

**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**

Создание вакцин нового поколения против инфекционных патогенов, вызывающих заболевания человека и животных, основанных на современных достижениях молекулярной биологии, вирусологии, микробиологии, нанобиотехнологии и иммунологии является и впредь будет являться важным направлением медицины и ветеринарии. Вакцинные препараты должны сочетать в себе такие свойства как высокая иммуногенность, низкая реактогенность, высокая протективность (способность вызвать в организме стойкий продолжительный иммунитет), стабильность при хранении.

Диссертационная работа Грановского Дмитрия Львовича посвящена разработке нового варианта вакцины против сибирской язвы, опасного инфекционного заболевания, вызываемого бактериями *Bacillus anthracis*, вспышки которого наблюдаются по всему миру ежегодно как у человека, так и у сельскохозяйственных животных, более того, возбудитель которого представляет угрозу как опасное биологическое оружие. Существующие в настоящее время вакцины против сибирской язвы имеют целый ряд недостатков, что стимулирует исследования по их совершенствованию. Перспективным направлением является разработка субъединичных вакцин с использованием протективного антигена (РА) *B. anthracis* как основного компонента вакцины. Основной проблемой использования РА является низкая стабильность этого антигена. Исследования по повышению стабильности РА и подбору оптимальных адъювантов и носителей для этого белка для создания стабильной и эффективной вакцины продолжаются. Диссертационная работа Грановского Дмитрия Львовича, в которой создан и охарактеризован вакцинный кандидат на основе рекомбинантного модифицированного протективного антигена бактерии *B. anthracis* и стабилизирующей платформы в виде структурно модифицированных частиц вируса табачной мозаики, представляется весьма успешным и перспективным вкладом в решение данной проблемы. Актуальность исследования, проведенного Д. Л. Грановским, не вызывает сомнений.

Структура диссертации традиционна. Диссертация содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение»,

«Заключение» и «Библиография». «Библиография» содержит 188 источников. Работа Д. Л. Грановского изложена на 159 страницах, содержит 4 таблицы, 25 рисунков и 8 приложений.

В разделе «Введение» обоснована актуальность выбранной темы, четко определены цели и задачи исследования, изложены ее научная новизна, приведены основные положения, выносимые на защиту, указаны результаты апробации, количество публикаций по теме диссертационного исследования и личный вклад автора.

«Обзор литературы», как и вся работа, написан хорошим языком. Первая часть обзора содержит сведения об эпидемиологии и клинической картине сибирской язвы, характеристику *B. anthracis*, а также информацию о строении, свойствах и функциях трёх компонентов токсина сибирской язвы, в особенности, ее протективного антигена (РА). В частности, подробно описаны причины нестабильности РА и ключевые нейтрализующие эпитопы в составе данного белка. Вторая и основная часть «Обзора литературы» посвящена характеристике лицензированных вакцин против сибирской язвы и современным направлениям исследований в данной области. Значительная часть раздела отведена подробному описанию подходов, применяемых при разработке вакцин против сибирской язвы. Рассмотрены работы по созданию векторных и субъединичных вакцин, а также ДНК-вакцин. Отдельное внимание уделено анализу стратегий, используемых при создании субъединичных препаратов на основе различных белков и поверхностных молекул *B. anthracis*, в том числе рассмотрены варианты модификации РА в составе таких вакцин и возможные платформы-носители, стабилизаторы и адъюванты для рекомбинантного РА. В заключительной части приведён обзор лабораторных животных, используемых в исследованиях эффективности вакцин против сибирской язвы. В целом, обзор литературы выстроен логично, материал изложен хорошим литературным языком и логично подводит к обоснованию выбора объекта исследования для разработки вакцины против сибирской язвы, а именно, рекомбинантного РА со стабилизирующими аминокислотными заменами и стратегии для его стабилизации с применением сферических частиц (СЧ), полученных при нагревании вируса табачной мозаики (ВТМ).

Раздел «Материалы и методы» содержит описание молекулярно-биологических, биохимических и вирусологических методов, методов работы с лабораторными животными, а также методов генной инженерии и микроскопии, использование которых соответствует поставленным в настоящей работе экспериментальным задачам. Данный раздел содержит исчерпывающую информацию, позволяющую воспроизвести все проведённые в работе эксперименты. Знакомство с этим разделом свидетельствует о высоком методическом уровне работы и высокой экспериментальной квалификации автора.

Результаты диссертационного исследования и их интерпретация автором изложены в разделе «Результаты и обсуждение». В работе получен белок гРА83m – модифицированный полноразмерный рекомбинантный протективный антиген сибирской язвы с заменами аминокислотных остатков в сайтах расщепления фурином и химотрипсином, а также с заменами подверженных дезаминированию остатков аспарагина на глутамин. Показано, что полученный белок более стабилен, чем немодифицированный вариант рекомбинантного РА (гРА). Показана возможность адсорбции этого достаточно высокомолекулярного белка гРА83m с мол. весом 83 кДа на поверхности СЧ ВТМ и значительное увеличение его стабильности в присутствии сферических частиц при различных температурных условиях (среди которых использованы и достаточно жесткие – длительная инкубация при 25 °С и 37 °С). Следует отметить, что одновременная модификация сайтов протеолиза и дезаминирования в составе РА и использование СЧ на основе вируса растений в качестве платформы-носителя и стабилизатора для бактериального антигена впервые применены в настоящем исследовании. Сочетание этих двух подходов к стабилизации РА, предложенные автором, позволяет решить проблему низкой стабильности данного белка – ключевую проблему при разработке субъединичных вакцин против сибирской язвы.

Эффективность полученного вакцинного кандидата исследована на морских свинках. В исследовании подтверждена иммуногенность препарата гРА83m+СЧ ВТМ, более того, показано, что данная композиция иммуногенна даже после инкубации при +37 °С в течение 27 дней. Протективность вакцинного кандидата исследовалась путём заражения иммунизированных морских свинок полностью вирулентным штаммом сибирской язвы. Все животные, иммунизированные гРА83m+СЧ ВТМ, пережили заражение, в отличие от контрольных групп. Аналогично данным, полученным в экспериментах по изучению иммуногенности, инкубация при +37 °С в течение 27 дней не привела к снижению протективности композиции гРА83m-СЧ ВТМ. Исходя из этого было сделано предположение, что полученная вакцина будет сохранять свои свойства при длительном хранении в менее жестких условиях. Полученные результаты указывают на высокую эффективность разработанного вакцинного препарата. Одно из предположений, которые делает автор на основе экспериментов с животными, состоит в том, что увеличение стабильности антигена при сохранении его антигенных свойств в составе вакцинной композиции позволяет снижать его дозу при иммунизации. Это важный параметр, который требует дальнейшего изучения.

В работе предложен альтернативный вариант вакцинного препарата, содержащий не полноразмерный рекомбинантный РА, а два его двухдоменных фрагмента,

стабилизированных с помощью соответствующих аминокислотных замен (rPA(1+2)m и rPA(3+4)m). Два указанных белка были получены и охарактеризованы. Продемонстрирована их стабилизация с помощью СЧ ВТМ, а также возможность одновременной адсорбции обоих антигенов на поверхности сферических частиц.

Таким образом, результаты, представленные в диссертации Д. Л. Грановского, вносят большой вклад в область разработки и исследования субъединичных вакцин против сибирской язвы. Представленную работу можно расценивать как несомненный успех автора и перспективную для внедрения в будущем разработанного вакцинного кандидата в качестве эффективной вакцины. Все результаты экспериментов получены на современном оборудовании, подробно документированы и подвергнуты статистической обработке. Достоверность, полученных в работе данных не вызывает сомнений. Все заключения и предположения автора в полной мере обоснованы и подкреплены экспериментальными данными. Выводы основаны на полученных результатах, соответствуют поставленным задачам исследования и обладают новизной. Автореферат полностью отражает основное содержание диссертации. Результаты диссертационной работы опубликованы в 6 статьях в рецензируемых изданиях и доложены на значительном числе всероссийских и международных конференций. Также по результатам исследования получены два патента.

Замечания к диссертационной работе Д.Л. Грановского: К «Обзору литературы»: 1) хотелось бы иметь более расширенные данные по жизненному циклу бактерий *B. anthracis*; 2) во второй части обзора, посвященной характеристике вакцин и вакцинных кандидатов против сибирской язвы, не хватает таблиц, в которых описанный автором материал был бы дополнительно структурирован по варианту вакцин, их использованию, достоинствам и недостаткам. Таковую же таблицу можно было бы дать и по используемым адъювантам и стабилизаторам. К разделу «Результаты и обсуждение»: 1) С чем связано такое значительное количество дополнительных полос в препаратах очищенных рекомбинантных белков. Стандартная процедура очистки рекомбинантных белков на Ni-NTA агарозе модифицировалась, как описано в «Материалах и Методах», связано ли это с посттрансляционной деградацией белка? Все эти примеси имеют His6-хвост? 2) Нигде не указан размер СЧ ВТМ, использованный в опытах. Это важный параметр или нет? На микрофотографиях видно, что происходит агрегация СЧ с сорбированным антигеном. Насколько этот эффект существенен для вакцинного препарата?

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, профессор, ведущий научный сотрудник отдела биохимии вирусов растений, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского

Калинина Наталья Олеговна

19.05.2025

Контактные данные:

тел.: +7(916)-310-77-06, e-mail: kalinina@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.03 молекулярная биология (биологические науки)

Адрес места работы:

119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, НИИФХБ МГУ

Тел.: +7(916)-310-77-06; e-mail: kalinina@belozersky.msu.ru



Подпись Калининой Натальи Олеговны
удостоверяю

