

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

на диссертационную работу

Меркульевой Юлии Александровны

«Свойства рекомбинантного рецептор-связывающего домена S-белка SARS-COV-2, полученного в клетках CHO-K1», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

### **Актуальность темы диссертационного исследования**

Пандемия, вызванная новым коронавирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome 2), действительно, сделала вызов современному научному сообществу, включая вирусологов, эпидемиологов и молекулярных биологов. Совместными усилиями исследователей всего мира удалось в короткие сроки понять некоторые механизмы проникновения вируса в клетку хозяина, а также разработать вакцины и терапевтические подходы. Установлено, что вирус проникает в клетку с помощью рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка, который связывается с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (АПФ2, ACE2) клетки хозяина. Большинство нейтрализующих антител, вырабатываемых при инфекции или вакцинации, направлены на этот участок белка. Поэтому рекомбинантный белок RBD, получаемый в различных экспрессионных системах, используется для разработки вакцин против COVID-19, а также как потенциальная мишень для терапии и профилактики. Проблемой создания и использования рекомбинантного белка RBD являются отличия по структуре и свойствам от его природного аналога в составе S-белка в зависимости от используемой системы. В диссертационной работе для получения рекомбинантного RBD соискателем впервые использовалась клеточная линия CHO, известный продуцент терапевтических препаратов. Поэтому поставленная Юлией Александровной цель данной работы получить рекомбинантный рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка SARS-CoV-2 в клеточной линии CHO-K1 и изучение его свойств является актуальной задачей современной молекулярной биологии.

### **Структура и основное содержание диссертации**

Диссертационная работа Меркульевой Юлии Александровны изложена на 122 страницах машинописного текста и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований, обсуждения

результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 5 таблицами, а также двумя приложениями. Список литературы содержит 232 источника.

Во введении автор обосновывает актуальность тематики проведенной работы, приводит информацию о степени разработанности решаемой научной проблемы, четко формулирует цель и задачи для ее решения, подчеркивает научную новизну исследования, а также обозначает теоретическую и практическую значимость исследования, методологию и методы исследования, дает информацию о степени достоверности результатов, их апробации, а также личном вкладе в проведенное исследование.

В главе «Обзор литературы» автор приводит современные представления о проблеме коронавирусной инфекции, здесь приводятся классификация и характеристика коронавируса SARS-CoV-2, включая его жизненный цикл, биологическую, клиническую и эпидемиологическую характеристику коронавирусной инфекции COVID-19. В обзоре делается акцент на объект исследования, а именно: рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка как место уязвимости высокопатогенных для человека коронавирусов. В этой главе также анализируется роль RBD в разработке средств противодействия COVID-19. В заключении к обзору литературы автор делает справедливый вывод, что рекомбинантные варианты RBD SARS-CoV-2 или фрагменты S-белка, содержащие RBD, являются потенциальными мишенями для создания новых средств диагностики, терапии и профилактики коронавирусной инфекции COVID-19.

Вторая глава «Материалы и методы» содержит информацию об используемых реагентах, клеточных линиях, штаммах бактерий и вирусов. Значительная часть главы содержит описание используемых методов. Это современные методы молекулярной биологии и биохимии, такие как: дизайн и конструирование плазмидных векторов, трансфекция клеток CHO-K1, хроматографическая очистка рекомбинантных белков, белковый электрофорез и иммуноблоттинг, спектроскопия кругового дихроизма, жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией, малоугловое рентгеновское рассеяние, биослойная интерферометрия. Здесь также представлены иммунологические методы, необходимые для исследования иммуногенных свойств рекомбинантного белка. В целом, методы, используемые в работе, позволяют решить поставленную цель и задачи, результаты получены на достаточном количестве экспериментального и теоретического материала. Методы статистической обработки результатов выполнены корректно с использованием современных подходов.

В главе 3 «Результаты исследования» представлены результаты собственных исследований. Автором сконструирован интегративный плазмидный вектор pVEAL2-



RBD, и на основе клеточной линии CHO-K1 получен штамм CHO-K1-RBD, продуцент рекомбинантного RBD SARS-CoV-2, обеспечивающий синтез и секрецию гликозилированной формы RBD в культуральную среду. Показано, что белок RBD, полученный в клетках CHO-K1, содержит 244 аминокислотных остатка, в том числе гликозилированные. Вторичная структура RBD представлена  $\beta$ -складчатыми структурами (31,1%), поворотами (7,2%) и  $\alpha$ -спиралями (15,9%). Температура плавления RBD составляет  $47,82 \pm 0,17^\circ\text{C}$ . Третичная структура RBD имеет складчатую структуру, максимальный диаметр равный 8,3 нм, радиус вращения равный 2,48 нм. С помощью ТИФА показано, что сывороточные IgG реконвалесцентов COVID-19 и нейтрализующие моноклональные антитела специфически взаимодействуют с RBD. Методом биослойной интерферометрии установлено, что RBD связывается с рекомбинантным человеческим рецептором ACE2, при этом равновесная константа диссоциации (KD) равна  $58.2 \pm 1.3$  нМ. Установлено, что RBD вызывает специфический гуморальный иммунный ответ у мышей линии BALB/c, кроликов и хорьков, однако у сирийских хомячков вызывает слабый ответ как специфических IgG, так и нейтрализующих антител. Показано, что гидроокись алюминия и неполный адьювант Фрейнда, а также конъюгат RBD с комплексом полиглокин-спермидин и дсРНК *S. cerevisiae* в качестве адьюванта (RBD-ПГС+дсРНК) усиливают гуморальный иммунный ответ на RBD у мышей линии BALB/c. Статистически значимых различий между этими группами не выявлено. Установлено, что конъюгат RBD-ПГС+дсРНК также обеспечивает выработку RBD-специфических CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов у животных.

В главе 4 автор обсуждает полученные результаты с современных научных позиций. Отмечается, что был усовершенствован плазмидный вектор pVEAL заменой фактора резистентности к антибиотику Zeocin на фактор резистентности к пурамицину, что позволило ускорить процесс селекции трансформантов с 2-3 недель до 3 дней. При обсуждении результатов по изучению структуры и свойств RBD, полученного с применением клеток CHO-K1, автор анализирует образование мультимерных форм, образующихся при синтезе рекомбинантных вариантов RBD. Обсуждаются неодинаковые иммунные реакции на RBD SARS-CoV-2 у разных моделей мелких модельных животных, иммуногенные свойства RBD, а также факт необходимости адьювантов для создания эффективных субъединичных вакцин. В заключении автор кратко анализирует полученные результаты, отмечая, что RBD, полученный в клетках сирийского хомячка CHO-K1, может быть использован как в научных, так и прикладных исследованиях.

## **Научная новизна исследования и полученных результатов**

В диссертационном исследовании впервые получен обновленный интеграционный плазмидный вектор pVEAL и конструкция pVEAL2-RBD, обеспечивающая стабильную продукцию RBD SARS-CoV-2 в клетках CHO-K1. Впервые исследована первичная и вторичная структуры, а также параметры третичной структуры рекомбинантного RBD, секретируемого клетками CHO-K1, а также исследованы его антигенные и иммуногенные и некоторые физико-химические свойства.

Впервые для оценки иммуногенности RBD SARS-CoV-2 проведен сравнительный анализ моделей животных: мыши BALB/c, сирийские хомячки, хорьки и кролики. Также впервые исследовано влияние различных адъювантов природы на иммуногенные свойства RBD, а также разработан конъюгат RBD с полиглобулином, спермидином и дсРНК киллерного штамма дрожжей *S. cerevisiae* в качестве адъюванта, который способен индуцировать сильный специфический гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ у мышей линии BALB/c. Последний может рассматриваться как потенциальный вариант субъединичной вакцины против COVID-19.

Важно отметить, что штамм CHO-K1-RBD был депонирован в банк Коллекции культур клеток ГИЦ ВБ Вектор Роспотребнадзора, а также был получен патент РФ на изобретение № 2752858.

## **Теоретическая и практическая значимость результатов диссертационного исследования**

Проведенные исследования важны для фундаментальной науки, так как полученные результаты расширяют наши представления о роли структуры вирусного белка в формировании иммунного ответа. Практическая значимость результатов очевидна, так как сконструированный RBD SARS-CoV-2 белок может использоваться для разработки вакцины против COVID-19.

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

Выводы и рекомендации диссертационной работы корректны, они в полной мере отражают полученные результаты. Большая часть исследований проведена лично автором. Автор принимал непосредственное участие в статистическом анализе,



интерпретации данных, представлении результатов на конференциях, а также публикации результатов в рецензируемых журналах.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на 8-ми российских и международных конференциях. По результатам диссертации опубликовано 14 научных статей в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 5 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций.

### **Замечания и рекомендации, вопросы для дискуссии**

Принципиальных замечаний к диссертационной работе Меркульевой Ю.А. нет. При прочтении работы у меня возникли вопросы для дискуссии:

1. Учитывая различный иммунный ответ исследуемых видов животных на RBD SARS-CoV-2, можно ли ожидать различный ответ человека, учитывая гетерогенность популяции?
2. Какие структурные особенности рецептор-связывающего домена S-белка SARS-COV-2 необходимы для максимального иммунного ответа?

**Заключение.** Диссертационная работа Меркульевой Юлии Александровны на тему: «Свойства рекомбинантного рецептор-связывающего домена S-белка SARS-COV-2, полученного в клетках CHO-K1», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология, является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная проблема, имеющая существенное фундаментальное значение в молекулярной биологии, а именно, получен рекомбинантный рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка SARS-CoV-2 в клеточной линии CHO-K1 и изучены его биологические и иммунологические свойства. По объему и методологическому уровню выполненных исследований, научной новизне, практической значимости, достоверности полученных результатов и выводов диссертационная работа Меркульевой Ю.А. полностью соответствует требованиям ВАК п. 9 «О порядке присуждения ученых степеней» Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, от 01.10.2018 г. №1168, с изменениями от 11.09.2021 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание

ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени.

**Официальный оппонент:**



Гуляева Людмила  
Федоровна

доктор биологических наук, профессор  
Заведующая лабораторией молекулярных  
механизмов канцерогенеза Федерального  
исследовательского центра  
фундаментальной и трансляционной  
медицины  
г. Новосибирск, 630117  
ул. Тимакова 2/12  
Телефон: +7 383 334 8840  
E-mail: lfgulyaeva@gmail.com

Подпись д.б.н., проф. Л.Ф. Гуляевой  
заверяю:

Начальник отдела кадров ФИЦ ФТМ  
Минеева О.М.

17 января 2023 г.

