

**ОТЗЫВ официального оппонента  
на диссертацию на соискание ученой степени  
доктора биологических наук Мардановой Евгении Сергеевны на тему:  
«Разработка систем экспрессии рекомбинантных белков в растениях на  
основе самореплицирующихся вирусных векторов и их применение для  
получения антигенов возбудителей инфекционных заболеваний»  
по специальности 1.5.3. – молекулярная биология**

**Актуальность темы исследования**

Использование растений в качестве «биофабрик» для получения вакцинных белков является конкурентоспособной альтернативой традиционным технологиям, основанным на использовании бактерий, дрожжей или клеток животных. Большим преимуществом растений как системы экспрессии является безопасность, так как в растительных тканях нет риска загрязнения рекомбинантного белка вирусами животных и прионами. Растительные клетки обеспечивают правильную модификацию рекомбинантного белка, характерную для эукариотических клеток. Обеспечивается также полная безопасность процесса производства. Большое значение имеет низкая стоимость биомассы и простота ее получения. Успешными примерами применения технологии «растительных» вакцин являются прошедшие клинические исследования рекомбинантные вакцины против гриппа и коронавируса, разработанные в Канаде. Прошедшая пандемия COVID-19 продемонстрировала необходимость в различных вакцинных платформах, в том числе для быстрого реагирования на вновь возникающие вирусные угрозы. С этой точки зрения платформа рекомбинантных «растительных» вакцин может быть востребована как для медицинских, так и ветеринарных применений. Однако, создание экономически выгодных технологий продукции белков в растениях требует решения ряда проблем, среди которых низкий выход рекомбинантного белка и обусловленная им высокая стоимость очистки. Таким образом, тема диссертации Е.С. Мардановой, посвященной разработке систем экспрессии рекомбинантных белков в растениях для получения антигенов возбудителей

инфекционных заболеваний, безусловно является актуальной, перспективной и востребованной.

### **Научная новизна, обоснованность и достоверность выносимых на защиту положений, научных выводов и рекомендаций исследования**

В работе были созданы новые самореплицирующиеся экспрессионные векторы на основе генома X вируса картофеля, предназначенные для осуществления транзientной экспрессии рекомбинантных белков в *Nicotiana benthamiana*. Для повышения уровня экспрессии были проведены оптимизация трансляции мРНК и подавление посттранскрипционного сайленсинга генов. С использованием разработанных векторов были получены новые рекомбинантные «растительные» кандидатные вакцины против вирусов гриппа А на основе консервативного М2е пептида. Изначально были получены вирусоподобные частицы на основе способных к самосборке белков НВс вируса гепатита В слитых с фрагментами М2е, экспонированными на поверхности частиц. В силу низкой иммуногенности первоначальный вариант вакцины был модифицирован путем использования более иммуногенных белков-носителей (флагеллина и капсидного белка вируса гепатита Е), а также включением консервативного участка гемагглютиниана. Иммуногенность и протективность указанных рекомбинантных «растительных» вакцин была подтверждена в экспериментах на лабораторных животных. Кроме того, с использованием разработанных векторов и подходов к получению рекомбинантных белков в растениях был получен рецептор-связывающий домен (RBD) S белка SARS-CoV-2, присоединенный к бактериальному флагеллину, а также химерный белок, состоящий из RBD SARS-CoV-2 и М2е пептида вируса гриппа А, который в перспективе может быть использован для разработки рекомбинантной бивалентной вакцины против гриппа А и COVID-19.

В целом, используемые в работе подходы к транзientной экспрессии белков в растениях и получению универсальных вакцин от гриппа на основе

М2е и стебля НА не являются принципиально новыми, однако используемая авторами в работе комбинация этих подходов, включающая различные приёмы к оптимизации экспрессии и выделению вакцинных белков, безусловно является оригинальной.

Результаты получены с использованием современных методов, молекулярной биологии, генной инженерии и иммунологии. Для оценки достоверности полученных данных автором применены адекватные статистические модели. Обоснованность и достоверность выдвигаемых на защиту положений не вызывает сомнений.

Достоверность полученных результатов подтверждается 19 публикациями в ведущих зарубежных и отечественных журналах. По результатам выполнения работы получено 2 патента на векторы.

### **Структура и общая характеристика диссертационной работы**

Диссертация Е.С. Мардановой построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Текст диссертации изложен на 240 страницах, включает в себя 109 рисунков и 12 таблиц. Список литературы включает 319 источников.

В разделе «Введение» определена актуальность темы исследования, обозначены научная новизна и практическая значимость работы.

В главе «Обзор литературы» представлены информация о методах экспрессии генов чужеродных белков в растениях, общие сведения о разрабатываемых «растительных» вакцинах против гепатита В, гриппа и коронавируса; описание векторов на основе генома Х вируса картофеля, данные о вирусе гриппа и применяемых подходах к созданию универсальных противогриппозных вакцин, информация о белках носителях для вирусоподобных частиц, включая флагеллин, а также общие данные о вирусах гепатита Е и SARS-CoV-2. Представленные в обзоре литературы

сведения необходимы и достаточны для понимания сути диссертационной работы.

