

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

Диссертационная работа Ангелины Олеговны Коваленко посвящена созданию и характеристике вакцинного кандидата против коронавируса SARS-CoV-2, ставшего причиной недавней пандемии COVID-19. Вакцинация, несомненно, является наиболее эффективным способом предотвращения развития эпидемической вспышки инфекционного заболевания. Несмотря на достаточно большое количество вакцин, которые были лицензированы и одобрены в условиях чрезвычайной ситуации, связанной с глобальным распространением SARS-CoV-2, проблема разработки новых подходов к вакцинации против SARS-CoV-2 и других потенциально опасных бетакоронавирусов остается актуальной. Разработанные вакцины продемонстрировали приемлемый уровень безопасности и эффективности против первоначального варианта SARS-CoV-2 – Ухань. Однако появление новых вызывающих беспокойство вариантов (таких как Омикрон), для которых характерны повышенная трансмиссивность и способность уклоняться от иммунного ответа, ставит перед наукой задачу разработки нового универсального вакцинного препарата. Таким образом, актуальность и практическая значимость диссертационной работы А.О. Коваленко не вызывает сомнений.

Диссертация А.О. Коваленко построена по общепринятому плану, изложена на 159 страницах машинописного текста, включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение и выводы. Работа содержит 10 таблиц и 30 рисунков. Список цитируемой литературы включает 257 источников зарубежных и отечественных авторов.

Во введении автором обоснована актуальность работы и обозначены цели и задачи научного исследования.

В обзоре литературы автором приведена подробная характеристика бетакоронавирусов человека, рассмотрены строение вириона и жизненный цикл вируса, описаны функции структурных и неструктурных белков. Особое внимание было уделено описанию генетических вариантов вируса SARS-CoV-2. Характеристика разнообразия вариантов SARS-CoV-2 имеет важное значение для разработки вакцины, чему посвящена представленная диссертация. Значительная часть обзора посвящена работам, описывающим стратегии разработки рекомбинантных белковых вакцин против бетакоронавирусов человека. Рассмотрены различные подходы, основанные на использовании разных коронавирусных белков (и их фрагментов) в качестве основного иммуногена. Отдельное внимание уделено анализу экспрессионных систем и адъювантов, используемых при создании таких вакцин. Таким образом, обзор литературы позволяет сформировать целостную картину, отражающую современное состояние исследований в данной области.

В разделе «Материалы и методы» отражен весь широкий спектр применяемых автором физико-химических, иммунохимических, молекулярно-биологических и вирусологических методов. Данный раздел написан очень подробно и аккуратно и содержит всю необходимую информацию для понимания методик экспериментов, а также информацию об используемых в работе реактивах и оборудовании. Для выполнения диссертации автором применены современные методики, выбор которых для решения поставленных задач рационален. В исследованиях использовано современное оборудование и программное обеспечение. Это отражает высокий научно-методический уровень диссертационной работы, соответствующий мировым стандартам.

В разделе «Результаты и обсуждение» подробно изложены результаты исследований, проведенных автором. А.О. Коваленко получила панель из

трех рекомбинантных антигенов коронавируса (ЗАГ), два из которых основаны на последовательности RBD SARS-CoV-2 (Co1, CoF), а третий (антиген PE) включает в себя фрагменты S2-субъединицы, консервативные для целого ряда бетакоронавирусов. Использование консервативных последовательностей – многообещающий подход современной вакцинологии. Консервативность выбранных для белка PE последовательностей не только среди различных вариантов SARS-CoV-2, но и среди других бетакоронавирусов может стать хорошим заделом для дальнейшего создания вакцины широкого спектра действия. Ангелина Олеговна впервые показала, что антигены Co1 и CoF, полученные в бактериальной системе *E. coli*, взаимодействуют с ACE2, который является клеточным рецептором SARS-CoV-2. Также автором было показано, что эти антигены эффективно взаимодействуют с сыворотками крови людей, перенесших естественную инфекцию SARS-CoV-2. Более того, титры антител в сыворотках крови иммунных доноров, определяемые с использованием антигенов Co1 и CoF, коррелировали со значениями ВАУ/мл, определенными коммерческими лабораториями. Отдельно следует отметить, что эти антигены эффективно связывались не только с сыворотками крови доноров, перенесших инфекцию SARS-CoV-2, вызванную вариантом Ухань, но также и вариантами Дельта и Омикрон, причем эффективность взаимодействия в случае последних двух не была снижена. Исходя из этих данных автором был сделан обоснованный вывод о перспективности использования разработанных антигенов для создания вакцины против SARS-CoV-2.

На следующем этапе работы А.О. Коваленко получила и охарактеризовала вакцинный кандидат. Помимо вышеописанных антигенов коронавируса в состав вакцинного кандидата в качестве адъюванта были включены структурно-модифицированные вирусы растений – сферические частицы (СЧ), получаемые в процессе термической перестройки вируса табачной мозаики. В своей диссертационной работе Ангелина Олеговна

всесторонне охарактеризовала композиции СЧ + ЗАГ, изучила их иммуногенность и протективный потенциал. Результаты, полученные автором в рамках диссертационной работы, хорошо согласуются с опубликованными ранее данными об иммуностимулирующей активности структурно модифицированных вирусов растений и дополняют их. При изучении иммуногенности автором показана возможность формирования сбалансированного Th1/Th2 иммунного ответа на антигены коронавируса вследствие иммунизации композициями СЧ + ЗАГ. Этот факт демонстрирует благоприятный профиль иммуногенности предложенного в работе вакцинного кандидата. Помимо иммуногенности А.О. Коваленко была изучена протективная активность на моделях *in vitro* и *in vivo* и продемонстрирована способность разработанного вакцинного кандидата индуцировать выработку нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 и снижать тяжесть течения пневмонии после заражения этим вирусом.

В конце каждого подраздела автор сопоставляет полученные результаты с имеющимися литературными данными и кратко резюмирует основные результаты проведенных исследований.

В заключении можно сделать вывод о том, что диссертационная работа Коваленко Ангелины Олеговны «Вакцинный кандидат против SARS-CoV-2 на основе вирусов растений: создание и характеристика» является законченным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне. Результаты, приведенные в работе, представляют большую значимость для разработки вакцины как против бетакоронавирусов в частности, так и в целом для разработки вакцин против различных патогенов человека с использованием вирусов растений в качестве адъювантов. Публикации автора полностью соответствуют результатам проведенных исследований. Положения, выносимые на защиту, и выводы диссертационной работы научно обоснованы, а автореферат диссертации отражает наиболее важные положения диссертационной работы, по результатам которой было опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных

изданиях, а также были представлены доклады на международных и российских конференциях.

Хотя работа заслуживает самой высокой оценки, к ней есть ряд вопросов и замечаний. Главный из них касается состава вакцинного препарата на основе сферических частиц. Автор включил его состав все три исследованных антигена - Co1, PE и CoF. Но зачем было включать Co1, если он входит в состав белка CoF? Логика такого решения непонятна.

В разделе 3.2 (стр. 93) про экспрессию белков в *E. coli* сказано, что выход белков Co1, CoF и PE составил 8, 30 и 120 мг, соответственно, на 1 л питательной среды. Эти показатели не информативны, поскольку зависят от плотности культуры, которая в свою очередь определяется условиями культивирования. Более полезно было бы указать выход рекомбинантных белков в процентах от общего белка и привести результат SDS-PAGE белков из культур после индукции, а не только очищенных препаратов.

На странице 95 упоминается «нейтрализация псевдовиральных частиц SARS-CoV-2». Обычно этот термин используется в отношении биологической активности вируса, что имеется ввиду здесь?

В разделе 3.3 представлены данные о взаимодействии антигенов Co1 и CoF с сыворотками крови людей, иммунными к SARS-CoV-2. Почему такой же эксперимент не был сделан для PE? Тем более что по итогам раздела делается заключение о том, что экспрессированные в бактериальных клетках *E. coli* антигены Co1, PE и CoF могут быть применены для создания вакцинного кандидата против SARS-CoV-2.

На стр. 113 отмечается, что иммунный ответ на антиген Co1 оказался довольно низким как в случае иммунизации совместно с СЧ, так и без них, но СЧ значительно усиливали иммунный ответ на антигены PE и CoF. Поскольку Co1 входит в CoF наряду с эпитопом HR2 (а он входит в PE), то можно ли сделать вывод о том, что именно HR2 играет ключевую роль?

На рисунке 16 представлен иммунофлуоресцентный анализ композиций СЧ + ЗАГ. Хорошо иметь отрицательным контролем СЧ без антигена.

В эксперименте по оценке протективности белков (рисунок 30) явно видны отличия группы животных, которым вводили PBS, от группы животных, зараженных вирусом без предварительной иммунизации (контроль дозы инфицирования). Это неожиданно, являются ли отличия значимыми?

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 1.5.10 – 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:

доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Равин Николай Викторович

08.11.2023

Контактные данные:

тел.: +7 (499) 783-32-64, e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.02.02 – Вирусология (биологические науки)

Адрес места работы:

119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, Федеральное
государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
Тел.: +7 (495) 954-52-83; e-mail: info@fbras.ru

Подпись сотрудника Федерального государственного учреждения «Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской
академии наук» Н.В. Равина удостоверяю:



**ЗАМ. НАЧАЛЬНИКА
ОТДЕЛА КАДРОВ
И. В. Шиян**