

УТВЕРЖДАЮ

И.о. директора ФИЦ КНЦ СО РАН

С.Н. Варнаков

«31» октября 2025 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения
Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр
Сибирского отделения Российской академии наук»

Диссертация «Генетически модифицированные целентеразин-зависимые люциферазы в иммуноанализе вируса клещевого энцефалита» выполнена в лаборатории биолюминесцентных и экологических технологий Института биофизики Сибирского отделения Российской академии наук» обособленное подразделение ФИЦ КНЦ СО РАН (ИБФ СО РАН).

В период подготовки диссертации соискатель Кудрявцев Александр Николаевич обучался в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биофизики Сибирское отделение Российской академии наук и работал в должности инженера в лаборатории фотобиологии, с 2018 г. в должности младшего научного сотрудника лаборатории биолюминесцентных и экологических технологий ИБФ СО РАН.

В 2014 году Кудрявцев А.Н. окончил аспирантуру в ИБФ СО РАН по научной специальности 03.01.06. – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), В 2025 году Кудрявцев А.Н. был прикреплен к ФИЦ КНЦ СО РАН для сдачи кандидатских экзаменов по научной специальности 1.5.6. Биотехнология, отрасль наук – биологические науки. Справка о сдаче кандидатских экзаменов выдана ФИЦ КНЦ СО РАН в 2025 году.

Научный руководитель – Франк Людмила Алексеевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории биолюминесцентных и экологических технологий ИБФ СО РАН, профессор Базовой кафедры биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский федеральный университет» (СФУ).

На заседании присутствовали: Бондарь В. С. доктор биологических наук; Франк Л.А. доктор биологических наук; Кратасюк В.А. доктор биологических наук; Немцева Е.В. кандидат физико-математических наук; Есимбекова Е.Н. кандидат биологических наук; Маркова С.В. кандидат биологических наук; Петушков В.Н. кандидат биологических наук; Родионова Н.С. кандидат биологических наук; Пуртов К.В. кандидат биологических наук; Ронжин Н.О. кандидат биологических наук; Маликова Н.П. кандидат биологических наук; Еремеева Е.В. кандидат биологических наук; Буракова Л.П. кандидат биологических наук; Сушко Е.С. кандидат биологических наук; Жила Н. О. кандидат биологических наук; Муруева А.В. кандидат биологических наук; Калябина В.С.; Гульнов Д.В.; Панамарев Н.С.; Жукова Г.В.; Колесник О.В.; Коротов И.А.; Вяткина М.О.; Сапожникова К.Ю.

Были заданы следующие вопросы:

1. Чувствительность 100% – что это значит?
2. Сколько активности восстанавливает комплекс из гибридов с фрагментами NanoLuc по сравнению с полноразмерной люциферазой?
3. Специфичность 99% и 17 ложноположительных результатов анализа на ВКЭ в клещах, о чём это свидетельствует?
4. Ложноположительные результаты по сравнению с колориметрическим методом, а с ОТ-ПЦР не сравнивали?
5. Формулировки задач нужно доработать. На слайде №7 непонятно что обозначает sc14D5a. На электрофореze у вас чистота белка 80%?
6. Что обозначают C+ и C-? Почему контроли обозначены на английском?
7. Kcat это у вас константа спада? Как она считается?
8. Почему размерность Vmax в с⁻¹? Размерности у вас не совпадают, не согласуются.
9. Vmax у вас различается на порядки, а относительная биолюминесцентная активность только в разы, почему?
10. Надо проверить все значения в таблице на слайде 8 и размерности констант там-же.
11. Есть ли разбросы для значений констант?
12. Почему не все разбросы видны на графиках?
13. Вводится ли иммуноглобулины вакцинированным пациентам?
14. Сколько по времени занимает колориметрический и ваши анализы?
15. Чувствительность колориметрического 250 пг, однофазного 300 пг достаточна ли она для выявления ВКЭ?

На все вопросы соискатель дал исчерпывающие ответы.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность исследования.