В главе «Материалы и методы» описаны генно-инженерные методы создания векторов для экспрессии генов в растениях, методы трансформации агробактерий *Agrobacterium tumefaciens* и растений *Nicotiana benthamiana*, методы выделения, очистки и характеристики рекомбинантных вакцинных белков из растений, а также методы оценки иммуногенности и протективности «растительных» вакцин против гриппа *in vivo*. Все методы, в том числе и статистические, являются современными и адекватными поставленным задачам.

В главе «Результаты и их обсуждение» детально отражены все результаты, полученные в работе, и проведён их анализ. В разделе 4.1 описано создание экспрессионных векторов на основе генома X вируса картофеля. В частности, проведена оптимизация последовательности вектора, в том числе путем включения энхансера трансляции, репрессора сайленсинга, последовательности сигнального пептида и др. Работоспособность вектора проверялась с использованием GFP. В разделе 4.2 представлена разработка кандидатной «растительной» вакцины от вируса гриппа А на основе консервативного M2e пептида, присоединенного к НВс антигену вируса гепатита В. Показано, что получаемый рекомбинантный белок образует вирусоподобные сферические частицы размером около 30 нм, иммунизация которыми мышей в присутствии адьюванта вызывает специфический иммунный (антительный) ответ против M2e и обеспечивает защиту против летальной гриппозной инфекции. В разделе 4.3. представлена разработка аналогичной противогриппозной вакцины на основе пептида M2e, но уже слитого с бактериальным флагеллином для усиления иммуногенности. Кроме того, получаемый рекомбинантный белок содержит не одну, а четыре копии M2e, и предназначен для интраназальной вакцинации. В разделе 4.4. вакцинная конструкция была усовершенствована добавлением консервативного фрагмента стебля гемагглютинина (НА)

вируса гриппа A/H1N1<sub>pdm09</sub>. Интраназальная иммунизация индуцировала у мышей высокие уровни M2e-специфических IgG антител при слабом иммунном ответе в отношении HA2, но при этом обеспечивала защиту против заражения вирусом гриппа. Таким образом, была продемонстрирована принципиальная возможность создания растительной рекомбинантной вакцины против гриппа А на основе комбинации консервативных фрагментов белков M2 и HA. В разделе 4.5 описана экспрессия в растениях капсидного белка вируса гепатита E, способного образовывать иммуногенные вирусоподобные частицы. Этот белок также был использован в качестве носителя для M2e вируса гриппа А и рецептор-связывающего домена (RBD) белка S коронавируса SARS-CoV-2, однако иммунизация такими частицами преимущественно приводила к образованию IgG к капсидному белку вируса гепатита E. В разделе 4.6 в растительной системе экспрессии были получены варианты белков, содержащих RBD коронавируса дельта, M2e и флагеллин, однако иммуногенность такого белка не проверялась.

В обсуждении автором обобщены полученные результаты и обсуждаются перспективы дальнейшего развития как самой технологии, так и полученных рекомбинантных белков. Переход к выводам логически обоснован. Полученные в диссертационном исследовании результаты подтверждают принципиальную возможность использования выбранного подхода для создания рекомбинантных противовирусных вакцин.

Положения, выносимые на защиту, и выводы полностью соответствуют поставленным задачам и полученным данным. Автореферат соответствует содержанию и выводам диссертации, оформлен в традиционном стиле и соответствует установленным требованиям Диссертационного совета.

### **Замечания и вопросы**

1. Основное замечание связано с тем, что при оценке иммуногенности и протективности вакцинных кандидатов не проводилось прямого

- сравнения не только между сами кандидатами (например, M2eHbc против Flg4M2e HA2-1), но и с другими типами вакцин (например, инактивированными вакцинами против гриппа).
2. В работе не представлены данные по Т-клеточному иммунному ответу. Почему проводилось изучение только антительного (IgG и/или IgA) иммунного ответа?
  3. В случае создания вакцин с использованием капсидного белка вируса гепатита E наблюдается образование антител преимущественно к этому белку, что хорошо для вакцинации против гепатита E, но плохо для вакцинации против других инфекций в случае комбинированной вакцины. Вместе с тем, если такая вакцина все же будет применяться на людях, с большой долей вероятности иммуногенность препарата будет снижена за счет предсуществующего иммунитета к вирусу гепатита E. Как в дальнейшем планируется решать данную проблему?
  4. В разделе 4.2 говорится о том, что вакцину вводили внутривенно. Это опечатка, и имелось в виду внутримышечно? Если нет, то объясните, пожалуйста, выбор способа введения.
  5. Полагаю, что выводы 8, 9 и 10 можно было бы объединить в один, так как в них показана возможность получения ряда рекомбинантных белков, но не проводилось дальнейшее изучение их свойств. Более того, вывод 10 (а также вывод 6, хотя и в меньшей степени) сформулирован как предположение, а не вывод из результатов исследования.

## **Заключение**

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.3. – молекулярная биология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5

Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Марданова Евгения Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. – молекулярная биология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент, профессор РАН, директор Института биомедицинских систем и биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

ВАСИН Андрей Владимирович

21.03.2024

Контактные данные:

vasin\_av@spbstu.ru, +7 (962) 715-95-15

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.04 – Биохимия (биологические науки)

Адрес места работы:

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая улица, 29  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Институт биомедицинских систем и биотехнологий.

Тел.: +7 (812) 290-95-00; e-mail: ibsib@spbstu.ru

Подпись сотрудника института биомедицинских систем и биотехнологий ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого» Васина А.В. удостоверяю:

