

Заключение диссертационного совета МГУ.015.4

по диссертации на соискание ученой степени доктора наук

Решение диссертационного совета от «11» апреля 2024 г. № 7

О присуждении Мардановой Евгении Сергеевне, гражданке РФ, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация “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 принята к защите диссертационным советом 01.02.2024, протокол №1.

Соискатель Марданова Евгения Сергеевна 1983 года рождения защитила диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук на тему “Роль лидерной последовательности гена алкогольдегидрогеназы кукурузы в регуляции трансляции мРНК” в 2008 году в диссертационном совете Д501.001.76 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Соискатель работает старшим научным сотрудником ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН.

Диссертация выполнена в ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН. Научный консультант – доктор биологических наук, профессор **Равин Николай Викторович**, заместитель директора по научной работе ФИЦ "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН.

Официальные оппоненты:

Васин Андрей Владимирович, доктор биологических наук, доцент, профессор РАН, ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Институт биомедицинских систем и биотехнологий, директор;

Гущин Владимир Алексеевич, доктор биологических наук, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского, отдел арбовирусов, заведующий лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов;

Морозов Сергей Юрьевич, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», заведующий

лабораторией генной инженерии вирусов отдела биохимии вирусов растений НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского дали положительные отзывы на диссертацию.

Соискатель имеет 32 опубликованные работы, в том числе по теме диссертации 21 работу, из них 19 статей, опубликованных, в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3. – молекулярная биология. Согласно п.2.4. Положение о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, по решению диссертационного совета к публикациям, в которых излагаются основные научные результаты диссертации на соискание учёной степени, приравнено 2 патента на изобретения.

Статьи в рецензируемых научных изданиях

1. Blokhina E. A. et al. Plant-Produced Nanoparticles Based on Artificial Self-Assembling Peptide Bearing the Influenza M2e Epitope //Plants. – 2023. – Т. 12. – №. 11. – С. 2228. ИФ WoS 4,5. Доля участия = 50%. 0.8 п. л.
2. Mardanova E. S. et al. High-yield production of chimeric hepatitis E virus-like particles bearing the M2e influenza epitope and receptor binding domain of SARS-CoV-2 in plants using viral vectors //International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Т. 23. – №. 24. – С. 15684. ИФ WoS 5,6. Доля участия = 70%. 1.4 п. л.
3. Mardanova E. S., Kotlyarov R. Y., Ravin N. V. Rapid transient expression of receptor-binding domain of SARS-CoV-2 and the conserved M2e Peptide of Influenza A virus linked to flagellin in *Nicotiana benthamiana* plants using self-replicating viral vector //Plants. – 2022. – Т. 11. – №. 24. – С. 3425. ИФ WoS 4,5. Доля участия = 70%. 0.9 п. л.
4. Mardanova E. S., Kotlyarov R. Y., Ravin N. V. High-yield production of receptor binding domain of SARS-CoV-2 linked to bacterial flagellin in plants using self-replicating viral vector pEff //Plants. – 2021. – Т. 10. – №. 12. – С. 2682. ИФ WoS 4,5. Доля участия = 80%. 1.0 п. л.
5. Takova K. et al. Development and optimization of an enzyme immunoassay to detect serum antibodies against the hepatitis E virus in pigs, using plant-derived ORF2 recombinant protein //Vaccines. – 2021. – Т. 9. – №. 9. – С. 991. ИФ WoS 7,8. Доля участия = 30%. 0.5 п. л.
6. Mardanova E. S., Ravin N. V. Transient expression of recombinant proteins in plants using potato virus X based vectors //Methods in Enzymology. – Academic Press, 2021. – Т. 660. – С. 205-222. ИФ WoS 2,7. Доля участия = 70%. 0.5 п. л.

7. Mardanova E. S. et al. A plant-based transient expression system for the rapid production of highly immunogenic Hepatitis E virus-like particles //Biotechnology Letters. – 2020. – Т. 42. – С. 2441-2446. ИФ WoS 2,7. Доля участия = 70%. 0.5 п. л.
8. Blokhina E. A. et al. Plant-produced recombinant Influenza A virus candidate vaccine based on flagellin linked to conservative fragments of M2 protein and hemagglutinin //Plants. – 2020. – Т. 9. – №. 2. – С. 162. ИФ WoS 4,5. Доля участия = 50%. 0.7 п. л.
9. Zahmanova G. G. et al. Rapid high-yield transient expression of swine hepatitis E ORF2 capsid proteins in *Nicotiana benthamiana* plants and production of chimeric hepatitis E virus-like particles bearing the M2e influenza epitope //Plants. – 2019. – Т. 9. – №. 1. – С. 29. ИФ WoS 4,5. Доля участия = 30%. 0.6 п. л.
10. Tsybalova L. M. et al. Combination of M2e peptide with stalk HA epitopes of influenza A virus enhances protective properties of recombinant vaccine //PloS one. – 2018. – Т. 13. – №. 8. – С. e0201429. ИФ WoS 3,7. Доля участия = 30%. 0.7 п. л.
11. Блохина Е. А. и др. Экспрессия в растениях рекомбинантного белка на основе флагеллина, содержащего консервативные участки М2 белка и гемагглютинина вируса гриппа. //Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – №. 4. – С. 385-390. ИФ WoS 0,8. Доля участия = 50%. 0.3 п. л.
12. Mardanova E. S., Ravin N. V. Plant-produced recombinant influenza A vaccines based on the M2e peptide //Current pharmaceutical design. – 2018. – Т. 24. – №. 12. – С. 1317-1324. ИФ WoS 3,1. Доля участия = 90%. 0.8 п. л.
13. Stepanova L. A. et al. Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces potent humoral and T-cell responses and protects mice against various influenza viruses a subtypes //Journal of biomedical science. – 2018. – Т. 25. – С. 1-15. ИФ WoS 11. Доля участия = 40%. 0.7 п. л.
14. Цыбалова Л. М. и др. Усиление эффективности кандидатной вакцины против гриппа сочетанием консервативных последовательностей гемагглютинина и М2 белка //Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2017. – Т. 16. – №. 3 (94). – С. 65-70. Доля участия = 30%. 0.3 п. л.
15. Mardanova E. S. et al. Efficient transient expression of recombinant proteins in plants by the novel pEff vector based on the genome of potato virus X //Frontiers in Plant Science. – 2017. – Т. 8. – С. 247. ИФ WoS 5,6. Доля участия = 80%. 0.8 п. л.
16. Mardanova E. S. et al. High immunogenicity of plant-produced candidate influenza vaccine based on the M2e peptide fused to flagellin //Bioengineered. – 2016. – Т. 7. – №. 1. – С. 28-32. ИФ WoS 4,9. Доля участия = 60%. 0.8 п. л.

17. Mardanova E. S. et al. Rapid high-yield expression of a candidate influenza vaccine based on the ectodomain of M2 protein linked to flagellin in plants using viral vectors //BMC biotechnology. – 2015. – Т. 15. – С. 1-10. ИФ WoS 3,5. Доля участия = 70%. 0.9 п. л.
18. Равин Н. В. и др. Продукция в растениях рекомбинантной противогриппозной вакцины на основе вирусоподобных НВс-частиц, несущих внеклеточный домен М2 белка. //Биохимия. – 2012. – Т. 77. – №. 1. – С. 43-52. ИФ WoS 2,8. Доля участия = 30%. 0.3 п. л.
19. Марданова Е. С., Котляров Р. Ю., Равин Н. В. Повышение эффективности продукции рекомбинантных белков в растениях за счет оптимизации трансляции РНК вируса-вектора //Молекулярная биология. – 2009. – Т. 43. – №. 3. – С. 568-571. ИФ WoS 1,2. Доля участия = 90%. 0.4 п. л.

Патенты

1. Марданова Е. С., Равин Н. В. Вирусный вектор для продукции рекомбинантных белков в растениях. – 2010.
2. Марданова Е. С. и др. Рекомбинантный вирусный вектор и система экспрессии в клетках растения гибридного белка, включающего внеклеточный домен белка М2 вируса гриппа, присоединенный к ядерному антигену вируса гепатита В. – 2012.

Марданова Е.С. внесла решающий вклад в публикации по теме диссертации: личный вклад состоит в анализе научной литературы, планировании и проведении большинства экспериментов, обработке и анализе полученных данных, подготовке публикаций. Основные результаты, представленные в перечисленных работах, получены самим автором.

На диссертацию и автореферат поступило 6 дополнительных отзывов, все положительные.

Выбор официальных оппонентов основывался на их компетентности в области экспрессии рекомбинантных белков в растениях и разработки вакцинных препаратов, направленных на социально значимые инфекции, наличием научных статей по данной тематике, опубликованных в высокорейтинговых международных рецензируемых журналах.

Диссертационный совет отмечает, что представленная диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена важная научная проблема и изложены новые научно обоснованные технические решения.

Значимость работы обусловлена возможностью использования разработанных экспрессионных векторов на основе генома X вируса картофеля (ХВК) для продукции различных рекомбинантных белков в растениях и разработки кандидатных вакцинных препаратов от возбудителей социально-значимых инфекций. Созданные векторы обладают рядом таких преимуществ, как высокий уровень экспрессии целевого белка за счет репликации вектора в клетках растения, наличия трансляционного энхансера и кассеты экспрессии гена супрессора посттранскрипционного сайленсинга генов.

Разработана система экспрессии в растениях антигена НВс с присоединенным к нему М2е-пептидом вируса гриппа А. Такой антиген может быть основой универсальной вакцины. С помощью созданного вирусного вектора белок М2еНВс был продуцирован в листьях *N. benthamiana* на высоком уровне, причем синтезированный гибридный белок формировал вирусоподобные частицы (ВПЧ). Иммунизация мышей М2еНВс частицами вызывала эффективный иммунный ответ против М2е и обеспечивала протективный иммунитет против летальной гриппозной инфекции. Кроме того, в качестве адъюванта-носителя был использован флагеллин *Salmonella typhimurium*, к которому присоединяли четыре тандемные копии М2е-пептида. Использование вирусного вектора на основе генома ХВК позволило достичь уровня экспрессии белка Flg-4М, близкого к предельным значениям, достигаемым для модельного белка GFP. Интраназальная иммунизация мышей вакцинным белком индуцировала высокие уровни специфичных к М2е антител в сыворотках, обеспечивала полную защиту от заражения вирусом гриппа. Также в растениях был синтезирован белок, дополнительно включающий фрагмент второй субъединицы гемагглютиниона (НА2), который обладал высокой иммуногенностью и обеспечивал защиту от заражения вирусом гриппа. Таким образом, экспрессия белков на основе флагеллина и консервативных антигенов вируса гриппа А, М2е и НА2, в растениях может стать перспективным подходом для получения универсальных рекомбинантных вакцин против гриппа.

В растениях экспрессирован капсидный белок вируса гепатита Е (HEV), который может быть основой кандидатной вакцины против гепатита Е и использован для разработки диагностических систем. Капсидный белок HEV показал свою эффективность в качестве носителя чужеродных эпитопов, таких как М2е-пептид вируса гриппа А и рецептор-связывающий домен (RBD) белка S коронавируса SARS-CoV-2. Показано, что и «пустой» капсидный белок, и гибридные капсидные белки с присоединенными М2е пептидами эффективно синтезировались в *N. benthamiana* и формировали ВПЧ. Иммунизация мышей этими ВПЧ приводила к выработке

специфических IgG к HEV на высоком уровне. Иммунизация препаратами, содержащими M2e-пептид, приводила к образованию IgG антител к M2e, однако титры антител были ниже. Рекомбинантный белок на основе капсидного белка HEV с присоединенным RBD, полученный в растениях, формировал ВПЧ, а антитела пациентов с COVID-19 связывались с ВПЧ, что указывает на расположение RBD на поверхности частицы. Также разработана система экспрессии рекомбинантного белка на основе RBD, присоединенного к флагеллину, который может быть использован как основа для получения вакцины против COVID-19. Продемонстрирована возможность получения в растениях рекомбинантного белка на основе флагеллина с двумя присоединенными антигенами, - RBD коронавируса SARS-CoV-2 и 4 копиями M2e-пептида вируса гриппа А, который может стать основой бивалентной вакцины для интраназального введения.

Диссертация представляет собой самостоятельное законченное исследование, обладающее внутренним единством. Положения, выносимые на защиту, содержат новые научные результаты и свидетельствуют о личном вкладе автора в науку:

1. Рекомбинантные векторы на основе генома X вируса картофеля могут быть использованы для транзientной экспрессии рекомбинантных белков в растениях, в цитозоле и в эндоплазматическом ретикулуле. Включение в состав вектора трансляционного энхансера (лидерной последовательности РНК вируса мозаики люцерны) перед геном целевого белка, а также кассеты экспрессии гена супрессора посттранскрипционного ген-сайленсинга повышает уровень экспрессии целевого белка.

2. Ядерный антиген вируса гепатита В, к которому присоединен M2e-пептид вируса гриппа А, полученный в растительной системе экспрессии, образует *in vivo* вирусоподобные частицы сферической формы. Препарат вызывает эффективный иммунный ответ против M2e и обеспечивает защиту от летальной гриппозной инфекции.

3. Химерные белки, содержащие флагеллин *S. typhimurium*, соединенный с четырьмя тандемными копиями M2e-пептида вируса гриппа А или консервативным фрагментом гемагглютинина и четырьмя копиями M2e, эффективно экспрессируются в растениях. Интраназальная иммунизация мышей рекомбинантными белками индуцирует высокие уровни специфических сывороточных антител и обеспечивает защиту против летальной гриппозной инфекции. Эти белки могут быть использованы в качестве основы кандидатной «растительной» вакцины от гриппа А, которую можно вводить интраназально.

4. Укороченный вариант капсидного белка вируса гепатита Е способен экспрессироваться в растениях, образовывать *in vivo* вирусоподобные частицы и вызывать выработку антител к вирусу гепатита Е на высоком уровне. Этот белок может быть

использован для разработки кандидатных вакцин от вируса гепатита Е и диагностикумов. Укороченный вариант капсидного белка вируса гепатита Е при экспрессии в растениях может быть использован в качестве носителя чужеродных антигенов, таких как М2е-пептид вируса гриппа А или RBD фрагмент белка S коронавируса SARS-CoV-2.

На заседании 11 апреля 2024 г. диссертационный совет принял решение присудить Мардановой Е.С. ученую степень доктора биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 12 человек, из них 6 докторов наук по специальности – молекулярная биология, участвовавших в заседании, из 18 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 12, против 0, недействительных бюллетеней 0.

Председатель
диссертационного совета

Карпова О.В.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Комарова Т.В.

11.04.2024