Создание новых высокочувствительных и специфичных аналитических систем для биомедицинских приложений является одной из актуальных научных задач. Наряду с изучением фундаментальных основ биолюминесценции морских организмов, которые проводятся в Институте биофизики СО РАН на протяжении почти 50 лет, активно разрабатываются способы применения биолюминесценции в молекулярной аналитике: ферментативные реакции, лежащие в основе этого явления, обладают высоким квантовым выходом и способны обеспечить высокую чувствительность анализа. Ключевым ферментом большинства известных на сегодня биолюминесцентных систем морских животных являются целентеразин-зависимые люциферазы – сравнительно небольшие (16-35 кДа), как правило, одноцепочечные белки, катализирующие окисление субстрата – целентеразина (или его близких природных аналогов) молекулярным кислородом. К настоящему времени стали доступны рекомбинантные аналоги многих из этих люцифераз, получены их генетические аналоги с улучшенными свойствами и показана перспективность применения этих ферментов как высокочувствительных репортеров в различных аналитических системах, в том числе иммуноанализе.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) вызывает тяжелейшее нейрозаболевание, поражающее центральную нервную систему и отличающегося полиморфизмом клинического течения. Он переносится иксодовыми клещами, ареал распространения которых вся лесная и лесостепная зона умеренного пояса Евразийского континента, в том числе Сибирский регион Российской Федерации, Китай и Монголия. Современная эпидемиологическая ситуация в отношении КЭ характеризуется значительным ростом заболеваемости как в России, так и в мире.

Поскольку высокоэффективные этиотропные препараты для лечения до сих пор не созданы, единственной стратегией снижения заболеваемости КЭ является массовая вакцинопрофилактика населения эндемичных регионов. Несмотря на то, что разработаны эффективные и доступные вакцины для взрослых и детей, уровень вакцинации в европейских странах (около 25%) и России (менее 10%) остаётся недостаточным. Экстренная профилактика, применяемая в России для невакцинированных укушенных пациентов, включает введение препарата иммуноглобулина человека против клещевого энцефалита, полученного из сыворотки донорской крови. Однако она сопряжена с определёнными биологическими рисками. Вместе с тем показано, что в среднем носителями вируса клещевого энцефалита являются лишь 5-10 % клещей. В связи с этим возникает необходимость раннего выявления вируса в клещах, что могло бы существенно снизить вероятность возможных осложнений, связанных с необоснованной иммунопрофилактикой, и стать основой для своевременного терапевтического вмешательства.

В настоящее время для детекции ВКЭ в клещах используются коммерческие аналитические системы на основе колориметрического иммуноанализа или ОТ-ПЦР, производителями которых в России являются такие биотехнологические компании как «Вектор-Бест» и «Микроген». Анализ клещей проводится квалифицированным персоналом в лабораториях, снабжённых специализированным оборудованием. Доставка и анализ клещей из отдалённых районов занимает значительное время. Таким образом, задача разработки подходов, обеспечивающих быстрое и достоверное выявление ВКЭ, пригодных для применения, в том числе во внелабораторных условиях, является актуальной.

Цель работы – создание систем биолюминесцентного иммунологического микроанализа вируса клещевого энцефалита в клещах, с использованием преимуществ репортеров на основе ряда генетически модифицированных целентеразин-зависимых люцифераз.

Научная новизна.

Получены и исследованы свойства ряда новых бифункциональных гибридных белков. Установлена перспективность их использования для быстрого выявления ВКЭ биолюминесцентным твердофазным иммуноанализом. На эффекте комплементации фрагментов люциферазы NLuc при сборке специфичного иммунокомплекса разработан принцип биолюминесцентного однофазного иммуноанализа ВКЭ конкурентного типа. Этот принцип может быть использован при разработке аналитических систем, направленных на выявление других молекулярных мишеней.

Практическая значимость.

Разработаны эффективные способы получения новых бифункциональных гибридных белков, включающих биоспецифические домены и домены целентеразин-зависимых люцифераз или их фрагментов. Получены препараты гибридных белков высокой степени чистоты и изучены их свойства – кинетические параметры биолюминесцентной реакции люциферазных доменов, аффинные свойства доменов анти-ВКЭ миниантитела и его антигенной детерминанты - рекомбинантного белка prED3.

