



МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
имени
М.В.ЛОМОНОСОВА
(МГУ)

Ленинские горы, Москва,
ГСП-1, 119991
Телефон: 8-495-939-10-00
Факс: 8-495-939-01-26

14.01.2026 № 07-26/013-03

На №

«Утверждаю»

Проректор Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования
«Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»



Отзыв

ведущей организации ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» на диссертационную работу **Кудрявцева Александра Николаевича** на тему «Генетически модифицированные целентеразин-зависимые люциферазы в иммуноанализе вируса клещевого энцефалита», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.6. Биотехнология

Актуальность темы

Создание и внедрение в практику новых высокочувствительных и специфичных аналитических систем для решения различных проблем в современной биотехнологии, биомедицине, эпидемиологии и экологии является одной из важнейших задач современной фундаментальной и прикладной науки. Институт биофизики СО РАН в течение многих лет занимает лидирующее положение в области изучения морской биолюминесценции и разработки методов ее применения в биоаналитике, поскольку: ферментативные реакции, лежащие в основе данных биолюминесцентных процессов, имеют высокий квантовый выход, что

обеспечивает высокую чувствительность анализа. В связи с этим разработка новых методов биолюминесцентного анализа на основе морской биолюминесценции, несомненно, является актуальной.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) поражает центральную нервную систему человека, что может приводить к глубокой инвалидности или даже к смерти пациента. ВКЭ переносится иксодовыми клещами, которые распространены в лесной и лесостепной зоне Евразийского континента, включая Сибирь России, Китай и Монголию. В последнее время наблюдается значительный рост заболеваемости клещевым энцефалитом (КЭ) как в России, так и в мире. При отсутствии высокоеффективных препаратов для лечения КЭ вакцинация населения эндемичных регионов является наиболее надежным способом защиты от этой инфекции, но ее уровень в России (менее 10%) остается недостаточным. В то же время вакцинация сопряжена с определенными биологическими рисками и часто не рекомендуется. В среднем носителями ВКЭ являются лишь 5-10 % клещей, поэтому актуальным является раннее выявление вируса у клещей, что могло бы существенно снизить вероятность возможных осложнений, связанных с необоснованной вакцинацией. Несмотря на наличие коммерческих аналитических систем для выявления ВКЭ колориметрическим иммуноанализом или на основе ПЦР, разработка методов быстрого, высокочувствительного и достоверного анализа для рутинного применения, в том числе во внелабораторных условиях, остается исключительно актуальной.

Научная новизна и практическая значимость работы

В ходе выполнения данной работы диссидентом впервые получены высокоочищенные гибридные бифункциональные белки, включающие биоспецифические домены (иммуноглобулины или антигены к ВКЭ), генетически слитые с биолюминесцентными репортерами (домены целентеразин-зависимых люцифераз или их фрагменты), изучены их свойства и потенциал их применения в иммуноанализе ВКЭ.

В работе разработан протокол твердофазного иммуноанализа ВКЭ в клещах на основе гибридного белка люциферазы *Renilla* и миниантитела

sc14D5a, который позволяет выявлять вирус ВКЭ с чувствительностью 96,4% и специфичностью 98,9%. Биолюминесцентный метод превосходит значительно по чувствительности стандартный колориметрический иммуноферментный метод определения ВКЭ. Проведены успешные испытания разработанного метода для тестирования природных клещей.

Разработан однофазный конкурентный биолюминесцентный иммуноанализ ВКЭ на основе явления комплементации фрагментов люциферазы NLuc, который позволяет достоверно выявлять вирус в инфицированных природных клещах. Получен готовый к использованию реагент, включающий контрольные и рабочие смеси гибридных белков и субстрат люциферазы NLuc. Проведено тестирование реагента на модельных образцах и природных клещах, и показана его применимость для достоверного выявления ВКЭ.

