МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук
(ИБГ РАН)

Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334
Тел.: (499)135-60-89, (499)135-98-84 Факс: (499)135-41-05
e-mail: info@genebiology.ru; http://www.genebiology.ru
ОКПО 00244660 **ОГРН** 1027739618037 **ИНН/ КПП** 7736020369/773601001

23.11.2026 № 12318-268

На № от

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор ИБГ РАН
академик РАН Георгиев П.Г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Солодкова Павла Павловича «Однодоменные антитела ламы для терапии и профилактики коронавирусной инфекции», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3. Молекулярная биология

1. Актуальность темы диссертационной работы

Разработка эффективных средств профилактики и терапии вирусных инфекций остается одной из важнейших задач современной молекулярной биологии, вирусологии и биомедицины. Особую актуальность данное направление приобрело в связи с пандемией COVID-19, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, и последующим появлением многочисленных вариантов вируса, характеризующихся высокой генетической изменчивостью и способностью уклоняться от действия антител, сформированных в результате вакцинации или перенесенной инфекции.

Одним из перспективных направлений создания противовирусных препаратов является разработка моноклональных антител, способных эффективно нейтрализовать вирусные частицы и препятствовать инфицированию клеток. Вместе с тем широкое распространение вариантов SARS-CoV-2, обладающих мутациями в рецептор-связывающем домене (RBD) S-белка, существенно ограничило возможности применения ряда ранее разработанных терапевтических антител. В этой связи особый интерес представляет получение широко нейтрализующих антител, направленных против консервативных участков вирусных белков, сохраняющихся при эволюции возбудителя.

В качестве перспективных молекул для решения данной задачи рассматриваются однодоменные антитела верблюдовых (VHH), обладающие небольшими размерами, высокой стабильностью и возможностью создания различных мультимерных конструкций. Благодаря этим свойствам VHH представляют значительный интерес для разработки новых иммунотерапевтических препаратов.

Таким образом, диссертационная работа Солодкова П.П., направленная на разработку подходов к получению широко нейтрализующих однодоменных антител ламы против различных вариантов SARS-CoV-2, является актуальным научным исследованием, имеющим как фундаментальное, так и прикладное значение.

2. Степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа имеет классическую структуру и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложение результатов собственных исследований, обсуждение, выводы и список литературы.

Для решения поставленных задач автором использован широкий комплекс современных молекулярно-биологических, иммунологических, биохимических и вирусологических методов. В частности, применены методы получения рекомбинантных вариантов RBD S-белка SARS-CoV-2, многоэтапной иммунизации ламы, конструирования фаговых библиотек VHH, аффинной селекции методом фагового дисплея, иммуноферментного анализа, проточной цитометрии и биослойной интерферометрии. Функциональные свойства полученных антител исследованы с использованием системы псевдотипированных лентивирусов, а защитные свойства отдельных антительных конструкций дополнительно оценены на модели сирийских хомячков.

Следует отметить комплексный характер проведенного исследования. Автор не ограничивается получением и первичной характеристикой антигенспецифичных VHH, а последовательно анализирует их аффинность, эпитопную специфичность, нейтрализующую активность, особенности аминокислотных последовательностей и возможности применения в составе димерных конструкций с Fc-фрагментом иммуноглобулина человека.

Особого внимания заслуживает использование последовательной иммунизации ламы различными вариантами RBD SARS-CoV-2, а также RBD родственного вируса SARS-CoV. Такой подход позволил сформировать репертуар антител с более широким спектром специфичности по сравнению с репертуаром, полученным после иммунизации исходным уханьским вариантом RBD.

Основные положения, выносимые автором на защиту, логично сформулированы и отражают наиболее существенные результаты проведенного исследования. Полученные экспериментальные данные согласуются между собой, а выводы в целом соответствуют представленным результатам и поставленным задачам. Достоверность результатов обеспечивается использованием взаимодополняющих экспериментальных методов, применением современных подходов к анализу взаимодействия антител с антигенами, проведением независимых экспериментальных постановок и использованием релевантных методов статистической обработки данных.