Разработан способ твердофазного иммуноанализа ВКЭ в клещах на основе гибридного белка sc14D5a-Rm7 и проведены успешные многолетние испытания при тестировании природных клещей.

Продemonстрирован эффект комплементации фрагментов искусственной люциферазы NLuc с восстановлением субстрат-зависимой биолюминесцентной реакции при сборке

иммунокомплекса биоспецифичных доменов гибридных белков – анти-ВКЭ миниантитела и белка ргED3. На основе выявленного эффекта разработан дизайн биолуминесцентного однофазного конкурентного иммуноанализа по выявлению ВКЭ.

Получен готовый к использованию реагент, включающий контрольные и рабочие смеси гибридных белков и субстрат люциферазы. Проведено тестирование разработанного реагента на модельных образцах и природных клещах и показана его применимость для достоверного выявления ВКЭ.

Все результаты получены впервые и могут быть использованы для создания отечественных высокоэффективных и чувствительных биолуминесцентных диагностикумов для выявления ВКЭ в клещах как в санитарно-эпидемиологических лабораториях, так и в полевых условиях. Предложенный подход однофазного анализа на основе комплементации фрагментов люциферазы NLuc может быть использован для детекции других мишеней заменой биоспецифических доменов гибридных белков-репортеров.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработаны способы получения высокоочищенных препаратов генетически-модифицированных целентеразин-зависимых люцифераз, генетически слитых с иммуноглобулинами или антигенами, изучены свойства этих гибридных белков как репортеров для иммуноанализа ВКЭ.

2. Биолуминесцентный твердофазный иммуноанализ ВКЭ в клещах на основе гибридного белка генетически-модифицированной люциферазы Rm7 и миниантитела sc14D5a позволяет выявлять вирус с диагностической чувствительностью 100% и специфичностью 98,9%.

3. Однофазный конкурентный биолуминесцентный иммуноанализ ВКЭ на основе комплементации фрагментов искусственной люциферазы NLuc позволяет достоверно выявлять вирус в инфицированных природных клещах ($p=0,000013$, $N=86$).

4. Разработан и успешно испытан готовый к использованию лиофилизированный реагент, включающий все компоненты для однофазного биолуминесцентного иммуноанализа ВКЭ в клещах.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования – от постановки задач, проведения экспериментов и анализа полученных результатов до подготовки публикаций.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждена достаточным объёмом данных, а также выполнением работы с использованием современных методов исследования и статистического анализа.

Основные положения и научные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на следующих научных конференциях: 19-ом Международном симпозиуме по биолуминесценции и хемилюминесценции (Цукуба, Япония, 2016), Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2018), Всероссийской мультikonференции с международным участием «Биотехнология – медицине будущего» (Новосибирск, 2019); 9-ом съезде Российского фотобиологического общества (п. Шепси, 2021), Всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск, 2022); 13-ой международной научной конференции «Биокатализ: фундаментальные исследования и применения» (Суздаль, 2023); на семинарах лаборатории

фотобиологии и лаборатории биоломинесцентных и экологических технологий Института биофизики СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. Результаты исследований Кудрявцева Александра Николаевича опубликованы в 15 работах, в том числе: 7 статей в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных изданий и журналов, рекомендованных ВАК; 8 публикаций в сборниках докладов научных конференций; 4 патента РФ.

Публикации в международных базах данных и системы цитирования Web of Science и Scopus:

1. L.P. Burakova, **A.N. Kudryavtsev**, G.A. Stepanyuk, I.K. Baykov, V.V. Morozova, N.V. Tikunova, M.A. Dubova, V.N. Lyapustin, V.V. Yakimenko, L.A. Frank Bioluminescent detection probe for tick-borne encephalitis virus immunoassay. Anal. Bioanal. Chem., 2015 407:5417–5423 DOI: 10.1007/s00216-015-8710-6 (Scopus, WoS, Белый список K1, IF 3.8. Q1)
2. **A.N. Kudryavtsev**, L. P. Burakova and L. A. Frank Bioluminescent detection of tick-borne encephalitis virus in native ticks. Anal. Methods, 2017, 9, 2252 DOI: 10.1039/C7AY00535K (Scopus, WoS, Белый список K1, IF 2.6. Q2)
3. L.A. Frank, E.E. Bashmakova, V.V. Krasitskaya, **A.N. Kudryavtsev**. Genetically modified coelenterazine-dependent luciferases as reporters for in vitro assay. Журн. Сиб. федер. ун-та. Серия: Биология, 2017, Т. 10(2), С. 199–210. DOI:10.17516/1997-1389-0023 (Scopus, Белый список K1, ВАК, IF 0,5. Q4)
4. **А.Н. Кудрявцев**, Л.П. Буракова, К.А. Баринова, Л.А. Франк. Тест-система для выявления вируса клещевого энцефалита биоломинесцентным иммуноанализом. Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(3). С. 310–321. (Scopus, Белый список K1, ВАК, IF 0,5. Q4)
5. Е.Е. Башмакова, **А.Н. Кудрявцев**, Л.А. Франк Разработка способа получения функционально активного рекомбинантного стрептавидина в клетках Escherichia coli. Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2020. 13(2). С. 218–229. (Scopus, Белый список K1, ВАК, IF 0,5. Q4)
6. **Kudryavtsev A.N.**, Krasitskaya V.V., Efremov M.K., Zangeeva S.V., Rogova A.V., Tomilin F.N., Frank L.A. Ca²⁺-triggered coelenterazine-binding protein Renilla: expected and unexpected features. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 2144. DOI: 10.3390/ijms24032144 (Scopus, WoS, Белый список K1, IF 4,9. Q1)
7. **A.N. Kudryavtsev**, E.E. Denisova, V.V. Krasitskaya, I.K. Baykov, N.V. Tikunova, L.A. Frank. Designing the homogeneous competitive bioluminescence-based assay for tick-borne encephalitis virus (TBEV) point-of-care detection. Anal. Bioanal. Chem., 2025, DOI: 10.1007/s00216-025-06090-w. (Scopus, WoS, Белый список K1, IF 3.8. Q2)

Прочие публикации:

1. Frank L.A., Bashmakova E.E., **Kudryavtsev A.N.**, Krasitskaya V.V. Bioluminescent genetically fused proteins as effective and versatile labels for bioassay // 19th International symposium on bioluminescence & chemiluminescence (Tsukuba, Japan) 2016, С. A1-7
2. Kudryavtsev A.N., Burakova L.P., Tikunova N.V., Frank L.A. Bioluminescent immunoassay for encephalitis virus in native ticks bioassay // 19th International symposium on bioluminescence & chemiluminescence (Tsukuba, Japan) 2016, С. PA-26
3. Франк Л.А., Красицкая В.В., Башмакова Е.Е., **Кудрявцев А.Н.** Высокочувствительные биоломинесцентные репортеры для микроанализа на основе целентеразин-зависимых люцифераз // международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва) 2018, С. 96-97
4. Красицкая В.В., Башмакова Е.Е., **Кудрявцев А.Н.**, Франк Л.А. Целентеразин-зависимые люциферазы как аналитический инструмент для фундаментальных и прикладных

- исследований // Материалы всероссийской мультиконференции с международным участием. «Биотехнология - медицине будущего» (Новосибирск) 2019, С. 181
5. **Кудрявцев А.Н.**, Франк Л.А Биоллюминесцентный микроанализ ВКЭ в природных клещах // 9-й съезд Российского фотобиологического общества (п. Шепси) 2021, с 130
 6. **Кудрявцев А.Н.**, Башмакова Е., Франк Л.А Выявление ВКЭ биоллюминесцентным гетеро- и гомофазным иммуноанализом // Всероссийская конференция «Синтетическая биология и биофармацевтика» (Новосибирск) 2022, С. 30
 7. **Кудрявцев А.Н.**, Башмакова Е.Е., Франк Л.А Одностадийное определение вируса клещевого энцефалита биоллюминесцентным иммуноанализом // 13-я международная научная конференция «Биокатализ: фундаментальные исследования и применения» (Суздаль) 2023, С. 188
 8. Франк Л.А., Красицкая В.В., Башмакова Е.Е., **Кудрявцев А.Н.**, Панамарев Н.С. Целентерази-зависимые люциферазы: свойства и применение в микроанализе // 13-я международная научная конференция «Биокатализ: фундаментальные исследования и применения» (Суздаль) 2023, С. 148