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

Степень достоверности результатов

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

Содержание диссертации

Диссертация имеет классическую структуру и состоит из следующих основных разделов: Введение; Глава 1 (Генетически модифицированные целентеразин-зависимые люциферазы как репортеры в иммуноанализе. Обзор литературы); Глава 2 (Материалы и методы исследования); Глава 3 (Результаты и обсуждение); Заключение; Выводы; Список сокращений; Список цитируемой литературы.

В **Главе 1** диссертант приводит обширный и очень интересный обзор научной литературы, в котором детально рассмотрены генетически модифицированные целентеразин-зависимые люциферазы как репортеры в иммуноанализе. Обращается внимание на то, что эти ферменты наиболее распространены в морских организмах, обладают высокой биолюминесцентной активностью, многие из них давно детально изучены, в том числе и в лаборатории Института биофизики СО РАН. Рекомбинантные формы таких люцифераз как *Renilla*, *Metridia* и *Gaussia* нашли широкое применение как репортеры в анализе *in vitro*.

Особое внимание автор обращает на люциферазу NanoLuc, искусственную люциферазу, разработанную несколько лет назад сотрудниками фирмы Promega Co., которая представляет собой генетически стабилизированную форму фермента глубоководной креветки *Ophophorus gracilirostris* и имеет мол. массу 19 кД. Удельная активность его свечения почти в 81 000 раз больше, чем у исходного фермента. Его субстрат – фуримазин представляет собой новый вариант целентеразина, который повышает уровень биолюминесценции почти в 25 раз по сравнению с исходным целентеразином и обеспечивает долговременный сигнал биолюминесценции при 460 нм. Коммерческая доступность NanoLuc, ее расщепленных (сплит) вариантов, способных при принудительном сближении к восстановлению биолюминесценции, а также фуримазина, способствовали широкому применению NanoLuc в качестве универсального и гибкого аналитического инструмента. Особенно интересным является описанный в обзоре однофазный биолюминесцентный молекулярный анализ на основе гибридных производных комплементирующих фрагментов NanoLuc. Важной, как отмечает автор обзора, является возможность создания на основе эффекта комплементации расщепленной NanoLuc аналитических систем, пригодных для применения не только в лабораторных условиях, но и по месту требования.

Автор обзора подчеркивает, что анализ литературных данных по использованию целентеразин-зависимых люцифераз в качестве биолюминесцентных репортеров наглядно показывает, что они являются мощным аналитическим инструментом, способным решать широкий спектр

исследовательских и прикладных задач. В обзоре перечислен лишь ряд основных принципов аналитических методов и исследований, которые могут быть проведены на их основе. Ряд подходов стали общепринятыми и широко используются, в то время как другие имеют большие перспективы для развития высокочувствительной и специфичной аналитики, необходимой в ответ на вызовы современной биомедицины, биотехнологии, аграрного сектора экономики, экологии.

В финальном предложении **Главы 1** автор обзора отмечает, что огромное количество разнообразных ферментов и их субстратов, в том числе искусственно созданных и коммерчески доступных, обладающих различными полезными свойствами, предоставляет экспериментатору реальную возможность выбора наиболее подходящего для его нужд варианта.

Глава 2 содержит описание материалов, оборудования и методов работы диссертанта и занимает более 15 страниц текста. Поражает объем выполненных экспериментов, которые описаны детально и по сути дела являются ценной инструкцией для работы по получению и характеризации различных биопрепараторов. Автор провел выбор бактериального штамма и оптимизировал условия получения препартивных количеств нескольких гибридных белков, включающих специфические фрагменты (антитела, антигены) и биолюминесцентные репортеры (люциферазу *Renilla*, либо *NLuc*, либо фрагменты *NLuc*) с различным расположением специфических и репортерных фрагментов в структуре гибридов; охарактеризовал кинетические свойства, биолюминесцентную активность наработанных гибридных белков, аффинность входящих в их структуру специфических фрагментов и выбрал те, которые наиболее пригодны для биоаналитической детекции ВКЭ. Следует отметить тщательность и высокое экспериментальное мастерство автора, благодаря которым были получены новые системы для гетерогенного либо гомогенного выявления ВКЭ.

