

**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 диссертационной работы**

Разработка систем экспрессии рекомбинантных белков для получения кандидатных вакцин против социально значимых инфекционных заболеваний является чрезвычайно актуальным направлением развития молекулярной биологии и медицинской вирусологии. Значимость вакцинопрофилактики не оспаривается, по данным ВОЗ, благодаря только 20 вакцинам, наиболее широко применяемым в составе Национальных календарей в настоящее время, ежегодно удается сохранить жизнь почти 5 млн человек. Широкая вакцинопрофилактика наиболее значимое достижение медицинской науки последнего столетия.

Ранее благодаря развитию генной инженерии были отработаны подходы к получению субъединичных вакцин, эффективность которых была повышена с развитием подходов нанотехнологии (в частности, сборке рекомбинантных антигенов в вирусоподобные частицы). Традиционные системы экспрессии субъединичных вакцин бактериальные (на основе продуцента *Escherichia coli*) и дрожжевые (*Saccharomyces cerevisiae*) уже доказали свою применимость, так что совершенно оправданным является развитие альтернативных потенциально более дешевых в производстве и безопасных платформ на основе высших растений.

Кроме платформ экспрессии большое значение имеет структура вектора, его регуляторных элементов и целевой части. В существенной степени именно этому аспекту посвящена диссертационная работа Е.С. Мардановой. Диссертационное исследование, направлено на развитие технологии

экспрессии рекомбинантных белков в высших растениях на основе вирусных векторов с целью получения антигенов возбудителей социально значимых заболеваний, является актуальным, имеющим научно-практическое значение и может внести существенный вклад в развитие новых подходов для разработки кандидатных вакцинных препаратов в ближайшем будущем.

Диссертационная работа Мардановой Е.С. имеет выраженную научно-практическую направленность и соответствует планам развития отечественной науки, в частности отрасли – биологические науки и подразделу – молекулярная биология.

#### **Научная новизна темы исследования и полученных результатов**

Новизна данной диссертационной работы не вызывает сомнений. В диссертации получены следующие новые научные результаты.

1. Сконструирован новый высокоэффективный экспрессионный вектор на основе X вируса картофеля для транзientной экспрессии в листьях *Nicotiana benthamiana*. Детально изучен и оптимизирован вклад каждого компонента этого вектора. Уровень экспрессии повышен за счет оптимизации трансляции мРНК и подавления посттранскрипционного сайленсинга. Для этого автором в состав вектора осуществлен ввод трансляционного энхансера (лидерной последовательности РНК вируса мозаики люцерны) перед геном целевого белка, а также кассета экспрессии гена супрессора посттранскрипционного сайленсинга, которая дополнительно повышает уровень экспрессии целевого белка.
2. Разработана стратегия получения «растительных» кандидатных противогриппозных вакцин на основе консервативных участков антигенов вируса гриппа А – М2е и НА. Для повышения иммуногенности эти антигенные участки были присоединены к другим иммуногенным белкам: НВс-антигену вируса гепатита В, флагеллину *Salmonella typhimurium*, к капсидному белку вируса гепатита Е.
3. Показано, что ядерный антиген вируса гепатита В, к которому

присоединен пептид M2e вируса гриппа А, полученный в растительной системе экспрессии, *in vivo* образует вирусоподобные частицы, а препарат вызывает эффективный иммунный ответ у лабораторных мышей.

4. Продемонстрировано, что химерный белок, содержащий флагеллин *Salmonella typhimurium*, соединенный с четырьмя тандемными копиями пептида M2e вируса гриппа А, эффективно экспрессировался в листьях *Nicotiana benthamiana*. Интраназальная иммунизация мышей этим рекомбинантным белком индуцировала высокие уровни анти-пептидных антител, которые защищали мышей от гриппозной инфекции.
5. Получен химерный белок, содержащий флагеллин с присоединенным к нему консервативным фрагментом НА вируса гриппа А, который эффективно экспрессировался в *Nicotiana benthamiana*, тогда как интраназальная иммунизация мышей этим рекомбинантным белком индуцировала высокие уровни сывороточных анти-M2e антител при слабом иммунном ответе на консервативные области НА и обеспечивала защиту мышей от гриппозной инфекции.
6. Показано, что укороченный вариант капсидного белка вируса гепатита Е при экспрессии в растениях образовывал *in vivo* вирусоподобные частицы и вызывал у лабораторных мышей выработку антител на высоком уровне – данный белок может быть использован для разработки кандидатной вакцины и диагностического препарата. Также, укороченный вариант капсидного белка вируса гепатита Е при экспрессии в растениях может быть использован как носитель фрагментов чужеродных антигенов, что показано для M2e и RBD-фрагмента SARS-CoV-2.

Полученные данные крайне интересны и важны для молекулярных биологов, вирусологов, биотехнологов и других специалистов медико-биологического профиля.

Достоверность самых значимых данных по структуре векторов и экспрессии сложных рекомбинантных белков подтверждается благодаря

использованию современных методов молекулярной биологии, современной приборной базе, четкими логическими экспериментами, наглядными подтверждающими результатами и статистическим анализом полученных результатов. Достоверность результатов диссертации не вызывает сомнения.

Представленные автором результаты по конструированию нового экспрессионного вектора на основе X вируса картофеля для транзientной экспрессии в листьях *Nicotiana benthamiana* является значимым вкладом в молекулярную биологию, генную инженерию, биотехнологию и вирусологию. Автором показан вклад каждого компонента вектора при создании конкретных кандидатных препаратов. Уровень экспрессии повышен за счет оптимизации трансляции м-РНК и подавления посттранскрипционного сайленсинга. Показана возможность повышения иммуногенности целевого антигена благодаря комбинации с белками вирусов гепатита В и Е, а также флагеллина *Salmonella typhimurium*. Полученные препараты могут быть использованы для получения рекомбинантных кандидатных вакцин от гриппа, от гепатита Е, от COVID-19 и для использования в составе диагностических препаратов. Продемонстрирована возможность получения бивалентного кандидатного вакцинного препарата.

### **Общая оценка диссертации**

Данная диссертация выполнена на актуальную тему, направлена на разработку систем экспрессии ркомбинантных белков в растениях на основе вирусных векторов.

Достоверность и обоснованность полученных результатов подтверждается детальным теоретическим анализом проблемы, достаточным объемом исследований, проведенных для достижения поставленной цели. Задачи, поставленные в работе, соответствуют цели исследования. Автором применены современные сложные молекулярно-биологические и генно-инженерные методы, обосновано использованы адекватные методы статистического анализа.

Личный вклад автора заключался в постановке цели и задач исследования, в планировании и проведении экспериментов, в обработке экспериментальных данных, в написании публикаций и текста диссертации.

Общая структура и содержание диссертационной работы Диссертация изложена на 241 странице машинописного текста, содержит 109 рисунков и 12 таблиц. Структура рукописи классическая. Она состоит из разделов “Оглавление”; “Определения, обозначения и сокращения”; “Введение”; “Цель и задачи работы”; “Обзор литературы”; “Материалы и методы”; “Результаты”; “Обсуждение полученных результатов”; “Выводы”; “Список публикаций по теме диссертации”; “Список цитируемой литературы”, список которой содержит 6 отечественных и 313 иностранных источников.

Во введении диссертационной работы Марданова Е.С. обосновывает актуальность и новизну темы исследования, описывает степень ее разработанности. Также автор отражает основную цель и задачи своего исследования, обосновывает теоретическую и практическую значимость работы, описывает методологию исследования, формулирует основные положения, выносимые на защиту, обосновывает степень достоверности полученных результатов, представляет информацию об их апробации и личном вкладе в работу.

В Главе 1 («Обзор литературы») соискатель представила обзор современной научной литературы, который дает представление о ключевых проблемах и трендах в предметной области диссертационной работы. Обзор выполнен на высоком профессиональном уровне, он включает литературу и анализ самых современных работ в области генной инженерии и экспрессии рекомбинантных белков в растениях. Аналитический обзор логично выстроен и системно структурирован. Достоинством обзора является большое количество примеров по аналогичным работам с указанием их достижений и недостатков.

В Главе 2 формулируется цель и задачи исследования, логично связанные

с достижением цели.

Глава 3 «Материалы и методы исследования» содержит подробное описание объекта и материала исследования, используемых молекулярно-биологических, иммунологических, вирусологических и статистических методов исследования.

Глава 4 «Результаты собственных исследований» включает подробное описание всех полученных автором результатов. Глава разделена на подглавы в соответствии с основными направлениями работы. Все полученные результаты подробно изложены в тексте диссертационной работы и проиллюстрированы соответствующими таблицами, графиками и рисунками.

В Главе 5 «Обсуждение» проведено детальное обсуждение полученных автором результатов исследования и их сравнение с результатами исследований как отечественных, так и зарубежных специалистов.

Работа завершается 10 выводами, соответствующими задачам исследования и отражающими суть проведенных исследований. Выводы диссертационного исследования, как и положения, сформулированные автором обоснованы в результате представления в диссертации исчерпывающего объема экспериментальных данных их подтверждающих. Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне и имеет актуальную научно-практическую ценность.

#### **Соответствие автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с требованиями, отражает основное содержание работы и научных публикаций автора, раскрывает все основные положения, выносимые на защиту.

#### **Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем**

По результатам диссертационной работы опубликовано 21 печатная работа, из них 15 в высокорейтинговых зарубежных журналах, и получено 2

патента РФ на изобретение.

### **Достоинства и недостатки диссертационной работы**

Значительный объем проанализированного материала, использование молекулярно-биологических, генно-инженерных и биоинформатических методов и, самое главное, актуальные результаты исследования является несомненным достоинством диссертационной работы. В качестве достоинства стоит отметить хорошее знание автором растительной вирусологии и литературы в области создания векторов на основе вирусов растений. Очевидны прекрасные знания автора генно-инженерных и биохимических методов, протоколов получения плазмидных векторов, агробактериальной доставки трансгена для высокоэффективной транзientной экспрессии. Работа содержит множество информативных схем и рисунков, что украшает и упрощает понимание фактического материала.

Можно отметить погрешности в оформлении: использование лабораторного сленга или терминологических неточностей (например, «гистидиновый таг», «экспрессированы вакцины», «белок ... является подходящим кандидатом для серологического диагноза..» или «белок ... может быть использован в качестве вакцины ... и диагностикума»), пунктуационные ошибки и орфографические опечатки (например – «изготовленияинактивированные» или несогласованные предложения как: «... бактериальная система экспрессии, а самой популярная – на основе *E.coli*»), или погрешности в редактировании текста (например - раздел «апробация работы» на стр. 5 оформлен другим размером шрифта). В ряде случаев встречаются значительные фрагменты текста без ссылок на подтверждающие источники (например, на стр.8, 12). Местами делаются пафосные отсылки на примеры успешных биотехнологических разработок, которые на текущий момент потерпели неудачу и соответственно продуктов которых ожидать уже не стоит (например, компания Medicago на стр. 13, 15, 185). Присутствуют редкие фактологические неточности такие как

утверждение, что «вакцинные препараты от гриппа обновляются ежегодно» (стр. 34). Данные недочеты и неточности не снижают значимости работы и важности полученных результатов.

Принципиальных замечаний по содержанию диссертационной работы Мардановой Екатерины Сергеевны не имею.

При ознакомлении с диссертационным исследованием возникают следующие вопросы, в основном к разделу по оценке иммуногенности и эффективности полученных вакцинных кандидатов:

1. Как обосновывали дозу иммуногена, состав адъюванта в используемых композициях и режим иммунизации? Данные по подбору состава, дозы и режима иммунизации не представлены. Рассматривали ли возможность использования стандартных (контрольных) антигенов, например из зарегистрированных для клинического применения вакцин там, где это возможно?

2. Так как одной из главных моделей был выбран вирус гриппа, то, чем было обосновано использование конкретных (A/PR8/34 (H1N1), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Kurgan\05\05 (H5N1)) разных штаммов возбудителя в отдельных экспериментах по оценке защитной эффективности с использованием разработанных антигенов, учитывая, что везде использовался M2e эпитоп?

3. Как обосновывали заражающие дозы при постановке инфекционных животных моделей? Самая высокая из изученных доз 10 LD<sub>50</sub> (в основном более низкие заражающие дозы, которых местами недостаточно что видно на ряде рисунков, где нет полной гибели контрольной группы даже на 5 LD<sub>50</sub>). Какой была заражающая доза в Ig ТЦД<sub>50</sub>, если таковая оценивалась? Может ли оптимизация дозы, состава адъюванта и режима иммунизации повысить в дальнейшем эффективность кандидатов на основе разработанных автором антигенных композиций?

4. Какой из представленных в исследовании многочисленных кандидатных вакцинных препаратов наиболее перспективен для дальнейшего исследования в доклинических и клинических исследованиях? Существуют ли



планы по проведению полноценных доклинических исследований?

5. Можно ли с учетом опыта экспрессии различных антигенов сформулировать алгоритм, по которому можно было бы, используя предложенные подходы обеспечить ритмичное создание кандидатных вакцин с последующим выводом их в полноценные доклинические и клинические исследования? Какие ограничения существуют в части выбора антигенов, организации производства антигена и т.д.?

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, заведующий лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов отдела арбовирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Почетного

академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

ГУЩИН Владимир Алексеевич

Контактные данные:

+7 903 751 57 86

vladimir.a.gushchin@gamaleya.org

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена докторская диссертация:

3.2.2 – «эпидемиология»

1.5.10 – «вирусология»

Адрес места работы:

123098, г. Москва, ул. Гамалеи, дом 18.

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского.

Тел.: +7 (499) 193-30-01; e-mail: info@gamaleya.org

Подпись д.б.н. Гушин В.А. заверяю

Ученый секретарь

Кандидат биологических наук

Е.В. Сысолятина

