

## **Отзыв**

официального оппонента члена-корреспондента РАН, доктора биологических наук, профессора РАН Алешкина Андрея Владимировича на диссертацию Щеплякова 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**

В настоящее время моноклональные антитела активно используются в различных областях клинической практики, таких как иммунотерапия опухолей, терапия заболеваний, связанных с воспалением, аутоиммунных заболеваний и др. При этом, активно ведутся исследования в области разработки новых препаратов на основе моноклональных антител и расширения показаний к их применению. Различные научно-технические достижения в областях молекулярной биологии, генной инженерии и биотехнологии также значительно ускорили разработку и внедрение моноклональных антител в практику. И на сегодняшний день не менее 570 терапевтических моноклональных антител прошли клинические испытания, из которых более 80 препаратов получили разрешение Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) на использование и в настоящее время применяются.

Однако, высокая стоимость разработки и производства препаратов на основе моноклональных антител, имеющих каноническую структуру, трудоемкость получения модифицированных молекул на их основе, а также низкая скорость проникновения в определенные ткани и частая неспособность связывания с труднодоступными эпитопами определяет необходимость использования альтернативных антиген-распознающих молекул. Одним из

подходов для решения указанных недостатков может являть использование переменных доменов иммуноглобулинов, найденных у представителей семейства верблюдовых и имеющих неканоническую структуру. Так называемые однодоменные антитела характеризуются простой структурной организацией, широкими возможностями по селекции и модификаций, а также низкой стоимостью производства антител в формате VHH с использованием бактериальных продуцентов. Подтверждением актуальности использования однодоменных антител в практической медицине служит большое число исследований, направленных на разработку средств диагностики и терапии различных заболеваний, начавшихся в последнее десятилетие во всем мире, ряд из которых в настоящее время проходят клинические исследования. При этом большая часть из исследуемых препаратов направлены на иммунотерапию рака, лечение аутоиммунных заболеваний (псориаз, болезнь Крона) и/или в качестве противовоспалительных средств (атеросклероз, сепсис и др). И лишь незначительная часть исследований посвящена разработке средств терапии вирусных и бактериальных инфекций на основе таких неканонических антител. Очевидно, что в условиях растущего числа сезонных инфекционных заболеваний, вновь возникающих вирусных инфекций, способных вызывать пандемии и изменчивость возбудителей, а также потенциальной возможности использования инфекционных агентов в качестве биологического оружия, изучение и использование технологической платформы, позволяющей разрабатывать средства терапии и диагностики на основе однодоменных антител является актуальной задачей.

В связи с этим проведение комплексных исследований, направленных на разработку универсальной технологической платформы, позволяющей получать специфические однодоменные антитела и изучение возможности ее использования для создания средств терапии и диагностики инфекционных заболеваний является важной и актуальной задачей для отечественного здравоохранения.

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

Достоверность полученных результатов, обоснованность научных положений исследования подтверждается многократным наблюдением, использованием корректных контролей и методов статистической обработки экспериментальных данных. Диссертационная работа выполнена на современном методическом уровне на разнообразных инфекционных объектах, с использованием уникальных моделей *in vivo*, большого набора исследований на культурах клеток, а также данных, полученных в клинических исследованиях. Использованные статистические методы адекватны поставленным задачам. Проверка статистических гипотез осуществлялась при 95%-ом уровне значимости ( $p \leq 0,05$ ), используемом при проведении иммунологических и биотехнологических исследованиях. Обсуждение результатов представлено с использованием актуальных исследований в области изучения неканонических антител и их применения в терапии различных заболеваний. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим материалом. Выводы соответствуют цели и поставленным задачам, четко сформулированы и следуют из результатов выполненной работы. Объем материала и его качество являются достаточными для решения поставленных задач и обеспечивают достоверность результатов исследования и сформулированных выводов.

### **Научная новизна исследования**

Научная новизна исследования заключается в применении различных оригинальных подходов при разработке универсальной технологической платформы, позволяющей проводить эффективный поиск однодоменных антител и изучение их противомикробного потенциала. В частности, впервые изучена возможность применения различных методов пассивной иммунизации с использованием рекомбинантных вирусных векторов (rAd5, rVSV) для формирования напряженного гуморального иммунного ответа у

верблюдовых; в результате генетического анализа генома верблюдовых автором предложен оригинальный подход амплификации неканонических однодоменных антител при создании библиотек; впервые изучена роль различных оригинальных модификаций отбираемых антител для усиления их терапевтической активности, фармакокинетики и иммуногенности в исследованиях на животных, а также в клинических исследованиях на добровольцах.

Кроме того, автором впервые получен ряд оригинальных генетических конструкций, эукариотических продуцентов, а также разработана технология выделения и очистки рекомбинантных антигенов вирусной и бактериальной природы, используемых для получения иммунных библиотек. С использованием разработанного комплекса методических подходов автором на двух вирусных моделях и моделях бактериальных токсинов была продемонстрирована возможность использования платформы для разработки препаратов, направленных на борьбу с инфекционными заболеваниями. В частности, выделены антитела специфичные вирусу лихорадки Эбола. Разработаны модели оценки протективной активности нейтрализующих однодоменных антител на модели летальной инфекции мышей линии balb/c с использованием псевдотипированного вируса везикулярного стоматита. Впервые на модели летальной инфекции макаков-резусов вирусом лихорадки Эбола изучена протективная активность оригинальных моноклональных антител и их комбинаций, установлен аддитивный защитный эффект, а также изучено влияние модификаций антител, содержащих Fc-фрагменты различных изотипов, на защитную эффективность в отношении вируса Эбола.

Кроме того, еще на одной вирусной инфекции автором впервые получены оригинальные однодоменные антитела, обладающие нейтрализующей активностью в отношении вируса SARS-CoV-2. Изучен механизм нейтрализации, а также роль различных модификаций (димеры, биспецифические антитела, Fc-фьюжн однодоменные антитела) для усиления нейтрализующей активности. Впервые продемонстрирована возможность

использования оригинальных молекул однодоменных антител для предотвращения развития инфекции, вызванной вирусом SARS-Cov-2 на летальной модели с использованием hACE2 трансгенных мышей линии B6.Cg-

Впервые получена оригинальная иммунная библиотека однодоменных антител альпака (Lama Pacos), специфических ботулотоксину типа А *C.botulinum*. Впервые изучена возможность использования анатоксина *C.botulinum* в различных конформационных состояниях для эффективного отбора однодоменных антител с заданными свойствами. Впервые показана возможность использования рекомбинантных бактериофагов, несущих на поверхности однодоменные антитела, для оценки протективной активности однодоменных антител на модели летальной интоксикации мышей ботулотоксином. Для антитела B11 методом молекулярного докинга и молекулярной динамики предложена возможная мишень для связывания нейтрализующих антител – ганглиозид связывающий сайт, участвующий в рецептор опосредованном транспорте токсина в клетки. Так же 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.

Кроме того, автором получены однодоменные антитела, связывающиеся с *M.hominis*, и идентифицирована специфическая мишень для связывания – субстрат-связывающий белок ABC-транспортера *M. hominis*. Показано, что молекулы на основе специфических VHH могут быть использованы для детекции *M. hominis*, в том числе методом проточной флуориметрии. 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 М.

Еще на одной модели с использованием бактериального токсина автором показано, что оригинальные молекулы однодоменных антител могут быть использованы в диагностике для детекции токсина В *C.difficile* методом плазмонного резонанса. Впервые проведены сравнительные исследования стабильности полученных биосенсоров, основанных на применении однодоменных антител и антител, имеющих каноническую структуру. Кроме того, полученные антитела также продемонстрировали способность подавлять цитотоксическое действие TcdB в условиях *in vitro* на культуре клеток Vero.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

В результате выполнения работы автором была разработана технологическая платформа для создания и тестирования препаратов на основе однодоменных антител, позволяющая решать конкретные задачи, встающие перед отечественным здравоохранением в области контроля и терапии инфекционных заболеваний.

На основе разработанной платформы получен ряд препаратов, находящихся на разных стадиях клинических испытаний. В том числе:

- препарат «ГамКовиМаб» для экстренной профилактики и этиотропной терапии инфекции, вызванной вирусом SARS-Cov-2, обладающий высокой нейтрализующей активностью, а также широким спектром нейтрализации различных вариантов вируса SARS-Cov-2, вызывающих опасение по классификации ВОЗ (VOC): альфа, бета, гамма, дельта и омикрон. В настоящее время завершены клинические исследования Фазы II.

- препараты «ГамЭмаб» и «ГамЭзумаб» для экстренной профилактики и этиотропной терапии лихорадки Эбола, созданные на основе полученных моноклональных антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении вируса Эбола. Проведены доклинические исследования в полном объеме, а клинические исследования 1 фазы [NCT03428347].

Для ряда созданных на основе платформы оригинальных антител завершены доклинические испытания. В том числе,

- исследования эффективности и безопасности препарата для терапии ботулизма на основе оригинальных однодоменных антител, обладающих высокой нейтрализующей активностью в отношении ботулотоксина токсина А *C.botulinum*. Использование подходов, направленных на модификацию полученных антител (получение димеров однодоменных антител и молекул, слитых с Fc-фрагментом иммуноглобулина человека), позволило значительно повысить терапевтический потенциал отобранных антител (терапевтическая доза менее 1 мкг/мышь).

Показано, что полученные с помощью платформы антитела могут быть использованы для разработки тест-систем 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 методом плазмонного резонанса. Разработаны и утверждены ТУ, эскизный и технические проекты, а также проведены испытания тест-системы «Однодомен-Био» на основе разработанных биосенсоров.

Создание платформы основано на ряде оригинальных находок. В том числе

- впервые показана возможность использования метода пассивной иммунизации для получения иммунных библиотек неканонических антител.

- разработан ряд подходов к модификации (мультимеризация, получение Fc-фьюжн вариантов однодоменных антител) полученных однодоменных антител с целью увеличения их терапевтического потенциала, что позволило в десятки раз увеличить нейтрализующую активность антител.

- Разработан метод амплификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих переменные участки неканонических антител с использованием оригинальных праймеров.

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.

При разработке технологической платформы однодоменных антител и изучении возможности ее использования для создания средств диагностики и терапии инфекционных заболеваний на основе однодоменных антител и молекул на их основе 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». 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 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**

Материалы диссертации полно представлены в печати. 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 включает 358 страниц, 85 рисунков, 25 таблиц.

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

В первой главе представлен обзор литературы современного состояния исследований в области моноклональных антител и их модификаций, особенностей структуры и технологии получения однодоменных антител, опыт применения однодоменных антител в диагностике и терапии различных заболеваний, а также 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*). Обзор позволяет дать полное представление о современном состоянии исследований в области применения моноклональных антител в терапии, а также позволило автору обосновать необходимость проведения исследований в выбранной области и моделях.

Во второй главе отражены материалы и методы исследования. 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). Описан метод получения иммунных библиотек однодоменных антител, начиная от иммунизации и выделения лимфоцитов до амплификации последовательностей VHH, получения библиотеки фагов, проведения селекции методом фагового дисплея и получения очищенных рекомбинантных антител и исследования их физико-химических и иммунологических характеристик. 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 как *in vitro* так и *in vivo*. Кроме того, описаны основные методические руководства, используемые при проведении доклинических исследований, и протоколы клинических исследований разработанных в ходе работы препаратов.

В третьей главе представлены собственные результаты исследований. В разделе 3.1 схематично представлен комплекс разработанных и используемых методических подходов, применяемых автором для разработки препаратов для терапии и диагностики инфекционных заболеваний на основе однодоменных антител. В разделе 3.2 и его подразделах представлены результаты, описывающие получение и исследование молекул на основе

неканонических однодоменных антител и их модификаций для экстренной профилактики и терапии инфекционных заболеваний. В частности, в разделе 3.2.1 автор описал результаты успешного создания препарата, обладающего нейтрализующей активностью в отношении вируса Эбола, начиная от иммунизации альпака до отбора отдельных клонов антител, получения модифицированных молекул, создания стабильных продуцентов антител, а также исследования их 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 автором была выбрана комбинация из двух моноклональных антител, которая показала лучшие протективные свойства на животных и на основе которых был создан препарат, для которого выполнены ДКИ в полном объеме, а также выполнены клинические исследования Фазы I, основные результаты которых также представлены в этом разделе. В разделе 3.2.2 и его подразделах представлены результаты разработки препарата для экстренной профилактики и этиотропной терапии COVID-19. Данной части исследования автор приводит основные результаты по поиску оригинальных молекул антител, изучению их свойств, а также анализу нейтрализующей активности их различных модификаций и комбинаций. Результатом этой части исследования явилась разработка препарата ГамКовиМаб, основанном на комбинации двух клонов антител, обеспечивающих защитную эффективность против широкого спектра вариантов вируса SARS-Cov-2. Также как и в случае препарата для терапии лихорадки Эбола, в этом разделе приведены основные многочисленные данные о доклинических и клинических исследованиях препарата ГамКовиМаб. В разделе 3.2.3 и его подразделах представлены результаты использования описанной технологической платформы при разработке препарата на основе модифицированных однодоменных антител для терапии интоксикации, вызванной ботулотоксином типа А. Исследования также проведены по схеме от получения антигенного материала, до получения иммунной библиотеки,

селекции, анализа клонов и их модификация, а также проведение *in vitro* и *in* интоксикации. Примечательным является обсуждения вероятной мишени для нейтрализующих антител. В разделе 3.2.4. приведены результаты экспериментальных исследований еще одних полученных оригинальных однодоменных антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении токсина В *Clostridioides difficile*. Показана роль димеризации антител в усилении специфической активности антител в реакции нейтрализации токсина на культуре клеток Vero E6.

В разделе 3.3 автор переходит к описанию основных результатов применения разработанной платформы для получения молекул на основе неканонических однодоменных антител и их модификаций, имеющих диагностический потенциал при обнаружении и идентификации патогенных микроорганизмов. Так, в разделе 3.3.1 описаны результаты получения и характеристики неканонических однодоменных антител для детекции результаты конструирования библиотеки, физико-химических и иммунологических свойств наиболее перспективного клона, а также результаты применения 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 разработка модели урогениитальной инфекции у мышей и результаты применения отобранных антител для терапии инфекции в формате пассивной генетической иммунизации рекомбинантным аденовирусом, несущим ген найденного антитела. И наконец, в разделе 3.3.2 представлены результаты разработки биосенсоров на основе неканонических однодоменных антител для детекции токсина *Clostridioides difficile* методом плазмонного резонанса, в том числе сравнительные исследования стабильности биосенсора с иммобилизованными

однодоменными антителами и биосенсора с каноническими полноразмерными антителами.

В четвертой главе проведено обсуждение полученных в исследовании результатов в контексте с данными литературы по теме диссертации, а также перспективами 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.

### **Основные замечания и вопросы по рассматриваемой работе**

Хотелось бы отметить ряд вопросов, которые возникли в ходе ознакомления с основными результатами работы:

аков формат клинического применения однодоменных антител для борьбы с вирусными инфекциями и можно ли применять интраназальный способ введения для эффективной борьбы с патогенами, вызывающими респираторные инфекции?

читывая наличие данных клинических исследований, можно ли сделать вывод о безопасности применения препаратов на основе однодоменных антител?

аковы перспективы применения рекомбинантных бактериофагов, несущих на своей поверхности нейтрализующие антитела не только для проведения селекции, но и для терапии инфекций в клинической практике?

### **Заключение**

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 автором исследований, был разработан и апробирован комплекс методических подходов (технологическая платформа), позволяющих создавать и тестировать препараты на основе однодоменных

антител, направленных на борьбу с инфекционными заболеваниями человека; Проведенные комплексные исследования показали перспективность использования технологической платформы на основе однодоменных антител для разработки средств экстренной профилактики и этиотропной терапии различных инфекционных заболеваний. В клинических исследованиях показано, что препараты на основе однодоменных антител обладают низкой иммуногенностью (отсутствие образования антител к препарату в течение всего срока наблюдения), длительной фармакокинетикой (за счет применения Fc-фьюжн модификаций), а также благоприятным профилем безопасности; на 4 инфекционных моделях было установлено, что технологическую платформу можно эффективно использовать для разработки средств экстренной профилактики и терапии инфекционных заболеваний, вызванных как вирусными, так и бактериальными возбудителями; кроме того, проведенные исследования показали перспективность разработанной технологической платформы и для разработки тест-систем для выявления инфекционных агентов. В целом, проведенная научно-исследовательская работа демонстрирует перспективы практического использования разработанного методологического комплекса в качестве универсального инструмента для разработки средств диагностики и терапии инфекционных заболеваний.

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», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 и последующих редакций Постановлений Правительства РФ 1382 от 16.10.2024), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Щепляков Дмитрий Викторович заслуживает присуждения искомой степени

доктора биологических наук по специальностям 3.2.7. Иммунология (биологические науки), 1.5.6. Биотехнология (биологические науки).

Директор по новым продуктам ООО «Орфан-Био», доктор биологических наук, профессор РАН, член-корреспондент РАН

Алешкин Андрей Владимирович



«07» марта 2025 г.

Подпись Алешкина Андрея Владимировича заверяю:

Генеральный директор ООО «Орфан-Био»

Кандидат технических наук



Волкова И.М.



Общество с ограниченной ответственностью «Орфан-Био» (ООО «Орфан-Био»), 354340, РФ, Краснодарский край, Сириус ф.т., Сириус пгт., Триумфальный пр-д, д. 1, помещ. 2-037/16.

Тел. +7 911 220-28-88

Эл. почта: i.volkova@orphanbio.ru