В **Главе 3** представлены результаты работы и их обсуждение. Материалы разделены на два раздела. В **разделе 3.1** описаны получение и свойства новых гибридных белков – биоспецифических репортеров для биолюминесцентного иммуноанализа ВКЭ. В качестве биоспецифической

части в составе гибридных белков использовали одноцепочечное миниантитело sc14D5a, которое с высокой аффинностью связывает капсидный гликопротеин Е вируса ВКЭ, а в ряде гибридных белков - белок prED3 – домен D3 капсидного белка Е вируса ВКЭ, антигенную детерминанту миниантитела sc14D5a. В качестве сигнальной части гибридов использовали люциферазу Rm7, термостабильный вариант люциферазы мягкого коралла *Renilla muelleri*, либо искусственную люциферазу NanoLuc, либо ее фрагменты. Сигнальную и специфическую части гибридных белков соединяли гибким линкером. Для синтеза гибридных белков были выбраны рекомбинантные клетки *E. coli* Rosetta-gami2, в которых эффективно образуются дисульфидные связи. Все белки содержали полигистидиновый фрагмент Н6, благодаря чему их очистку проводили металл-аффинной хроматографией. Всего было получено 9 высокоочищенных гибридов. Для всех гибридов были определены каталитическая активность домена люциферазы, и было изучено связывание домена антитела с мишенью.

В результате изучения различных вариантов гибридов с различной последовательностью белковых доменов и пептида His6 была установлена оптимальная последовательность доменов в гибриде sc14D5a-Rm7, которая обеспечивала высокую каталитическую активность домена люциферазы в составе гибрида и высокое значение константы аффинности, которое оказалось сравнимым с таковым для исходного рекомбинантного антитела мыши.

Далее были получены и исследованы гибридные белки, содержащие домен миниантитела 14D5a (Ab) к ВКЭ и фрагменты NanoLuc: большой (NLucL) или малый (NLucS) – в разной последовательности доменов Ab и фрагментов NLuc. У гибридного белка NLucS-Ab биолюминесцентная активность, как и ожидалось, полностью отсутствовала, а гибиды, включающие большой N-концевой фрагмент (NLucL), обладали слабой фуримазин-индуцируемой биолюминесценцией (0,005% от таковой для полноразмерной NanoLuc). Тем не менее этого оказалось достаточным для использования данного гибридного белка в дальнейшей работе. Методом твердофазного конкурентного анализа была показана способность домена антитела в этой группе гибридных белков связывать белок-мишень (белок

prED3 – антигенную детерминанту капсидного белка Е вириуса ВКЭ). Исследование сборки на антиген-активированной твердой фазе фрагментов люциферазы NLuc показало, что наиболее высокий биолюминесцентный сигнал возникает при сборке пары Ab-NLucL + NLucS-Ab. Эту пару использовали далее при проведении гомогенного анализа модельной мишени.

Исследование биолюминесценции эквимолярных бинарных смесей гибридных белков, включающих разные комбинации доменов 14D5a, prED3, NLucS, NLucL, показало, что наибольшее восстановление фуримазин-зависимой биолюминесцентной активности фрагментов люциферазы, сближенных благодаря образованию комплекса антиген-антитело, наблюдается в случае пары Ab-NLucS+Ag-NLucL, что свидетельствует о наиболее оптимальном сближении и взаимной ориентации фрагментов люциферазы. Для этой пары отношение k_{cat}/K_m было почти на 2 порядка меньше, чем для полноразмерной люциферазы. Это указывает на не очень высокую эффективность процесса комплементации фрагментов люциферазы при образовании комплекса антиген-антитело, входящих в состав гибридных белков. Невысокий процент восстановления биолюминесцентной активности автор диссертации объясняет возможными стерическими препятствиями, которые возникают при образовании комплекса, а также неправильной взаимной ориентацией фрагментов люциферазы. Возможно варьирование состава гибридных молекул – удаление полигистидиновых фрагментов, изменение структуры полипептидных линкеров и др. могло бы увеличить интенсивность биолюминесценции, однако эти исследования не входили в задачи данной работы.

В **разделе 3.2** описаны разработанные в диссертации методы биолюминесцентного иммуноанализа ВКЭ и ВКЭ-ассоциированных мишеней с использованием описанных в **разделе 3.1** гибридных белков. Гибридный белок 14D5a-Rm7 был успешно использован в **твердофазном биолюминесцентном иммуноанализе ВКЭ**. Сравнение данного метода со стандартным колориметрическим методом на основе пероксидазы хрена показало, что предел обнаружения ВКЭ биолюминесцентным методом в 4,5 раза ниже предела обнаружения колориметрического метода. При этом

новый метод гораздо проще, дешевле и быстрее – сигнал от образца интегрируется всего 5 секунд. Высокопроизводительный планшетный формат позволяет одновременно анализировать от 8 (отдельный стрип) до 96 (стандартный иммунологический микропланшет) образцов. Хотя результаты биолюминесцентного и ПЦР-анализа совпадали, как показал автор, но предложенный способ существенно проще, поскольку не требует специального оборудования, ферментов и высокой квалификации персонала.

Всего в период 2016-2020 гг биолюминесцентным методом было исследовано более 1500 образцов экстрактов клещей, из которых положительными оказались 28, т.е. около 2%. Полученное по результатам 2017-2023 сезонов значение диагностической чувствительности биолюминесцентного способа выявления ВКЭ составило 100%. Специфичность анализа составила 98,9 %, т.е. ложноположительными оказались 10 образцов.

В диссертации разработан оригинальный метод **гомогенного иммуноанализа ВКЭ конкурентного типа на основе** образования высокоаффинного комплекса антиген-антитело – в данном случае белков sc14D5a и prED3 в составе гибридных молекул с фрагментами люциферазы NLuc. Образование иммунного комплекса обеспечивает сближение и комплементацию фрагментов люциферазы с восстановлением её биолюминесцентной активности. Вводимая в среду вирус-ассоциированная мишень - компетитор (вакцина Клещ-Е-Век, содержащая инактивированный вирус штамма ВКЭ) конкурирует за связывание с миниантителом, что приводит к разрушению комплекса и падению биолюминесцентного сигнала, величина которого соответствует увеличению концентрации компетитора. Предел обнаружения ВКЭ составил 0,3 нг, что является клинически значимым. При тестировании образцов природных клещей в качестве дискриминационного фактора использовали отношение L/L_0 , где L_0 – биолюминесцентный сигнал от независимого негативного контроля, L – сигнал от образца. Разработанный вариант анализа позволил достоверно определить группу «здоровых» (79 образцов) и ВКЭ-инфицированных клещей (7 образцов). Результаты тестирования полностью совпали с результатами колориметрического иммуноанализа компании Вектор-Бест.

Для практического использования разработанного гомогенного анализа ВКЭ в условиях удаления от биомедицинских лабораторий предложен и апробирован лиофилизированный реагент «все в одном». Реагент включает субстрат, гибридные белки и стабилизирующие добавки. В работе оптимизированы состав, методика приготовления, лиофилизации и хранения реагента. С использованием данного реагента проведение анализа существенно упрощается: необходимо просто добавить исследуемый экстракт клеща в лунки планшета.

При соответствующей замене биоспецифических доменов в гибридных белках новый принцип выявления вирусов, предложенный в данной диссертационной работе, может быть использован для быстрого тестирования других мишеней (например, вирусных и бактериальных инфекций) при диагностировании социально-значимых заболеваний.

В целом текст диссертации написан грамотным профессиональным языком и хорошо иллюстрирован. Однако к тексту диссертации имеются **следующие замечания:**

- 1) В заключении Главы 1 не хватает вывода, которым обычно завершается литературный обзор диссертации: что именно из имеющихся литературных данных по тематике диссертации автор выбирает как основу его собственного научного исследования? Конечно, из последующих глав диссертации становится понятным, что в работе были использованы две ферментные системы (люцифераза *Renilla* и люцифераза *NLuc*), которые были использованы для создания двух новых биолюминесцентных систем для высокочувствительного и быстрого обнаружения ВКЭ.
- 2) В разделе 2.6 при описании методики определения кинетических параметров биолюминесцентной реакции гибридного белка 14D5a-Rm7 выбор соотношения концентраций реагентов (фермента и субстрата) описан не совсем понятно, поскольку объемы вносимых реагентов разные, для фермента указана конечная концентрация, а для субстрата, по-видимому, – вносимая концентрация. Целесообразнее было бы привести диапазон исследованных концентраций субстрата, а не диапазон избытков концентраций.

3) На стр.63 описано определение катализитической константы k_{cat} реакции окисления СTZ и СВР люциферазами Rm7 и 14D5a-Rm7, на стр. 71 – определение катализитической константы окисления СВР и FMZ люциферазой NanoLuc и смесью гибридов с ее фрагментами. Для этого концентрацию фермента определяли по концентрации белка, однако не приведены данные, все ли молекулы люцифераз, включая ферменты в гибридных белках, являются активными.

4) В диссертации практически не представлены кривые эмиссии сигнала биолюминесценции, кроме рис. 3.10 для люциферазы NLuc, но на нем не указаны концентрации фермента и субстрата. Поэтому на стр.71 непонятен термин «близкая кинетика сигнала», в подписи к рис. 3.2 непонятно, что такое начальная максимальная интенсивность сигнала. Также непонятно, зависит ли форма кривых от концентраций реагентов. Не объяснено, почему в качестве аналитического сигнала выбрано интегрирование биолюминесцентного сигнала (время 5 с и 10 с), а не, например, максимальная интенсивность сигнала.

В целом, несмотря на высказанные замечания, представленную диссертацию следует признать состоявшимся научным исследованием, выполненным на высоком научно-методическом уровне. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Основные результаты диссертации опубликованы в семи статьях в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных изданий и журналов и рекомендованных ВАК, и в восьми публикациях в сборниках докладов научных конференций. По результатам работы получено 4 патента РФ.

Заключение

Таким образом, диссертация Кудрявцева Александра Николаевича является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи по созданию систем биолюминесцентного иммуноанализа вируса клещевого энцефалита в клещах с использованием преимуществ

репортеров на основе ряда генетически модифицированных целентеразин-зависимых люцифераз, имеющей важное значение для соответствующей области знаний, и соответствует требованиям пунктов 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Правительством Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ему искомой степени.

Отзыв подготовила

д.х.н., гл.н.с. кафедры химической энзимологии
Химического факультета
МГУ имени М.В.Ломоносова



(Угарова Наталья Николаевна)

Отзыв заслушан итвержден на заседании кафедры химической энзимологии
Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, протокол заседания № 12
от «18» декабря 2025 г.

Заведующий кафедрой химической энзимологии
Химического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова
д.х.н., профессор



(Клячко Н.Л.)

Почтовый адрес 119991 Москва, ГСП-1, Ленинские горы, дом 1, строение 3,
кафедра химической энзимологии
Телефон 8-(495)939-3476
Электронная почта nlklyachko@gmail.com

Секретарь заседания
к.х.н.



(Белова А.Б.)

И.о. декана Химического факультета
МГУ имени М.В.Ломоносова,
д.х.н., профессор РАН



(Карлов С.С.)