Вышеприведенное позволяет считать основные научные положения и выводы диссертационной работы Солодкова П.П. обоснованными и достоверными.

3. Научная новизна результатов исследования

Научная новизна работы заключается прежде всего в разработке и экспериментальной апробации комплексной стратегии получения широко нейтрализующих однодоменных антител к быстро эволюционирующему вирусу SARS-CoV-2.

В работе впервые показана эффективность последовательной иммунизации ламы антигенами, представляющими RBD эволюционно разошедшихся коронавирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV, для формирования репертуара VHH с расширенной перекрестной реактивностью. Существенным результатом исследования является получение двух фаговых библиотек VHH, различающихся по спектру нейтрализующей активности, и выявление с использованием методов дифференциального скрининга девяти нейтрализующих однодоменных антител, распознающих четыре независимые области RBD. Особую научную значимость имеет идентификация трех широко нейтрализующих VHH – 9A7, 9A58 и 9D60, сохраняющих активность в отношении широкого спектра вариантов SARS-CoV-2, включая варианты с выраженным иммунным ускользанием. Показано, что данные антитела распознают консервативные эпитопы RBD, относящиеся к классам 4 и 5. Важным результатом является установление взаимосвязи между уровнем соматического гипермутагенеза VHH и расширением спектра их нейтрализующей активности. На основании анализа последовательностей показано, что формирование широко нейтрализующих антител может происходить как за счет аффинного созревания ранее сформированных клонов, так и вследствие появления новых клональных вариантов. Отдельного внимания заслуживает проведенное эпитопное картирование полученных антител методом конкурентной биослойной интерферометрии с использованием панели референсных антител. Это позволило установить особенности взаимного расположения

участков связывания исследуемых VHH и определить перспективные сочетания антител для последующего конструирования мультиспецифичных молекул.

Таким образом, результаты диссертационной работы расширяют представления о механизмах формирования широко нейтрализующего гуморального иммунного ответа и демонстрируют перспективность направленной последовательной иммунизации как инструмента получения антител против быстро эволюционирующих вирусных патогенов.

4. Значимость для науки и практики результатов диссертационного исследования

Теоретическая значимость работы заключается в расширении современных представлений о формировании репертуара широко нейтрализующих антител при последовательном воздействии различных антигенных вариантов вируса. Установленные закономерности, касающиеся роли аффинного созревания и соматического гипермутагенеза, представляют интерес для дальнейшего изучения механизмов формирования перекрестно-реактивного противовирусного иммунитета.

Практическая значимость исследования определяется получением панели функционально охарактеризованных однодоменных антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении различных вариантов SARS-CoV-2, а также разработкой экспериментального подхода к их целенаправленному получению. Важным результатом является получение Fc-димеров на основе VHH, для которых продемонстрировано повышение нейтрализующей активности по сравнению с мономерными формами. При сравнении с моноклональными антителами человека показано, что отдельные Fc-димеры на основе VHH характеризуются сопоставимыми или превосходящими показателями аффинности и нейтрализующей активности. Следует также отметить, что защитные свойства ряда антительных конструкций были подтверждены в экспериментах in vivo на сирийских хомячках. Показано, что введение исследованных антител в профилактическом и терапевтическом режимах приводило к снижению вирусной нагрузки в легких животных и улучшению динамики изменения массы тела. Полученные результаты создают научную и экспериментальную основу для дальнейшего конструирования мультиспецифичных антител, направленных на несколько консервативных эпитопов вирусного RBD, что потенциально может повысить устойчивость терапевтических молекул к мутационному ускользанию вируса. Предложенная стратегия получения широко нейтрализующих VHH представляет интерес не только применительно к SARS-CoV-2, но и в качестве методологической основы для

разработки антительных препаратов против других быстро эволюционирующих вирусных патогенов.

