

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу
Коваленко Ангелины Олеговны «Вакцинный кандидат против SARS-CoV-2 на основе вирусов растений: создание и характеристика»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – «Вирусология»**

Работа Ангелины Олеговны Коваленко посвящена созданию и характеристике вакцинного кандидата против бетакоронавируса SARS-CoV-2 на основе рекомбинантных коронавирусных антигенов и структурно модифицированных сферических частиц вируса табачной мозаики. В состав вакцинного кандидата вошли три рекомбинантных антигена, экспрессированных в бактериальных клетках *E. Coli*: это Co1 – содержащий последовательность RBD S-белка SARS-CoV-2 (вариант Ухань); полиэпитопный белок PE, содержащий антигенные участки S2-субъединицы S-белка, высококонсервативные среди SARS-CoV-2, SARS-CoV и других SARS-подобных бетакоронавирусов и слитый белок CoF, представляющий собой RBD вируса SARS-CoV-2, соединенный с консервативным эпитопом из домена HR2. Такое сочетание антигенов в вакцинном кандидате может индуцировать иммунный ответ не только против SARS-CoV-2, а также SARS-CoV, но и против других SARS-подобных бетакоронавирусов, пандемический потенциал которых нам пока неизвестен. В этой связи не вызывает сомнения значимость и актуальность выполненного диссертационного исследования.

Рукопись диссертационной работы построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», заключения, выводов, списка цитируемой литературы, содержащего 257 источников. Работа изложена на 159 страницах текста компьютерной верстки, включая 10 таблиц и 30 рисунков, иллюстрирующих полученные автором результаты.

Во введении изложены актуальность темы исследования и степень ее разработанности, цель и задачи исследования, научная новизна исследования, теоретическая и практическая значимость работы, личный вклад автора, методы

и методология научного исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности и результаты апробации работы.

Обзор литературы включает общую характеристику бетакоронавирусов человека и раздел, посвященный рекомбинантным белковым вакцинам. Исчерпывающе представлены данные по таксономии, происхождению и распространению бетакоронавирусов человека, подробно описаны их структурная биология и жизненный цикл. Отдельное внимание уделено описанию генетических вариантов SARS-CoV-2, связи мутаций с их биологическими характеристиками, классифицированными ВОЗ по принципу особенностей распространения, тяжести вызываемого заболевания, а также уклонения от иммунного ответа. При описании дизайна рекомбинантных белковых вакцин автором обсуждаются различные стратегии подбора антигена, в том числе исключая такой неблагоприятный эффект как антителозависимое усиление инфекции, что достигается исключением нежелательных эпитопов при дизайне генно-инженерных конструкций. Рассмотрены различные экспрессионные системы и адъюванты. Подробно описаны типы вакцин, созданных на основе полноразмерного S-белка, на основе рецептор-связывающего домена S-белка, вакцины на основе нуклеокапсидного N-белка и мультиэпитопные вакцины.

В главе «Материалы и методы» подробно приведены использованные в работе экспериментальные методы, включающие, в том числе, получение ДНК-фрагментов, трансформацию клеток *E.coli*, выделение плазмидной ДНК из клеток *E.coli*, экспрессию, выделение и очистку рекомбинантных белков, анализ связывания рекомбинантных антигенов с рецептором ACE2. В качестве адъюванта были получены и охарактеризованы сферические частицы (СЧ) вируса табачной мозаики (ВТМ) и далее созданы композиции СЧ с рекомбинантными коронавирусными антигенами. Проведен анализ вакцинных кандидатов методом просвечивающей электронной микроскопии. Иммуногенность вакцинных кандидатов исследована на модели сирийских хомяков. Для оценки иммунного ответа использованы твердофазный

иммуноферментный анализ и определение вирус нейтрализующих антител в культуре клеток Vero E6. Протективные свойств вакцинного кандидата были оценены по результатам гистологического анализа легочной ткани золотистых хомячков в экспериментах по challenge заражению. В целом впечатляет широкий диапазон использованных в исследовании методов классической вирусологии, иммунологии и молекулярной биологии.

Все полученные результаты подвергались всестороннему статистическому анализу с использованием современного программного обеспечения.

В главе «Результаты и обсуждение» автор подробно описывает проведенную экспериментальную работу целью которой было получение и характеристика рекомбинантных коронавируса антигенов, содержащих эпитопы S-белка SARS-CoV-2 и других SARS-подобных бетакоронавирусов, а также созданию и исследованию свойств вакцинных кандидатов, представляющих собой композиции коронавируса антигенов со сферическими частицами ВТМ.

На основании анализа данных, полученных ранее для SARS-CoV, в состав панели антигенов для вакцинного кандидата были включены 3 рекомбинантных белка с высоко консервативными эпитопами, обладающими потенциальной возможностью индуцировать протективный иммунный ответ как против SARS-CoV-2, так и против SARS-CoV и, возможно, других SARS-подобных бетакоронавирусов. Было показано, что рекомбинантные RBD-содержащие антигены Co1 и CoF способны связываться с ангиотензин превращающим ферментом 2 (ACE2) – клеточным рецептором, взаимодействующим с вирионами SARS-CoV и SARS-CoV-2.

При изучении иммуногенных свойств RBD-содержащих антигенов Co1 и CoF была показана эффективность их взаимодействия с сыворотками крови людей, у которых диагноз COVID-19 был подтвержден методом ОТ-ПЦР, что открывает перспективу создания на их основе диагностических тест-систем. Были получены обнадеживающие результаты: значения титров антител

коррелировали с единицами определения антител коммерческими диагностикумами. Кроме этого, было показано, что антигены Co1 и CoF на основе RBD варианта Ухань по-видимому, могут детектировать антитела в сыворотках крови пациентов, которые были инфицированы разными вариантами SARS-CoV-2. Однако, представляется, что панель сывороток крови для оценки возможности использования RBD-содержащих антигенов Co1 и CoF для тестирования антител против SARS-CoV-2 не достаточно репрезентативна (19 сывороток, включая не иммунные). Поэтому, на наш взгляд, с осторожностью следует делать вывод о том, что RBD-содержащие антигены Co1 и CoF, экспрессированные в бактериальных клетках *E. coli*, могут быть применены в диагностических тест-системах наравне с антигенами, получаемыми в клетках млекопитающих, хотя, несомненно, могут оказаться экономически более выгодными в случае подтверждения результатов этого исследования в более широких испытаниях. В совокупности результаты данного раздела работы продемонстрировали возможность применения экспрессированных в бактериальных клетках *E. coli* антигенов Co1, PE и CoF для создания вакцинного кандидата против SARS-CoV-2.

На следующем этапе исследований были получены и охарактеризованы композиции СЧ ВТМ с тремя рекомбинантными коронавирусными антигенами (СЧ+ЗАГ). Методом иммунофлуоресцентного анализа было продемонстрировано, что на поверхности СЧ+ЗАГ сорбируются коммерческие поликлональные антитела к полноразмерному S-белку как SARS-CoV, так и SARS-CoV-2, что позволило перейти к следующему этапу – изучению иммуногенности этих композиций.

На модели белых аутбредных мышей, двукратно иммунизированных внутрибрюшинно с интервалом в две недели было показано, что иммунный ответ на антиген Co1 (соответствующий RBD) оказался довольно низким как в случае иммунизации совместно с СЧ, так и без них. В то же время СЧ значительно усиливали иммунный ответ на

антигены PE и CoF в сравнении с иммунным ответом, индуцированным смесью индивидуальных антигенов без СЧ, и это было продемонстрировано для каждого из изотипов IgG. Далее были проанализированы титры антител (общие IgG) к СЧ и показано, что титры антител к антигену Co1 были низкими и оказались сопоставимы с титрами к СЧ. Однако титры общих IgG к целевым антигенам PE и CoF были в 16 и в 9 раз, соответственно, выше, чем к СЧ, что показало адъювантную эффективность СЧ.

Вирус нейтрализующая активность, индуцируемая композициями СЧ+ЗАГ, была изучена на модели самок сирийских хомяков, иммунизированных внутримышечно. Нейтрализующие антитела определяли через три недели после второй иммунизации по 50% ингибированию цитопатогенного действия вируса в культуре клеток Vero E6. Нейтрализующие антитела выявляли у каждого из 10 иммунизированных животных в диапазоне разведений сывороток крови от 18 до 87.

Протективность вакцинных кандидатов, а также их безопасность исследовали на модели вакцинных кандидатов MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5, содержащих в равных соотношениях суммарно 45 и 60 мкг рекомбинантных антигенов, соответственно, с 250 мкг СЧ. Исследования протективности базировались на анализе гистологических изменений в легких вакцинированных хомяков в опытах по challenge заражению их SARS-CoV-2. Была отмечена положительная динамика на фоне введения препарата MSUCoV-5 на шестой день после инфицирования SARS-CoV-2 в сравнении с аналогичными группами отрицательного контроля (контроль дозы инфицирования и плацебо). Вакцинный кандидат MSU-CoV-5 обеспечивал протективный эффект, а именно отсутствие или слабую выраженность бронхоинтерстициальной и/или диффузной интерстициальной пневмонии легких, вызванной вирусной инфекцией SARS-CoV-2.

На основании проведенных исследований автор делает заключение, что полученные композиции СЧ+ЗАГ можно считать

перспективным вакцинным кандидатом против SARS-CoV-2, и это положение полностью подтверждается материалами исследования.

Однако при ознакомлении с рукописью диссертации возникли вопросы:

1) Какой титр нейтрализующих антител выявлялся в сыворотках крови хомяков в опытах определения протективности кандидатной вакцинной конструкции MSU-CoV-5, обеспечившей максимальный уровень протективности?

2) Наблюдалась ли корреляция между титрами специфических иммуноглобулинов, выявляемых методом ИФА и нейтрализующими антителами?

3) Планируется ли продолжение исследований по данной теме для усовершенствования кандидатной вакцины направленной против SARS-CoV-2 и других SARS-подобных бетакоронавирусов, например, в плане усовершенствования очистки рекомбинантных белков с целью снижения общего белка и повышения специфичности и иммуногенности?

Оценивая диссертацию в целом, следует отметить значительный объем проведенной экспериментальной работы, разнообразие использованных методов, актуальность и потенциальную практическую ценность полученных автором результатов. Выводы, сделанные в диссертации, базируются на результатах работы, обоснованы и полностью соответствуют цели исследования и поставленным задачам. Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы.

Принципиальных замечаний, которые могли бы повлиять на положительную оценку работы, нет. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.10 – «Вирусология» (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 кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Коваленко Ангелина Олеговна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – «Вирусология».

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией геморрагических лихорадок

ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»

(Институт полиомиелита)

доктор медицинских наук, (03.02.02 – Вирусология)

e-mail: centrglps@yandex.ru

тел.: +7-(495)-841-90-94

Дзагурова Тамара Казбековна

Подпись д.б.н. Т.К. Дзагуровой удостоверяю.

Ученый секретарь ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»

(Институт полиомиелита),

кандидат биологических наук

«27» ноябрь 2023 г.



А.В. Белякова

Федеральное государственное автономное научное учреждение "Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН" (Институт полиомиелита) 108819, г. Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1. Тел.: (495) 841-93-22; e-mail: sue_polio@chumakovs.ru