

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Зыковой Анны Андреевны
на тему: «Конструирование наночастиц на основе рекомбинантных
белков, содержащих антигены вируса гриппа»
по специальности 1.5.3. молекулярная биология**

Актуальность темы исследования

Вирус гриппа представляет серьезную угрозу для общественного здравоохранения по нескольким причинам. Во-первых, он обладает высокой антигенной изменчивостью, что помогает ему избегать иммунного ответа хозяина. Во-вторых, вирус гриппа может вызывать не только сезонные эпидемии, но и пандемии, что сопровождается массовыми заболеваниями и высокой смертностью. Хотя традиционные вакцины, основанные на целом вирусе или его поверхностных белках обладают высокой эффективностью, они являются штамм-специфическими и их состав должен ежегодно обновляться для соответствия актуальному в данный сезон штамму. Альтернативой традиционным вакцинам является разработка рекомбинантных вакцин, основанных на консервативных антигенах вируса. Разработка таких «универсальных» вакцин является актуальной задачей и работы в данной области активно ведутся в разных странах.

Однако, консервативные антигены характеризуются низкой иммуногенностью, и для создания эффективной вакцины необходимы специальные приемы для ее повышения. Одним из наиболее эффективных является присоединение антигена к вирусоподобным наночастицам, которые имитируют структуру вирусов и эффективно распознаются иммунной системой. Для получения вирусоподобных частиц обычно используются капсидные белки вирусов, которые могут самопроизвольно собираться в наноразмерные структуры. Однако такие частицы не лишены минусов – не все вирусные капсидные белки способны собираться в наночастицы, а чужеродная вставка часто нарушает процесс сборки. В качестве

альтернативного «строительного блока» для создания наночастиц могут быть использованы искусственные пептиды, способные к самоагрегации.

Таким образом, тема диссертации Зыковой А.А., посвященной конструированию наночастиц на основе рекомбинантных белков, содержащих антигены вируса гриппа, является актуальной.

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

В работе сконструированы экспрессионные векторы и получены в клетках *E. coli* рекомбинантные белки на основе самособирающегося пептида (SAP). Изначально было получено два типа рекомбинантных белков: SAP и SAP со спиральным линкером на С-конце. Белок SAP в процессе рефолдинга сильно агрегировал, а введение спирального линкера способствовало формированию однородных частиц. И именно этот тип частиц использовался в дальнейшей работе. Были сконструированы экспрессионные векторы и получены в клетках *E. coli* рекомбинантные белки на основе SAP со спиральным линкером, содержащие консервативные антигены вируса гриппа А: M2e пептид, фрагмент второй субъединицы гемагглютинина (HA2) и эпитопы нуклеопротеина. Полученные в клетках *E. coli* рекомбинантные белки на основе SAP после рефолдинга *in vitro* образовывали наноразмерные частицы. Иммуногенность и протективность полученных наночастиц была подтверждена в экспериментах на лабораторных животных.

Кроме того, была предпринята попытка получить рекомбинантные белки на основе SAP с помощью растительной системы экспрессии. Были созданы экспрессионные векторы, предназначенные для транзientной экспрессии рекомбинантных белков в *Nicotiana benthamiana*. С помощью растительной системы экспрессии был получен рекомбинантный белок на основе SAP, несущий M2e пептид вируса гриппа, который после рефолдинга *in vitro* образует наноразмерные частицы. Иммуногенность и протективность

полученных наночастиц была также подтверждена в экспериментах на мышах.

Практическая значимость работы обусловлена возможностью использования разработанных рекомбинантных наночастиц для создания противогриппозных кандидатных вакцин.

Результаты получены с использованием современных методов молекулярной биологии, генной инженерии и иммунологии. Для оценки достоверности полученных данных автор использовал соответствующие статистические методы.

Результаты диссертационной работы автора доложены на отечественных и международных конференциях и отражены в 3 публикациях в изданиях, входящих в Web of Science/Scopus. Достоверность представленных в диссертации результатов, а также обоснованность выводов не вызывают сомнений.

Структура и общая характеристика диссертационной работы

Работа А.А. Зыковой построена в целом по классической схеме. Текст диссертации изложен на 119 страницах, включает в себя 46 рисунков и 7 таблиц. Список литературы включает 221 источник.

В разделе «Введение» автор обосновывает актуальность проблемы, формулирует основную цель работы и ставит конкретные задачи, обосновывает научную новизну работы, ее практическую значимость.

В главе «Обзор литературы» приведены современные представления о предмете и методологии исследования. Дано общее представление о вирусе гриппа, представлен обзор вакцинных платформ, используемых для разработки универсальных вакцин-кандидатов против гриппа. Описан принцип дизайна самособирающихся наночастиц, также их преимущества и недостатки при создании вакцин.

В главе «Материалы и методы» описаны генно-инженерные методы создания векторов для экспрессии генов в *E. coli* и в растениях, методы трансформации *E. coli* и агробактерий *Agrobacterium tumefaciens*, методы

выделения белков, очистки, характеристики наночастиц, а также методы оценки иммуногенности и протективности препаратов против гриппа на животных моделях (мыши). Все методы являются современными и адекватными поставленным задачам.

В главах «Результаты» и «Обсуждение» отражены все полученные результаты и проведен их анализ. На первом этапе диссертационной работы А.А. Зыковой в клетках *E. coli* был получен рекомбинантный белок, в составе самособирающегося пептида SAP со спиральным линкером Sp, присоединенным к С-концу SAP. Этот белок собирался *in vitro* в наноразмерные частицы, которые могут быть носителями целевых антигенов, представляющими на поверхности большое число копий антигена, что является важным фактором для индукции эффективного иммунного ответа.

Далее к SAP пептиду были присоединены консервативные антигены вируса гриппа А - М2е пептид или М2е пептид вместе с консервативной последовательностью второй субъединицы гемагглютинина (НА2). С помощью атомно-силовой и электронной микроскопии, а также методом динамического светорассеяния было показано образование обеими белками, содержащими SAP, сферических частиц размером от 20 до 50 нм. Проведенные в ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России эксперименты на мышах показали высокую иммуногенность и протективное действие полученных наночастиц. На следующем этапе работы для расширения спектра иммунного ответа в состав белков на основе SAP пептида, несущих М2е и НА2, были добавлены эпитопы из нуклеопротеина NP, а для дополнительной стимуляции Т-клеточного ответа был включен Т-хелперный эпитоп PADRE. Иммунизация мышей этими наночастицами индуцировала гуморальный иммунный ответ против М2е и вируса гриппа А/Н3N2 и приводила к образованию секретирующих цитокины антиген-специфичных CD4⁺ и CD8⁺ эффекторных Т-клеток памяти.

В заключительной части работы для получения наночастиц на основе SAP пептида, несущих консервативные антигены вируса гриппа, была

использована растительная система экспрессии. Для экспрессии рекомбинантных белков в *Nicotiana bethamiana* использовали самореплицирующийся вирусный вектор pEff. Были проведены эксперименты по получению в растениях белков на основе SAP, в которые были включены консервативные антигены вируса гриппа А. Из всех вариантов рекомбинантных белков только белок на основе SAP, содержащий M2e, экспрессировался на достаточном уровне для дальнейшего изучения. Иммунизация мышей «растительными» наночастицами индуцировала высокие уровни антител IgG против M2e, и обеспечивала защиту от заражения вирусом.

В обсуждении автором обобщены полученные результаты и обсуждаются дальнейшие перспективы работы. Переход к выводам обоснован логически. Полученные результаты подтверждают, что выбранный подход может быть эффективно использован для разработки рекомбинантных вакцин.

Диссертационная работа производит благоприятное впечатление и лишена серьезных недостатков. Вместе с тем, следует отметить ряд недочетов, допущенных автором при написании работы.

1. Название работы представляется не вполне точным. Выражение «конструирование наночастиц на основе рекомбинантных белков» подразумевает процесс проектирования и получения наночастиц из набора имеющихся рекомбинантных белков, которые могут использоваться в разных комбинациях и количественных соотношениях. При этом в работе речь идет о рекомбинантных белках, каждый из которых образует частицы сам по себе, путем самосборки, а конструирование происходит на стадии дизайна и получения генно-инженерных конструкций, кодирующих белки, включающие различные комбинации функциональных элементов, включая вирус-специфические эпитопы. Поэтому более корректным названием могло быть следующее: Конструирование рекомбинантных белков, включающих антигены вируса гриппа, и получение вакцинных наночастиц на их основе.

2. Для конструирования рекомбинантных белков, которые использовали для получения препаратов наночастиц, был взят полипептид длиной 55 аминокислотных остатков, являющийся фрагментом гемагглютинаина вируса гриппа (HA2). Обнаружено, что иммунизация такими частицами приводила к образованию антител к вирусу, тогда как использование аналогичного пептида, не включающего фрагмент HA2, такого эффекта не имело. Автор диссертации предполагает, что формирование вирус-специфически-антител обеспечивалось именно фрагментом HA2, однако этого не было показано напрямую. В диссертации не приводятся данных, показывающих, что иммунизация частицами на основе белков, содержащих фрагмент HA2, приводит к формированию антител к этому фрагменту. Такие данные могли бы быть важным дополнением к представленным результатам и служить основой для интерпретации данных о вирус-специфических антителах, образующихся после иммунизации рекомбинантными белками.

3. В работе не обсуждается стабильность наночастиц на основе белка-носителя SAP, включая время жизни в кровяном русле.

4. В диссертации показано, что иммунизация животных рекомбинантными частицами, включающими фрагмент HA2 и пептид M2e, вызывает иммунный ответ на белок-носитель, пептид SAP. В связи с этим возникает вопрос о доле антител к целевым антигенам, например M2e, в общем количестве антител, которые вырабатываются при иммунизации наночастицами. С другой стороны, неясно, насколько охарактеризован ответ иммунизируемого организма на белок-носитель SAP, и является ли его применение безопасным.

5. Остались без объяснения некоторые методические вопросы. В частности, не объясняется, почему в ряде экспериментов вакцинные наночастицы вводили животным интраназально, а в других случаях – подкожно.

6. Значительная часть раздела «Обсуждение результатов» является повторением изложения полученных результатов, что выглядит совершенно не оправданным. С другой стороны, в данном разделе явно не хватает сравнения белка-носителя SAP, использованного в диссертационной работе, с другими белковыми платформами для получения вакцинных наночастиц, такими как вирусы и вирусоподобные частицы. Сравнение разных подходов к конструированию таких частиц было бы важно с точки зрения понимания их сравнительных характеристик, включая простоту и технологичность получения вакцинных препаратов наночастиц, их стабильность, иммуногенность и протективность, а также безопасность применения.

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 кандидата наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Зыкова Анна Андреевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. молекулярная биология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, заведующий отделом биохимии вирусов растений
Соловьев Андрей Геннадьевич



28.11.2024

Контактные данные:

тел.: +7(495)939-31-98, e-mail: solovyev@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 1.5.10 – Вирусология (биологические науки)

Адрес места работы:

119992, г. Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 40

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Тел.: +7(495)939-31-98; e-mail: solovyev@belozersky.msu.ru

Подпись сотрудника НИИ физико-химической биологии имени А.Н.
Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова» Соловьева А.Г. удостоверяю: