

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Грановского Дмитрия Львовича на тему:
«Создание и характеристика кандидатной вакцины против сибирской
язвы на основе структурно модифицированных вирусов растений»
по специальности 1.5.10 – Вирусология**

В работе Дмитрия Львовича Грановского описано создание вакцинного кандидата против сибирской язвы на основе рекомбинантного модифицированного протективного антигена *Bacillus anthracis*, с использованием в виде стабилизатора и адъюванта сферических частиц (СЧ), полученных при термической обработке вируса табачной мозаики (ВТМ). Сибирская язва – тяжёлое инфекционное заболевание, которое представляет серьёзную опасность по всему земному шару и в особенности – в районах вечной мерзлоты. Возбудителем заболевания является бактерия *Bacillus anthracis*. Вакцинация – наиболее эффективный метод профилактики сибирской язвы, при этом современные лицензированные вакцинные препараты имеют ряд недостатков: невозможность использования одновременно с терапией антибиотиками, низкая иммуногенность, высокая реактогенность и изменение антигенных свойств при хранении. Это определяет актуальность разработки новой, эффективной вакцины против сибирской язвы.

Диссертация Д. Л. Грановского построена по стандартному плану и изложена на 159 страницах. Текст работы содержит 4 таблицы, 25 рисунков и 8 приложений, раздел «Библиография» содержит 188 источников. «Введение» раскрывает основную информацию о работе, в нём представлены актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования, указан личный вклад автора, а также приведены положения, выносимые на защиту.

«Обзор литературы» главным образом посвящен общей характеристике, антигенным свойствам и стабильности протективного антигена *Bacillus anthracis* (РА) – ключевого белка, используемого в вакцинных препаратах

против сибирской язвы, а также современным стратегиям разработки рекомбинантных вакцин против данного заболевания. Подробно и структурированно описаны различные варианты используемых антигенов и платформ-носителей, а также подходы к решению одной из главных проблем, связанных с вакцинами против сибирской язвы – низкой стабильности РА. Помимо этого, «Обзор литературы» содержит характеристику заболевания, сведения об эпидемиологической обстановке в последние годы, информацию о бактерии *B. anthracis* и обсуждение животных моделей, используемых в исследованиях эффективности вакцин против сибирской язвы.

В разделе «Материалы и методы» приведено исчерпывающее описание использованных методик и реактивов. В работе использован широкий спектр методов молекулярной биологии, иммунологии и биохимии, в частности, электрофоретический анализ белков и нуклеиновых кислот, вестерн-блот анализ, непрямой твердофазный ИФА, работа с бактериальными культурами, получение генно-инженерных конструкций, накопление и очистка рекомбинантных белков, а также методы работы с животными. Описание методик обеспечивает полную воспроизводимость исследования Д. Л. Грановского.

В разделе «Результаты и обсуждение» представлены результаты проведённых экспериментов: получение модифицированных рекомбинантных антигенов, изучение их стабильности, оценка иммуногенности и протективности вакцинных препаратов. Получен рекомбинантный полноразмерный протективный антиген (РА) *Bacillus anthracis* (rPA83m), в последовательность которого были внесены стабилизирующие замены: отредактированы сайты расщепления фурином и химотрипсином и ряд аминокислотных остатков Asn, подверженных спонтанному дезаминированию, заменены на глутамин. Показано, что rPA83m взаимодействует с нейтразующими антителами к РА, а также имеет более высокую стабильность, чем рекомбинантный РА. Продемонстрировано, что rPA83m способен адсорбироваться на поверхности СЧ ВТМ с сохранением

антигенных свойств. Комбинация двух подходов: внесение замен в последовательность рекомбинантного РА и использование СЧ ВТМ в качестве платформы-носителя, – позволила добиться высокой стабильности полученного вакцинного кандидата.

Исследована иммуногенность и протективность полученного препарата в сравнении с препаратом на основе гидроксида алюминия – стандартного адъюванта, применяемого в ряде лицензированных вакцин. Иммунизация вакцинным кандидатом rPA83m+СЧ ВТМ обеспечила стопроцентную протективность на морских свинках при заражении полностью вирулентным штаммом *B. anthracis* 81/1. При этом в группе, иммунизированной rPA83m в комбинации с гидроксидом алюминия, в результате заражения остались в живых только 30% морских свинок. Искусственное “состаривание” препарата не оказало значимого негативного влияния на его протективные свойства.

В качестве вакцинного кандидата против сибирской язвы также была предложена композиция с двумя двухдоменными антигенами: rPA(1+2)m (домены I и II РА) и rPA(3+4)m (домены III и IV РА), - в последовательности которых были внесены все аминокислотные замены, использованные при дизайне rPA83m. Использование более коротких фрагментов может удешевить и ускорить производство вакцины. Продемонстрирована одновременная адсорбция обоих белков на поверхности СЧ ВТМ, а также стабилизация каждого антигена в присутствии СЧ.

Таким образом, в работе Дмитрия Львовича впервые был получен вакцинный кандидат против сибирской язвы с высоким уровнем стабильности, содержащий модифицированный полноразмерный рекомбинантный РА и структурно модифицированные частицы вируса растений в качестве платформы-стабилизатора, который обеспечил формирование у морских свинок протективного иммунного ответа, достаточного для полной защиты от инфекции *B. anthracis*.

Выводы, сделанные автором, а также положения, выносимые на защиту, соответствуют поставленной цели и задачам работы, полностью обоснованы и

подкреплены результатами проведённых экспериментов. Полученные результаты подвергались всестороннему статистическому анализу с использованием корректных статистических критериев.

По результатам, полученным в диссертационном исследовании Д. Л. Грановского, было опубликовано 6 работ в рецензируемых высокорейтинговых журналах. Помимо этого, результаты данной работы были представлены на 9 конференциях. Также по теме работы получено 2 патента РФ. Автореферат содержит 25 страниц и корректно отражает содержание диссертационной работы.

Несмотря на перечисленные достоинства диссертационной работы Дмитрия Львовича Грановского, при её прочтении возникли следующие вопросы:

1) Каким образом в экспериментах по изучению стабильности rPA83m в индивидуальной форме и в композиции с СЧ ВТМ в различных температурных условиях в течение длительного времени предотвращали контаминацию образцов бактериями? Также в работе не отражено, в каком буфере проводили инкубацию в этих экспериментах.

2) На Рисунке 17В при сравнении иммуногенности интактного и инкубированного препаратов rPA83m+Al(OH)₃ в случае инкубированного препарата явно наблюдается увеличение разброса в титрах IgG к rPA83m. Как автор работы может прокомментировать данное явление? Наблюдалась ли аналогичная картина в случае других препаратов на основе rPA83m?

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 Грановский Дмитрий Львович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – Вирусология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии вирусов ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)

Гамбарян Александра Сергеевна

12 мая 2025

Контактные данные:

тел.: 8-985-136-34-86, e-mail: al.gambaryan@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.00.06 Вирусология

Адрес места работы:

108819, город Москва, внутренний территориальный городской муниципальный округ Филимонковский, посёлок Института полиомиелита, дом 8, корпус 1

Тел.: +7(495)841-90-02; e-mail: gambaryan_as@chumakovs.su

Подпись Гамбарян Александры Сергеевны
удостоверяю

Начальник отдела кадров ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита),



Симакова А. И.

12 мая 2025