Патенты РФ на изобретение:

1. Л.А. Франк, Н.В. Тикунова, Л.П. Буракова, И.К. Байков, А.Н. Кудрявцев, Морозова В.В. Рекомбинантная плазмидная ДНК pFLAG-sc14D5a-Rm7, обеспечивающая синтез гибридного белка sc14D5a-Rm7, штамм бактерий *Escherichia coli* - продуцент гибридного белка sc14D5a-Rm7 и гибридный белок sc14D5a-Rm7, связывающий белок Е вируса клещевого энцефалита и обладающий биоллюминесцентной активностью. Патент РФ № 2 565 545 С1 Опубликовано: 20.10.2015 Бюл. № 29
2. Е.Е. Башмакова, **А.Н. Кудрявцев**, Л. А. Франк. Рекомбинантная плазмидная ДНК pET19b-SAV, обеспечивающая синтез полноразмерного белка стрептавидина *Streptomyces avidinii*, штамм бактерий *Escherichia coli* -продуцент растворимого полноразмерного белка стрептавидина *Streptomyces avidinii*. Патент РФ №2728652. Опубликовано 30.07.2020. Бюл. № 22
3. Е.Е. Башмакова, **А.Н. Кудрявцев**, Л. А. Франк. Рекомбинантные плазмидные днк pFLAG-sc14d5a-NLuc-r1 и pFLAG-NLuc-r2-sc14d5a, обеспечивающие синтез гибридных белков sc14d5a-NLuc-r1 и NLuc-r2-sc14d5a, и гибридные белки sc14d5a-NLuc-r1 и NLuc-r2-sc14d5a, связывающие белок Е вируса клещевого энцефалита с комплементацией фрагментов NLuc-r1 и NLuc-r2 и появлением биоллюминесцентной активности. Патент РФ № 2784817. Опубликовано 29.11.2022. Бюл. № 34
4. **А.Н. Кудрявцев**, Е.Е. Денисова, И.К. Байков, Н.В. Тикунова, Л.А. Франк. Рекомбинантные плазмидные ДНК pFLAG-sc14D5a-NLuc-r2 и pFLAG-rED3-NLuc-r1, обеспечивающие синтез гибридных белков sc14D5a-NLuc-r2 и rED3-NLuc-r1, и гибридные белки sc14D5a-NLuc-r2 и rED3-NLuc-r1, образующие специфические комплексы антиген-антитело с комплементацией фрагментов NLuc-r1 и NLuc-r2 и появлением биоллюминесцентной активности, способ выявления белка Е вируса клещевого энцефалита на их основе. Патент РФ № 2844 579. Опубликовано 04.08.2025. Бюл. № 22

Соответствие диссертации паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология:
Диссертационная работа Кудрявцева Александра Николаевича соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология по п. 7. Прикладная энзимология, включая ферментные

системы, технологии очистки белков, прикладные аспекты белковой инженерии; п. 22. Биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные (включая нанобиосенсорные) технологии. Создание биоаналитических систем для медицинской диагностики и медицинского анализа. Диагностические средства (биочипы, биосенсоры), биосовместимых материалов с применением клеточных, геномных и постгеномных технологий; создание банков биологических образцов.

Заключение: Диссертация Кудрявцева Александра Николаевича «Генетически модифицированные целентеразин-зависимые люциферазы в иммуноанализе вируса клещевого энцефалита» рекомендуется к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Заключение принято 23.10.2025 на заседании биолюминесцентного семинара № 50 ИБФ СО РАН.

Присутствовало на заседании 24 чел., из них с правом решающего голоса – 14 чел. Результаты голосования: «за» – 24 чел., «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел.



Председатель биолюминесцентного семинара
Высоцкий Евгений Степанович,
кандидат биологических наук,
в.н.с. лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН



Секретарь биолюминесцентного семинара
Родионова Наталья Сергеевна,
кандидат биологических наук,
с.н.с. лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН