

**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

Грипп является одним из наиболее клинически значимых респираторных заболеваний человека. Ежегодные эпидемии гриппа А и В вызывают сезонные подъемы заболеваемости среди сотен миллионов людей по всему миру. При этом грипп приводит к развитию целого ряда тяжелых осложнений, а также к смерти нескольких десятков тысяч человек ежегодно. Вирусы гриппа А также обладают беспрецедентным пандемическим потенциалом, что делает их одной из главных угроз глобальной биобезопасности. Первые вакцины от гриппа были разработаны еще в 1930х годах. Применение инактивированных и живых вакцин позволило снизить тяжесть заболевания гриппом и возникновения последующих опасных для жизни осложнений во всем мире, однако существующие вакцины не позволяют значимо ограничить ежегодное распространение вирусов гриппа. Главным недостатком применяемых вакцин против гриппа является то, что их необходимо применять ежегодно, так как традиционные подходы к вакцинации не обеспечивает длительную защиту от инфекции. Кроме того, состав вакцинных компонентов обновляется ежегодно для северного и южного полушарий по рекомендациям ВОЗ, основанным на данных наблюдения за генетической и антигенной изменчивостью циркулирующих вирусов. К сожалению, рекомендации не всегда соответствуют реально циркулирующим вирусам в момент вакцинации, так как технологический цикл изготовления вакцины занимает около полугода. Такое несоответствие может приводить к снижению эффективности вакцин от гриппа по ряду компонентов. Одной из важнейших задач в области борьбы с гриппом,

декларируемых ВОЗ, является совершенствование вакцин, которые должны быть более универсальными с точки зрения защиты от разных дрейф-вариантов вируса гриппа, а также обеспечивать более длительную и эффективную защиту. Решение этой задачи невозможно без создания новых типов вакцин с использованием последних достижений вирусологии, генной инженерии и молекулярной иммунологии. Именно этой актуальной, перспективной и востребованной теме посвящена диссертация А.А. Зыковой.

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

В работе были созданы оригинальные химерные гены, на основе которых в бактериальной системе экспрессии получены рекомбинантные белки, состоящие из самособирающегося пептида SAP, содержащего консервативные антигены вируса гриппа А (пептид M2e, фрагмент второй субъединицы гемагглютинаина HA2 и эпитопы нуклеопротеина NP). Полученные белки после рефолдинга *in vitro* образуют вирусоподобные наночастицы, обладающие иммуногенностью и протективностью на летальной гриппозной инфекции мышей. Было продемонстрировано, что иммунизация мышей наночастицами на основе M2e и фрагмента HA2, индуцировала сильный антительный ответ против M2e и вируса гриппа, а также Т-клеточный ответ. Модификация исходной конструкции в результате добавления в нее эпитопов нуклеопротеина и универсального Т-хелперного эпитопа PADRE способствовало усилению образования антиген-специфичных многофункциональных CD4⁺ и CD8⁺ эффекторных Т-клеток памяти, секретирующих цитокины. Кроме того, вирусоподобные наночастицы на основе пептида SAP, несущего M2e пептид вируса гриппа были получены в растительной системе экспрессии. Иммунизация мышей этими наночастицами индуцирует высокие уровни M2e-специфических антител и обеспечивает защиту от летальной гриппозной инфекции. Используемые в работе подходы к созданию вирусоподобных частиц на

основе SAP, универсальных эпитопов трех белков вируса гриппа и PADRE являются оригинальными.

Практическая значимость работы заключается в безусловной возможности использования разработанных рекомбинантных вирусоподобных частиц для создания универсальных (в отношении вируса гриппа А) гриппозных вакцин, так как они в ходе испытаний на лабораторных животных показали высокую иммуногенность и протективность в отношении модельных штаммов вирусов гриппа А подтипов H1N1 и H3N2.

Результаты получены с использованием современных методов, молекулярной биологии, геной инженерии, вирусологии и иммунологии. Для оценки достоверности полученных данных автором применены адекватные статистические модели. Обоснованность и достоверность выдвигаемых на защиту положений не вызывает сомнений.

Достоверность полученных результатов подтверждается 3 публикациями в высокорейтинговых международных журналах и выступлениями на 6 конференциях.

Структура и общая характеристика диссертационной работы

Материалы диссертации А.А. Зыковой изложены на 119 страницах машинописного текста и включают 46 рисунков и 7 таблиц. Диссертация построена по классической схеме и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение» и «Выводы». Список публикаций по теме диссертации содержит 221 источник.

В разделе «Введение» определена актуальность темы исследования, обозначены научная новизна и практическая значимость работы.

В главе «Обзор литературы» представлены общие сведения о вирусе гриппа, методах создания противогриппозных вакцин, используемых подходах для разработки универсальных вакцин против гриппа, а также

применении самособирающихся пептидов SAP в качестве носителей антигенов и основы для создания вакцинных наночастиц. Представленные в обзоре литературы сведения необходимы и достаточны для понимания сути диссертационной работы.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны методы получения генно-инженерных конструкций, методы трансформации бактериальных клеток и растений, методы экспрессии, выделения, очистки и характеристики рекомбинантных вакцинных белков, а также методы оценки иммуногенности и протективности вакцинных белков против гриппа *in vivo*. Все методы, в том числе и статистические, являются современными и адекватными поставленным задачам.

Глава «Результаты» состоит из двух частей. Первая часть посвящена получению наночастиц на основе самособирающегося пептида SAP, несущих консервативные антигены вируса гриппа, в бактериальной системе экспрессии. Все полученные наночастицы были охарактеризованы методами помощью атомно-силовой и электронной микроскопии, а также динамического светорассеяния. Первый вариант наночастиц на основе SAP содержал консервативные M2e пептид и последовательность второй субъединицы гемагглютинина HA2. Второй вариант частиц дополнительно содержал консервативные последовательности нуклеопротеина NP, а также Т-хелперный эпитоп PADRE. Включение дополнительного невирусного эпитопа представляется важным, так как он позволяет усиливать активацию Т-клеточного звена иммунного ответа. Хорошо известно, что рекомбинантные белковые вакцины хорошо стимулируют образование антител, однако Т-клеточный ответ является относительно слабым. Иммуногенность и протективность полученных препаратов была подробно изучена в экспериментах *in vivo*. Вторая часть работы посвящена получению наночастиц на основе самособирающегося пептида SAP, несущих консервативные антигены вируса гриппа, с использованием растительной системы экспрессии. Был получен вакцинный белок 19S-SAP-Sp-4M2eh, для

которого была показана иммуногенность и протективность на животной модели гриппозной инфекции.

В разделах «Обсуждение» и «Заключение» автором обобщены полученные результаты и обсуждаются перспективы дальнейшего развития как самой технологии получения вирусоподобных вакцинных частиц на основе SAP, так и полученных конкретных рекомбинантных вакцинных белков. Переход к выводам логически обоснован. Полученные в диссертационном исследовании результаты подтверждают принципиальную возможность использования выбранного подхода для создания рекомбинантных вакцин против нескольких подтипов вируса гриппа А.

Положения, выносимые на защиту, и выводы полностью соответствуют поставленным задачам и полученным данным. Автореферат соответствует содержанию и выводам диссертации, оформлен в традиционном стиле и соответствует установленным требованиям Диссертационного совета.

Замечания и вопросы

1. В работе приведены данные по оценке Т-клеточного ответа при вакцинации несколькими вариантами вакцинных вирусоподобных частиц. Одной из важных идей работы является введение эпитопа PADRE для стимуляции Т-клеточного ответа, уровень которого для рекомбинантных белковых вакцин является, как правило, более низким по сравнению с живыми, векторными или РНК вакцинами. Однако, автор не приводит прямого сравнения (в одном эксперименте) вакцинных белков, содержащих и не содержащих PADRE.
2. При оценке протективности вакцины на летальной модели инфекции некорректно подобрана доза заражения вирусом A/PR/8/34 (H1N1), так как в контрольной группе все животные умерли к 9 дню (рис. 26). При этом дозы заражения отличается для двух вирусов (10LD₅₀ для A/Aichi/2/68 (H3N2) и 4LD₅₀ для A/PR/8/34 (H1N1)), и для вируса

A/PR/8/34 (H1N1) она даже ниже. Эта разница подтверждается и данными по вирусной нагрузке (табл. 6).

3. Оценку вакцинного белка, полученного в растительной системе экспрессии, проводили только по уровню антител в сыворотках и в БАЛ и выживаемости и изменению массы тела инфицированных животных. К сожалению, в работе нет данных прямого сравнения аналогичных вакцинных белков, полученных в бактериальных клетках и растениях.
4. Для проверки иммуногенности белков 19s-SAP-Sp-4M2eh, 19s-SAP-Sp-2HA2-4M2eh, 19s-Sp-4M2eh, 19s-Sp-2HA2-4M2eh животных иммунизировали интраназально. Для проверки иммуногенности белков 19S-PADRE-NP335-NP255-SAP-Sp-2HA2-4M2eh и 19S-PADRE-NP335-NP255-Sp-2HA2-4M2eh, а также полученного в растениях белка 19S-SAP-Sp-4M2eh животных иммунизировали трехкратно подкожно с адьювантом. Почему были выбраны разные способы иммунизации?
5. К сожалению, автор ни в одном эксперименте не использовала инактивированную вакцину в качестве препарата сравнения. На мой взгляд, такие данные позволили бы ответить на вопрос о реальной эффективности разрабатываемых вакцин и перспективах их дальнейшего практического внедрения.

Значимых замечаний к работе нет. Хотелось бы увидеть больше данных по сравнению разных типов вакцинных белков между собой. Однако, понимая трудоёмкость таких исследований, это является пожеланием к дальнейшему развитию работы, а не замечанием.

Заключение

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Указанные в отзыве замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. 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, на соискание ученой степени доктора 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, доцент, профессор РАН, директор Института биомедицинских систем и биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

ВАСИН Андрей Владимирович



27.11.2024

Контактные данные:

vasin_av@spbstu.ru, +7 (962) 715-95-15

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.04 – Биохимия (биологические науки)

Адрес места работы:

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая улица, 29
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Институт биомедицинских систем и биотехнологий.

Тел.: +7 (812) 290-95-00; e-mail: ibsib@spbstu.ru

Подпись сотрудника института биомедицинских систем и биотехнологий ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого» Васина А.В. удостоверяю:

