

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента**

**на диссертацию Коваленко Ангелины Олеговны,**

**представленную на соискание ученой степени**

**кандидата биологических наук, на тему:**

**«Вакцинный кандидат против SARS-CoV-2 на основе вирусов растений:**

**создание и характеристика»**

**по специальности 1.5.10 – Вирусология**

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения по состоянию на осень 2023 г. в мире зарегистрировано более 770 миллионов случаев заболевания COVID-19, из которых почти 7 миллионов завершились смертельным исходом. В самом начале пандемии фокус разработки вакцинных препаратов против коронавируса SARS-CoV-2 – патогена, ответственного за вспышку новой инфекции – был смещен в сторону вакцин на основе аденовирусных векторов и мРНК-вакцин. В настоящий момент весомую часть дошедших до клинических испытаний и одобренных вакцин составляют рекомбинантные белковые вакцины.

### **Актуальность темы диссертационной работы**

Эволюция патогена SARS-CoV-2 побуждает исследователей уделять особое внимание поиску консервативных мишеней, включение которых в состав вакцинного препарата может помочь в борьбе с вновь появляющимися вариантами вируса. В связи с этим вопрос разработки эффективных специфических средств профилактики в отношении COVID-19 является весьма актуальным. Диссертационная работа Ангелины Олеговны Коваленко посвящена созданию и исследованию свойств кандидатной рекомбинантной белковой вакцины против SARS-CoV-2 и без сомнений обладает высокой практической значимостью.

Основным объектом диссертационного исследования А.О. Коваленко являются композиции, состоящие из коронавируса рекомбинантных белков и платформы-адьюванта – сферических частиц (СЧ) вируса табачной мозаики (ВТМ), которые формируются при структурной модификации ВТМ под воздействием высоких температур. В работе подробно изучены антигенные свойства рекомбинантных белков, а также иммуностимулирующие и протективные свойства вакцинных композиций.

### **Структура и содержание диссертационной работы**

Диссертационная работа А.О. Коваленко изложена на 159 страницах, содержит 30 рисунков и 10 таблиц и включает все необходимые разделы. Во «Введении» определены цели работы, аргументированы ее актуальность и новизна. Хотелось бы особенно отметить раздел «Обзор литературы», который состоит из трех частей и представляет собой полное и глубокое исследование темы коронавируса инфекций и существующих на данный момент рекомбинантных вакцин против них. Первая часть литературного обзора посвящена трем опасным бетакоронавирусам человека – SARS-CoV-2, SARS-CoV и MERS-CoV, в частности их таксономии, происхождению и особенностям структурной биологии. Отдельно рассмотрены строение и свойства шиповидного S-белка, обеспечивающего проникновение вирусных частиц в клетки хозяев. Во второй части автор описывает варианты вируса SARS-CoV-2 и содержащиеся в них значимые мутации, которые привели к распространению вируса и его уклонению от иммунного ответа. В третьей части обзора литературы представлена информация о различных типах рекомбинантных белковых вакцин против SARS-CoV-2, SARS-CoV и MERS-CoV. Автор привел данные и систематизировал информацию об эффективности и безопасности вакцин против COVID-19, находящихся на разных этапах клинических исследований, системах экспрессии, в которых были получены рекомбинантные белки для этих вакцин, и используемых в их составе адьювантах. Данные, представленные в литературном обзоре, имеют

важное значение с точки зрения обоснования выбора антигенных участков для дальнейшего создания вакцинного кандидата.

В разделе «Материалы и методы» представлено описание биохимических, вирусологических, молекулярно-биологических и иммунологических методов, использование которых соответствует поставленным автором экспериментальным задачам. Раздел написан основательно и подробно и отражает высокий научно-методический уровень работы.

Раздел «Результаты и обсуждение» можно условно разделить на две части. Первая часть посвящена получению и характеристике рекомбинантных антигенов, которые в дальнейшем были использованы для создания вакцинного кандидата против SARS-CoV-2. Для конструирования антигенов была использована последовательность уханьского варианта вируса. Антигены включают в свой состав участки S-белка – рецептор-связывающий домен S1-субъединицы и консервативные эпитопы S2-субъединицы. Выбор данных фрагментов обоснован тем, что к рецептор-связывающему домену (RBD) вырабатываются основные нейтрализующие антитела, а включение консервативных участков потенциально может помочь в разработке универсальной вакцины против различных коронавирусов. В качестве системы экспрессии рекомбинантных белков были выбраны клетки бактерий *Escherichia coli*. Полученные антигены (Co1, CoF и PE) реагировали с коммерческими антителами к S-белку вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2. Более того, антигены на основе RBD (Co1 и CoF) узнавались антителами в сыворотках крови пациентов с диагнозом COVID-19. На основании этого автор делает вывод о том, что антигены Co1 и CoF могут быть использованы не только в составе вакцин, но и в тест-системах для выявления антител после перенесенной коронавирусной инфекции.

Во второй части раздела «Результаты и обсуждение» А.О. Коваленко описывает процесс создания вакцинного кандидата на основе полученных рекомбинантных коронавирусных антигенов и адьюванта – СЧ ВТМ. Автором

был изучен иммуногенный потенциал вакцинных композиций (СЧ + 3АГ). Адьювант на основе структурно модифицированных вирусов растений впервые применен при создании вакцины против коронавируса. Продемонстрировано, что в сыворотках крови мышей, проиммунизированных композициями СЧ + 3АГ, титры общих IgG, специфичных к коронавиральным антигенам СоF и РЕ, значительно превышают таковые в сыворотках животных, проиммунизированных смесью трех антигенов без добавления СЧ. Это было показано и для антител каждого из отдельных изотипов (IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3). Данные результаты свидетельствуют о том, что СЧ в составе вакцинного кандидата обеспечивают сбалансированную стимуляцию иммунного ответа. Также автор исследует соотношение титров антител, вырабатываемых к коронавиральным антигенам и белку СЧ при иммунизации вакцинным кандидатом, и показывает, что титры антител к антигенам СоF и РЕ в 9 и 16 раз выше, чем к СЧ. Это свидетельствует о перспективности использования СЧ в качестве адьюванта в составе коронавиральной вакцины, что отмечает автор исследования.

Также в работе была проведена оценка протективности композиций СЧ + 3АГ и безопасности их применения на сирийских хомяках. Впервые показано, что сыворотки животных, вакцинированных композициями СЧ + 3АГ, обладают нейтрализующей активностью против SARS-CoV-2 на клетках Vero E6. Эффективность предложенных композиций СЧ + 3АГ была также проверена в опытах *in vivo* при заражении вакцинированных лабораторных животных вирусом SARS-CoV-2. Вакцинный кандидат MSU-CoV-5, содержащий коронавиральные антигены в дозе 60 мкг, показывал наличие протективного эффекта, выраженного в снижении степени тяжести воспаления легких у вакцинированных животных.

#### **Научная и практическая значимость результатов**

Полученные А.О. Коваленко результаты представляют большой интерес в области создания эффективных и безопасных кандидатных вакцин против

SARS-CoV-2. Все заключения автора, а также выводы, сделанные на основе полученных результатов, и выносимые на защиту положения в полной мере обоснованы, их достоверность базируется на представленном экспериментальном материале.

### **Полнота опубликованности положений и результатов диссертации**

Основные результаты работы отражены в 4 публикациях, опубликованных в рецензируемых изданиях, а автореферат отражает основное содержание диссертации.

### **Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе**

Хотелось бы особенно отметить стиль написания диссертации и выверенность текста на наличие опечаток и несогласованностей – во всём тексте диссертации мною была замечена всего одна опечатка. Но несмотря на столь скрупулёзный подход автора к работе и обсуждению результатов, у меня всё же возникли некоторые вопросы.

1. В работе были протестированы композиции СЧ ВТМ с тремя рекомбинантными коронавирусными антигенами (СЧ + ЗАГ) с помощью иммунофлуоресцентного анализа (пункт 3.5). Было показано, что происходит распознавание антигенов на поверхности СЧ антителами к S-белку SARS-CoV (Рис. 16А) и антителами к S-белку SARS-CoV-2 (Рис. 16В), однако не объясняется разница во флуоресцентном сигнале этих результатов. Для результата, полученного антителами к S-белку SARS-CoV (Рис. 16А) наблюдается более интенсивная флуоресценция на меньшем количестве СЧ по данным фазового контраста, чем для результата, полученного антителами к S-белку SARS-CoV-2 (Рис. 16В). Связан ли этот эффект с тем, что более маленький по молекулярной массе рекомбинантный антиген PE, который прекрасно детектируется антителами к S-белку SARS-CoV, что продемонстрировано автором на рисунке 10Б, более эффективно сорбируется/прикрепляется к СЧ ВТМ? Проверялись ли другие варианты

комбинации СЧ с рекомбинантными коронавирусами антигенами, например, СЧ + РЕ, СЧ + РЕ + СоF и так далее?

2. В пункте работы «3.6. Изучение иммуногенности композиций СЧ + ЗАГ» дана оценка эффективности иммуногенности как композиций СЧ + ЗАГ, так и трёх антигенов вместе, но без СЧ. Результаты показали, что иммунный ответ на антиген Со1 оказался значительно ниже, чем для двух других антигенов, при этом не было разницы и в наличии или отсутствии СЧ при иммунизации. Может ли данное явление быть следствием того, что антиген Со1 менее стабильный по сравнению с другими антигенами и попадая в организм животного не успевает вызвать иммунный ответ, и в том числе хуже остальных сорбируется/прикрепляется к СЧ ВТМ? Исследуется ли дополнительно эффективность сорбции/прикрепления антигенов к СЧ при создании вакцинных кандидатов?

3. Автор исследовал вируснейтрализующую активность сывороток крови иммунизированных животных с использованием нативного вируса SARS-CoV-2, а проводились ли или планируются подобные исследования с использованием нативного вируса SARS-CoV?

### **Заключение**

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:  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник лаборатории генетического контроля  
устойчивости к стрессам Института общей генетики им. Н.И. Вавилова  
Российской академии наук

Шешукова Екатерина Владимировна  
28.11.2023

Контактные данные:  
Тел.: +7(499) 135-42-28  
E-mail: [sheshukova@vigg.ru](mailto:sheshukova@vigg.ru)

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена  
диссертация: 03.01.03 – «молекулярная биология».

Адрес места работы:  
119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, д. 3  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей  
генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук  
Тел.: +7(499) 135-62-13, Факс: +7(499) 132-89-62  
E-mail: [iogen@vigg.ru](mailto:iogen@vigg.ru)

Подпись Шешуковой Екатерины Владимировны  
удостоверяю  
Руководитель отдела кадров Института общей генетики  
им. Н.И. Вавилова Российской академии наук,

Баркина Елена Юрьевна  
28.11.2023 г.

