

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

«УТВЕРЖДАЮ»

**ИНСТИТУТ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ
БИОЛОГИИ**

СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИМКБ СО РАН)

пр. Академика Лаврентьева, д. 8/2, Новосибирск, 630090
телефон (383) 3639042, факс (383) 3639078
e-mail: info@mcb.nsc.ru
<http://www.mcb.nsc.ru>

ОКПО 30781167, ОГРН 1115476157070,
ИНН / КПП 5408291757 / 540801001

27.01.2023 № 15318-06-6215/08

На № _____ от _____

Директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук



С.А. Демаков

«27» января 2023 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Меркульевой Юлии Александровны на тему
«Свойства рекомбинантного рецептор-связывающего домена S-белка
SARS-CoV-2, полученного в клетках CHO-K1» на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

Актуальность темы исследования

Пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, стимулировала значительный интерес к изучению данного заболевания, а также разработке и производству средств терапии и профилактики. Наибольшее внимание было уделено исследованию поверхностного гликопротеина S SARS-CoV-2 и его рецептор-связывающего домена (RBD). Рекомбинантные варианты RBD и содержащие его фрагменты

диагностикумов, а также для поиска перспективных моноклональных антител, аптамеров различной природы и низкомолекулярных ингибиторов для борьбы с COVID-19. Для получения RBD применяются разнообразные схемы наработки и очистки с использованием различных систем экспрессии. При этом в зависимости от используемого протокола структура белка, равно как и его свойства, могут значительно меняться. Поэтому важно не только обеспечить высокую эффективной наработки рекомбинантного RBD, но также убедиться, что получаемый при этом белок по своим свойствам максимально близок к нативному варианту, входящему в состав гликопротеина S SARS-CoV-2.

Представленная работа посвящена детальному исследованию антигенных, иммуногенных, структурных и физико-химических свойств RBD, полученного с помощью клеточной линии CHO-K1, которая на сегодняшний день является одним из основных продуцентов, используемых при получении терапевтических белков. В этой связи актуальность диссертационной работы Меркульевой Юлии Александровны не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Представленные автором данные обладают несомненной научной ценностью и новизной. Так, на основе системы транспозона Sleeping Beauty автором разработан оригинальный интегративный плазмидный вектор pVEAL2-RBD, обеспечивающий геномную интеграцию и экспрессию последовательности RBD SARS-CoV-2 в клетках CHO-K1. С использованием данного вектора получен эффективный продуцент CHO-K1-RBD, обеспечивающий выход целевого белка на уровне 100 мг с литра культуральной среды. В работе впервые комплексно охарактеризованы структурные, антигенные, иммуногенные и некоторые физико-химические свойства полученного рекомбинантного RBD. Автором впервые проведен сравнительный анализ моделей животных (мыши BALB/c, сирийские

хомячки, хорьки и кролики) для оценки иммуногенности RBD SARS-CoV-2. Примечательным результатом является исследование феномена слабо выраженного гуморального иммунного ответа на RBD у сирийских хомячков – одной из часто используемых моделей для исследования вакцин против COVID-19. Кроме того, автором предложен оригинальный вариант потенциальной субъединичной вакцины, содержащей RBD с полиглокином, спермидином и дсРНК киллерного штамма Y 448 дрожжей *S. cerevisiae* в качестве адъюванта. Указанный иммуноген при внутримышечной иммунизации мышей линии BALB/c показал хороший профиль безопасности и иммуногенности, и одновременно обеспечивал значительное усиление специфического иммунного ответа, причем как гуморального, так и Т-клеточного.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая и практическая значимость не вызывает сомнений. Полученный в работе штамм CHO-K1-RBD обеспечивает эффективный синтез рекомбинантного RBD SARS-CoV-2, обладающего антигенными и иммуногенными свойствами подобными природному вирусному спайковому домену. Штамм депонирован в банк Коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, на изобретение получен патент РФ № 2752858. Продуцент подходит для масштабного производства белка RBD, который в свою очередь может быть использован для создания отечественных ИФА тест-систем и вакцин на основе RBD. Данные о свойствах RBD, получаемого в клетках CHO-K1, а также выводы об особенностях применения животных моделей для изучения RBD, безусловно, являются актуальными и важными для дальнейших исследований, связанных с разработкой вакцинных препаратов и средств диагностики коронавирусной инфекции. Кроме того, полученные в ходе проведения исследования результаты являются полезными

с точки зрения накопления фундаментальных знаний о структуре и физико-химических свойствах RBD.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений

Положения и выводы диссертационной работы являются научно обоснованными. Результаты являются достоверными и опираются на экспериментальные и литературные данные. В работе использован широкий спектр современных методов, получен большой объем экспериментального материала, использованы методы статистической обработки. Анализ и интерпретация результатов выполнены грамотно и позволяют сделать обоснованные выводы и заключения.

Общая оценка работы

Диссертационная работа изложена на 122 страницах машинописного текста и содержит 26 рисунков, 5 таблиц и 2 приложения. Список литературы включает 232 источника, подавляющее большинство из которых опубликованы зарубежными авторами и имеют актуальные даты выхода. Работа изложена в традиционном стиле и содержит введение, обзор литературы, описание материалов и методов, отдельные главы результатов исследования и обсуждения полученных результатов, заключение, выводы, список цитируемой литературы и приложения. В целом она производит очень хорошее впечатление. Материал хорошо структурирован и последовательно изложен, при этом стоит отметить внушительный объем проведенных экспериментальных исследований, в ходе которых были получены интересные и актуальные данные.

В главе «Введение» описана научная проблема, обоснована актуальность проводимой работы, охарактеризована научная новизна, четко сформулирована цель и поставленные для ее достижения задачи.

«Обзор литературы» написан понятным, легко воспринимаемым языком, содержит красивые и информативные иллюстрации и включает 3 раздела и заключение. В первом разделе изложены общие сведения о новом коронавирусе SARS-CoV-2, его таксономическое положение, структура вириона и жизненный цикл. Также в первом разделе рассматриваются клинические проявления инфекции COVID-19, вызванной SARS-CoV-2, и характеристика текущей пандемии.

Во втором разделе RBD рассматривается как место уязвимости высокопатогенных для человека коронавирусов. В этом разделе описаны структура и свойства RBD MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 и особенности иммунного ответа на регион RBD при инфекциях, вызванных высокопатогенными коронавирусами.

Третий раздел литературного обзора освящает текущие разработки средств противодействия COVID-19 на основе рекомбинантных вариантов белка RBD, включая средства диагностики, вакцины и противовирусные препараты различной природы.

Таким образом, обзор литературы, а также его заключение, содержат подробную информацию по теме исследования и подчеркивают актуальность выполненной работы.

Глава «Материалы и методы» содержит перечень экспериментальных материалов, использовавшихся в работе, а также детальное описание методических подходов. В их число входят методы молекулярной биологии, иммунологии и вирусологии (получение генно-инженерных конструкций, электрофорез белков и нуклеиновых кислот, иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг, ELISpot, ICS, метод ингибирования цитопатического действия вируса *in vitro*); методы работы с животными и культурами клеток млекопитающих (трансфекция, клонирование и культивирование продуцентов); физико-химические методы анализа белков (хроматография, биослойная интерферометрия, круговой дихроизм, малоугловое рентгеновское рассеяние и масс-спектрометрия). Полученные

экспериментальные данные подвергались обработке с помощью приведенного перечня методов статистического анализа.

Результаты исследования и их обсуждение изложены в отдельных главах диссертации. Глава «Результаты исследования» включает краткое изложение результатов, сопровождаем графиками и рисунками. В главе «Обсуждение результатов» представлено детальное описание полученных данных, приведены обоснованные выводы результатов исследования. В целом, учитывая объем работы и количество полученных данных, разделение на отдельные главы результатов и их обсуждения выглядит логичным. Тем не менее, во время чтения работы иногда возникало желание сразу получить комментарии к полученным результатам, а не дожидаться следующей главы, держа в уме список накопившихся вопросов.

Замечания к диссертационной работе

1. В тексте диссертации достаточно часто встречаются пунктуационные ошибки, стилистические шероховатости, присутствуют опечатки, названия некоторых реактивов написаны неверно;
2. Часть иллюстраций выполнена несколько небрежно. В частности, на рисунке 7А выровненная аминокислотная последовательность RBD SARS-CoV-2 смещена вправо относительно остальных вариантов. При постановке вестерн-блоттинга, результаты которого изображены на рисунке 9Б, не помешало бы перенести на мембрану маркер молекулярных масс;
3. Не вполне понятно, использовались ли сыворотки интактных животных (или получавших инъекции PBS) в качестве отрицательного контроля при оценке Т-клеточного иммунного ответа на RBD, конъюгированного с ПГС+дсРНК, методами ELISpot и ICS.

Перечисленные недостатки, тем не менее, не являются принципиальными и никак не влияют на общее положительное впечатление от работы.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Содержание автореферата полностью соответствует содержанию и основным положениям диссертации, текст структурирован, результаты исследований хорошо проиллюстрированы.

Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертационной работы опубликованы в отечественных и зарубежных научных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки и высшего образования РФ, среди них: 5 статей, в ведущих рецензируемых научных журналах, 9 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях, а также Патент РФ.

Заключение

Диссертационная работа Меркульевой Юлии Александровны «Свойства рекомбинантного рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2, полученного в клетках CHO-K1» является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, содержит результаты исключительно детальной характеристики рекомбинантного варианта RBD, а также новые данные об особенностях иммунного ответа на RBD на различных животных моделях. По своей актуальности, объему выполненных работ и научной значимости данная работа отвечает всем требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Таким образом, диссертация полностью соответствует требованиям пп. 9 – 14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 (с изменениями в ред. Постановления Правительства Российской Федерации №426 от 20.03.2021), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени

кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Отзыв заслушан и одобрен на объединенном семинаре лаборатории инженерии антител и лаборатории иммуногенетики Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук 18.01.23 г. (протокол № 1).

Отзыв составил:

Старший научный сотрудник отдела

молекулярной иммунологии,

кандидат биологических наук  Сергей Владимирович Гусельников

«27» января 2023 г.

Подпись заверена

Директор ИМКБ СО РАН,

доктор биологических наук



 С.А. Демаков

Сведения об организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт молекулярной и клеточной биологии» Сибирского отделения Российской академии наук (ИМКБ СО РАН)

Почтовый адрес: Российская Федерация, г. Новосибирск,

630090, пр. Ак. Лаврентьева, 8/2

Тел.: +7 (383) 363-90-42

E-mail: info@mcb.nsc.ru