностей их модификации, могут быть использованы не только в качестве самостоятельной молекулы, но и в составе молекул, имеющих каноническое строение в качестве антиген-распознающей части. Многообразие форматов их применения открывает широкие возможности, в том числе и в области разработки средств борьбы с инфекциями.

Кроме того, в работе показано, что полученные с помощью платформы антитела могут иметь и диагностический потенциал для выявления инфекционных агентов. В частности получены оригинальные однодоменные антитела, связывающиеся с CROPS доменом токсина TcdB *C.difficile*. Впервые показана возможность их использования для разработки биосенсоров для детекции токсина *Clostridioides difficile* методом плазмонного резонанса. Разработаны и утверждены технические условия, эскизный и технические проекты, а также проведены испытания тест-системы «Однодомен-Био». 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 Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет». Также, теоретические и практические результаты, полученные в ходе выполнения работы были внедрены в учебный процесс подготовки научных и научно-педагогических кадров кафедры инфектологии и вирусологии Института профессионального образования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первого московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

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

Поставленная цель и задачи исследования определили логику проведения исследования и изложения результатов, структуру 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 включает 358 страниц, 85 рисунков, 25 таблиц.

Изложение диссертационной работы представляет логически обоснованную последовательность решения поставленных задач исследования и представления данных решений в виде научных результатов и выводов. Диссертационная работа отличается внутренним единством и аргументированностью, высокой степенью детализации и визуализации излагаемого материала.

Во введении автором обоснована актуальность исследования, степень ее проработанности, корректно сформулированы цели и задачи, теоретическая и практическая значимость выполненной работы, внедрение полученных результатов в практику, методология и методы исследования, достоверность результатов, положения, выносимые на защиту, данные по апробации работы и личный вклад автора.

Необходимо отметить, что, в обосновании актуальности своей диссертационной работы, автор ссылается на недостатки, присущие современным терапевтическим антителам. Прежде всего, автор ссылается на недостатки в биодоступности для органов и тканей классических полноразмерных антител. При этом данные о сравнительных фармакокинетических исследованиях и исследованиях биодоступности для органов и тканей, так же, как и сравнительные исследования стабильности, не приводятся. Разработанные тест-системы на основе неканонических антител

не сравниваются по эксплуатационным свойствам с тест-системами на основе классических антител.

В первой главе представлен обзор литературы в области моноклональных антител и их модификаций, раздел, описывающий особенности структуры, свойств, технологии получения однодоменных антител и опыт применения однодоменных антител в диагностике и терапии различных заболеваний. Дополнительно, автор подробно представляет описание основных вирусных и бактериальных мишеней, которые были выбраны автором для проведения исследований (вирус Эбола, коронавирус SARS-Cov-2, ботулотоксин типа А *C.botulinum*, токсин В *C.difficile*, а также микоплазма *Mycoplasma hominis*).

Во второй главе отражены материалы и методы исследования, 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 и др. Указаны методы получения всех используемых в работе антигенов (рекомбинантных белков, отдельных компонентов микроорганизмов или их токсинов, а также рекомбинантных вирусных векторов, используемых для пассивной иммунизации). Описаны методы получения иммунных библиотек однодоменных антител, проведения селекции методом фагового дисплея, получения очищенных рекомбинантных антител и исследования их физико-химических и иммунологических характеристик. Также описаны методы получения различных модификаций однодоменных антител, применяемых в работе, методы оценки нейтрализующей активности молекул антител в отношении ботулотоксина типа А, вируса Эбола, коронавируса SARS-Cov-2 токсина В *C.difficile* и *M.hominis* как *in vitro* так и *in vivo*. Кроме того, указаны основные методические руководства, используемые при проведении доклинических исследований, и наименования протоколов клинических исследований препаратов, разработанных в ходе выполнения диссертационной работы. При этом стоит отметить, что для лучшей оценки и интерпретации

результатов проведенных клинических исследований, в разделе “Материалы и методы” следовало бы представить содержание протоколов или их синопсисов.

В третьей главе представлены результаты исследований. Глава разделена на несколько разделов, выстроенных в логическом порядке и дополняющих друг друга. В начале раздела автором приведена концепция универсальной технологической платформы, которая представляет собой совокупность методических подходов, позволяющих проводить эффективное создание библиотек неканонических антител, селекцию специфических молекул, а также комплексные решения по их дальнейшей модификации и использованию для создания препаратов, пригодных для практического применения. В следующих разделах, автором, по сути, представлено доказательство применимости разработанной концепции для решения поставленных задач на различных инфекционных агентах. Стоит отметить, что количество и разнообразие выбранных автором мишеней (вирус Эбола, коронавирус SARS-CoV-2, ботулотоксин А, токсин В *C.difficile*, *M.hominis*) убедительно доказывают эффективность разработанной методологии для комплексного решения задач, направленных на разработку средств борьбы с различными инфекционными агентами.

В частности, в разделе 3.2.1 автор описал результаты получения и оценки нейтрализующих свойств однодоменных антител, а также рекомбинантных антител с классической структурой в отношении вируса Эбола. Описаны результаты оценки нейтрализующей активности на культуре клеток, а также исследования на животных с использованием собственной разработанной модели на мышах и модели летальной инфекции макак-резусов. По результатам исследования, часть полученных антител легла в основу препарата «ГамЭмаб» для экстренной профилактики и этиотропной терапии лихорадки Эбола, для которого автором проведены доклинические исследования и клиническое исследование I фазы. В качестве замечаний к этому разделу хотелось бы отметить следующее: 1) Описание результатов эксперимента по

оценке протективной активности антител на модели летальной инфекции мышей rVSV-GP показывает, что 100% выживаемость мышей обеспечивается только при одновременном введении антител с вирусом rVSV-GP. При этом введение антител уже через 2 часа после инфицирования сопровождается существенным снижением показателя выживаемости мышей. 2) Учитывая высокую терапевтическую дозу (50 мг/кг) антител вводимых *in vivo*, можно предположить наличие ускоренного клиренса антител из организма за счет лимита взаимодействия с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Если целью применения является быстрое выведение комплекса антитела с вирусом, то такая доза оправдана, но в этом случае модификация однодоменных антител с Fc-фрагментом выглядит излишней. 3) Стоит отметить, что в эксперименте на макаках-резусах наилучший защитный эффект был показан на комбинации антител с классическим строением цепей 4) Результаты фармакокинетики представлены только с использованием однократного введения мышам, что может быть недостаточным для корректного измерения всех фармакокинетических параметров. 5) Не в полном объеме представлены результаты некоторых доклинических исследований токсичности, а также дизайна клинических исследований (обоснования выбора доз, способа введения препарата, изменения биохимических параметров, описания критериев переносимости препарата и ее интерпретации). Кроме того приведенные отрывочные данные по наблюдавшимся нежелательным явлениям не отражают характеристик безопасности в полной мере.

Далее в главе представлены результаты разработки препарата для экстренной профилактики и этиотропной терапии COVID-19. В данной части исследования автор приводит основные результаты по поиску оригинальных молекул однодоменных антител, их модификаций и разработки препарата ГамКовиМаб, основанном на комбинации двух клонов антител, обеспечивающих защитную эффективность против широкого спектра вариантов вируса SARS-CoV-2. В этом разделе также приведены основные данные о доклинических и клинических исследованиях препарата. Описание

разработки препарата ГамКовиМаб выполнено более полно, однако хотелось бы также увидеть в данном случае более подробное описание результатов исследования токсичности и клинического исследования.

Раздел продолжается описанием опыта применения разрабатываемого препарата на основе модифицированных однодоменных антител для терапии интоксикации, вызванной ботулотоксином типа А и исследований оригинальных однодоменных антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении токсина В *Clostridioides difficile* по аналогичному, описанному выше алгоритму.

Завершается глава основными результатами применения разработанной платформы для получения молекул на основе неканонических однодоменных антител, имеющих диагностический потенциал. В частности, в разделе 3.3.1 описаны результаты получения и характеристики неканонических однодоменных антител для детекции *M.hominis* различными методами (ИФА, окрашивание колоний, проточная цитофлуориметрия и др.). Кроме того, в разделе описаны результаты исследований по идентификации мишени, специфичной для отобранных антител, а также применения отобранных антител для терапии урогенитальной инфекции в формате пассивной генетической иммунизации. В заключительной части представлены результаты разработки биосенсоров на основе неканонических однодоменных антител для детекции токсина *Clostridioides difficile* методом плазмонного резонанса.

Стоит отметить, что большая часть экспериментальной работы, представленная автором, посвящена использованию разработанной технологии для целей терапии, тогда как ее диагностический потенциал описан в меньшей степени.

В четвертой главе проведено обсуждение полученных в исследовании результатов, а также перспектив дальнейшего применения основных результатов исследования. В заключении подводятся основные итоги диссертационного исследования. Отмечена перспективность разработанной

технологической платформы для ее научного и практического применения в качестве универсального инструмента для создания средств диагностики и терапии различных инфекционных заболеваний, как вирусной, так и бактериальной природы.

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.

Заключение

Изучение диссертации, автореферата и опубликованных автором работ позволяет сделать вывод о том, что исследование проведено соискателем самостоятельно, диссертация написана лично автором на высоком научном и профессиональном уровне с использованием современных методов научных исследований, обладает внутренним единством и содержит новые научные результаты, выдвигаемые на публичную защиту, является законченным научным трудом, в котором решена важная научная проблема, имеющая теоретическое и практическое значение.

Опубликованные работы в достаточной степени отражают содержание и основные результаты, полученные автором диссертации.

Диссертация Щеблякова Дмитрия Викторовича на тему «Разработка универсальной технологической платформы для создания средств терапии и диагностики инфекционных заболеваний на основе однодоменных антител» является завершенной научно-квалификационной работой, в которой, на основании выполненных исследований, был разработан комплекс методических подходов (технологическая платформа), позволяющих создавать и тестировать препараты на основе однодоменных антител, направленных на борьбу с инфекционными заболеваниями человека. На примере 5 различных инфекционных агентов была показана эффективность