5. Оценка содержания, степени завершенности и качества оформления диссертационного исследования

Диссертационная работа Солодкова Павла Павловича изложена на 151 странице машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, выводы и список литературы. Материал изложен последовательно, иллюстративный материал дополняет текст и способствует верному восприятию. Работа содержит 44 рисунка и 5 таблиц. Библиографический список включает 312 источников отечественной и зарубежной литературы.

Введение содержит обоснование актуальности темы, характеристику степени разработанности проблемы, четко сформулированные цель и задачи исследования, описание научной новизны, теоретической и практической значимости полученных результатов, а также основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы представляет собой последовательное изложение современных представлений о структуре и биологии SARS-CoV-2, механизмах формирования противовирусного иммунного ответа, особенностях эволюции вируса и иммунного ускользания, а также современных подходах к получению и использованию нейтрализующих моноклональных и однодоменных антител. Данный раздел позволяет оценить актуальное состояние исследуемой проблемы и обосновывает выбор экспериментальной стратегии.

Вторая глава содержит подробное описание использованных материалов, экспериментальных моделей и методов исследования. Представленный методический раздел позволяет получить целостное представление о последовательности выполнения экспериментов и примененных подходах к характеристике полученных антител.

В третьей главе последовательно представлены результаты получения и функциональной характеристики двух библиотек однодоменных антител, анализа их аффинности и нейтрализующей активности, сравнения Fc-димеров VHH с моноклональными антителами человека, а также эпитопного картирования полученных антител.

В четвертой главе автор проводит содержательное обсуждение результатов, анализирует особенности формирования широко нейтрализующих клонов, роль последовательной иммунизации и соматического гипермутагенеза в данном процессе, а

также рассматривает перспективы использования полученных VHH для создания новых терапевтических молекул.

Выводы диссертации логично следуют из представленных экспериментальных результатов и отражают решение поставленных задач.

По теме диссертационной работы опубликованы научные статьи в отечественных и зарубежных научных изданиях, в том числе статья в журнале Vaccines (2024), непосредственно посвященная получению широко нейтрализующих наноантител при последовательной иммунизации ламы различными вариантами RBD SARS-CoV-2. Результаты работы также представлены в материалах научных конференций. Кроме того, по тематике исследования зарегистрированы патенты Российской Федерации.

В целом диссертационное исследование представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполненную на хорошем методическом и научном уровне.

6. Замечания и вопросы по диссертационной работе

Следует отметить высокий методический уровень диссертационного исследования, комплексный характер проведенных экспериментов и актуальность полученных результатов. Принципиальных замечаний, снижающих научную значимость работы, нет.

Вместе с тем по диссертационной работе можно высказать следующие замечания и вопросы дискуссионного характера.

1) Хотелось бы видеть более информативные подписи к ряду рисунков, например, к рисункам 36, 43, 44. Желательно было бы привести минимальную конкретную информацию об эксперименте (что иммобилизовано, что в растворе…). Например, на рис. 44 приведены «сенсограммы конкурентного BLI-анализа связывания 9A7-Fc, 9A57-Fc, 9A58-Fc и 9D60-Fc с ACE2», при этом нужно додумывать, где был иммобилизован ACE2, а где RBD. Именно из этого эксперимента последовал важный нетривиальный вывод о том, что «широко нейтрализующие VHH 9A7, 9A58 и 9D60 реализуют свою активность по механизму, отличному от прямого блокирования взаимодействия RBD-ACE2».

2) В выводах работы приведены результаты только по однодоменным антителам. В указанных публикациях только одна статья по однодоменным антителам и один патент, описывающий нанотело H5 и его производное H5-Fc. Остальные публикации и патенты – о получении и использовании классических моноклональных антител. В работе есть сравнительный анализ всех этих антител в разных форматах, и он отражен в пункте 5 выводов. Возникает вопрос, какие именно результаты, полученные в данной диссертации с моноклональными антителами классической структуры, нашли отражение в указанных двух статьях и двух патентах по классическим антителам?

3) Диссертант не приводит аминокислотные последовательности новых полученных им нанотел (вероятно, это связано с их патентованием), кроме уже запатентованного нанотела H5, но тщательно анализирует их, строит диаграмму сходства их последовательностей. Интересно было бы включить в эту диаграмму другие известные из статей и патентов нанотела против RBD коронавируса SARS-CoV-2. В этой связи интересно было бы включить и нанотела, отобранные другими группами российских ученых и отраженных в российских патентах RU 2763001 (2021г.), RU № 2809183 (2023 г.), RU № 2794141 (2023 г.), и в соответствующих статьях, не упомянутых в этой диссертации.

4) Сотрудники нашего института являются одними из пионеров технологии однодоменных антител в нашей стране. По этой теме ими с соавторами из других организаций, начиная с 2006 г., опубликовано 50 статей в высокорейтинговых журналах и получено 20 российских и международных патентов, поэтому данная диссертационная работа представляет для нас особый интерес. К сожалению, в литературном обзоре этой работы мало внимания уделено отечественным разработкам в области применения нанотел и их производных для борьбы с вирусами (в частости, нескольким запатентованным разработкам для борьбы с вирусами гриппа и бешенства, опубликованным, начиная еще с 2011-2014 г.). Здесь, в частности речь идет об особом форматировании нанотел (тримеризующиеся нанотела, биспецифичные нанотела), иных методах доставки нанотел (с помощью вирусного вектора, аэрозольным путем) и др.

5) Хотя основным и наиболее изученным рецептором для проникновения вируса SARS-CoV-2 в клетки человека остается ACE2, накапливаются опубликованные данные о том, что коронавирус 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). В представленной работе эти данные почему-то не обсуждаются.

6) В работе продемонстрирована защитная активность отдельных Fc-димеров VHH на модели сирийских хомячков. Вместе с тем представляется важным дальнейшее исследование защитных свойств именно широко нейтрализующих антител 9A7, 9A58 и 9D60, в том числе в отношении современных вариантов SARS-CoV-2, с оценкой их эффективности при профилактическом и терапевтическом применении.

Вышеперечисленные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Солодкова Павла Павловича «Однодоменные антитела ламы для терапии и профилактики коронавирусной инфекции», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология, является завершенной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи, связанной с разработкой подходов к получению и функциональной характеристике широко нейтрализующих однодоменных антител против различных вариантов SARS-CoV-2.

Полученные автором результаты обладают научной новизной, теоретической и практической значимостью. В работе разработан и экспериментально апробирован подход к получению широко нейтрализующих VHH посредством последовательной иммунизации ламы различными антигенными вариантами коронавирусов. Получена и охарактеризована панель однодоменных антител, распознающих консервативные эпитопы RBD и сохраняющих нейтрализующую активность в отношении различных вариантов SARS-CoV-2.

По своей актуальности, научной новизне, объему проведенных исследований, достоверности полученных результатов и практической значимости диссертационная работа соответствует требованиям пунктов 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями и дополнениями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Солодков Павел Павлович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Отзыв на диссертационную работу обсужден и одобрен на межлабораторном семинаре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук 19 ноября 2026 г. (протокол № 2).

Отзыв на диссертационную работу составил доктор биологических наук Тиллиб Сергей Владимирович.

Тиллиб Сергей Владимирович,
доктор биологических наук,
главный научный сотрудник Лаборатории молекулярных биотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук

Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.
Телефон: +7 (499) 135-60-89, 135-60-13, 135-14-03
E-mail: info@genebiology.ru

ПОДПИСЬ Тиллиба С.В.
ЗАВЕРЯЮ
Ученый секретарь ИБГ РАН Набирочкина Е.Н.