

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

Актуальность темы исследования

В диссертационной работе рассматривается актуальная проблема, связанная с сибирской язвой – опасным инфекционным заболеванием, возбудителем которого является грамположительная спорообразующая бактерия *Bacillus anthracis*. Несмотря на достижения современной медицины и ветеринарии, случаи заражения людей и сельскохозяйственных животных данной инфекцией продолжают фиксироваться во всем мире с ежегодной периодичностью. Следовательно, разработка новых и высокоэффективных методов профилактики и лечения данного заболевания представляет собой важную и актуальную научно-практическую задачу.

Лечение и профилактика сибирской язвы основываются на комплексной стратегии, сочетающей антибактериальную терапию, симптоматическое лечение, а также профилактику заболевания. Профилактические мероприятия включают как плановую, так и экстренную вакцинацию. Плановой иммунизации подлежат лица из групп профессионального риска: ветеринарные работники, сотрудники лабораторий, работающие с возбудителем, а также военнослужащие. Экстренная профилактика, применяемая после подтвержденного контакта с возбудителем, предполагает комбинацию антибиотиков с введением вакцины.

В настоящее время для профилактики сибирской язвы зарегистрированы два типа вакцин: живые аттенуированные препараты и вакцины, созданные на основе бесклеточных фильтратов культур *B. anthracis*. Живые аттенуированные вакцины разрешены к применению в Российской Федерации и Китайской Народной Республике. Существенным ограничением их использования является несовместимость с антибиотикотерапией, что снижает их практическую ценность в условиях экстренной профилактики. Альтернативу составляют бесклеточные вакцины, адсорбированные на гидроксиде алюминия. К числу таких препаратов относятся BioThrax™ и CYPHENDUSTM (США); AVP (Anthrax Vaccine Precipitated) (Великобритания). Эти вакцины получили широкое международное признание и активно используются в практике здравоохранения. Их преимущество заключается в возможности сочетания с антибактериальной терапией, что особенно важно при постэкспозиционной профилактике.

Ключевым иммуногенным компонентом современных вакцин против сибирской язвы выступает протективный антиген (РА) – структурный элемент патогенного токсина *B. anthracis*. Важно отметить, что изолированный РА не представляет опасности для человека, при этом индуцируемые им антитела обеспечивают надежную иммунную защиту. Тем не

менее, актуальные вакцинные препараты обладают рядом существенных недостатков: наличие значительного количества балластных белков бактериального происхождения, обуславливающих высокую реактогенность; низкая стабильность РА, особенно при адсорбции на гидроксиде алюминия, что приводит к ускоренной деградации антигена и изменению его иммуногенных характеристик.

Указанные ограничения подчеркивают острую потребность в разработке новых поколений вакцин, отличающихся повышенной безопасностью и стабильностью антигенного компонента.

Современные подходы к разработке вакцин против сибирской язвы преимущественно ориентированы на использование рекомбинантного протективного антигена (rPA) в качестве ключевого компонента. Однако субъединичные вакцины на основе rPA сталкиваются с серьезной проблемой низкой стабильности антигена, обусловленной протеолитической деградацией и спонтанным дезаминированием аспарагиновых остатков. В связи с этим приоритетными направлениями исследований в данной области являются создание стабильной rPA-содержащей вакцины, оптимизация методов стабилизации rPA и разработка эффективной платформы-носителя.

Успешное решение этих задач позволит усовершенствовать систему профилактики сибирской язвы, обеспечив надежную защиту как населения, так и сельскохозяйственных животных от этого социально-значимого заболевания.

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

В исследовании Грановского Д.Л. были разработаны и детально изучены новые рекомбинантные антигены, созданные на основе модифицированного протективного антигена *B. anthracis*. Уникальность работы заключается в комплексной модификации молекулы антигена, включающей одновременное изменение фурин- и химотрипсин-чувствительных участков и замену подверженных дезаминированию аспарагиновых остатков на глутамин.

В работе был создан инновационный вакцинный кандидат на основе комбинации модифицированного протективного антигена (rPA83m) со сферическими частицами вируса табачной мозаики (СЧ ВТМ). Созданная композиция обладает повышенной стабильностью (сохранение антигенных свойств при 37°C в течение 40 дней). Данный кандидат обеспечивал 100% защиту морских свинок от вирулентного штамма *B. anthracis* и сохранил протективные свойства после 27 дней "состаривания" при 37°C.

Также в работе были созданы два дополнительных рекомбинантных белка, включающих домены I и II РА или домены III и IV РА, соответственно. И была показана возможность одновременной иммобилизации двух разных антигенных доменов (rPA(1+2)m и rPA(3+4)m) на СЧ ВТМ, а также стабильность комбинированного препарата после инкубации в течение 40 дней при +37 °C.

Результаты данного исследования создают принципиально новые возможности для разработки термостабильных вакцинных препаратов против сибирской язвы с повышенной

эффективностью. Предложенная инновационная методика комбинирования бактериальных антигенов с вирусными частицами растительного происхождения представляет значительный интерес для вакцинологии в целом, так как может быть адаптирована для профилактики и других опасных инфекционных заболеваний.

Проведённые исследования демонстрируют высокую практическую значимость разработанных вакцинных композиций на основе rPA83m и двухдоменных антигенов rPA(1+2)m/rPA(3+4)m в комплексе с сферическими частицами вируса табачной мозаики (СЧ ВТМ) для профилактики сибирской язвы. Ключевым достижением стало создание стабильных препаратов, сохраняющих свои антигенные свойства даже в условиях повышенных температур, что решает проблему необходимости строгого соблюдения холодовой цепи при транспортировке и хранении. Это особенно актуально для регионов с жарким климатом и ограниченной инфраструктурой.

Принципиально важным преимуществом разработанных субъединичных рекомбинантных вакцин является их совместимость с антибиотикотерапией, что открывает новые возможности для экстренной профилактики во время вспышек заболевания. Данное свойство делает эти препараты универсальным инструментом как для медицинского применения у людей, так и для ветеринарного использования при массовой вакцинации сельскохозяйственных животных. Сочетание термостабильности, высокой иммуногенности и возможности комбинирования с антимикробной терапией позволяет рассматривать полученные композиции в качестве перспективного решения для борьбы с сибирской язвой в различных эпидемиологических условиях.

Результаты получены с использованием современных методов, молекулярной биологии, генной 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 6 публикациями в высокорейтинговых международных журналах и выступлениями на конференциях. Также по теме работы было получено 2 патента РФ.

Структура и общая характеристика диссертационной работы

Материалы диссертации Грановского Д.Л. изложены на 159 страницах машинописного текста и включают 25 рисунков, 4 таблицы и 8 приложений. Диссертация построена по классической схеме и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение» и «Выводы». Список публикаций по теме диссертации содержит 188 источников.

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

В главе «Обзор литературы» представлен аналитический обзор современных данных о сибирской язве как инфекционном заболевании. Проведена детальная характеристика этиологического агента - бактерии *B. anthracis*, включая ее морфологические и

патогенетические особенности. Особое внимание уделено структурно-функциональному анализу протективного антигена (РА) как ключевого компонента патогенности и основного кандидата для вакцинного дизайна.

В разделе, посвященном средствам специфической профилактики, систематизирована информация о современных и перспективных вакцинных препаратах против сибирской язвы. Детально рассмотрены различные типы адъювантных систем, применяемых для усиления иммуногенности вакцин, с анализом их преимуществ и ограничений. Представленная информация дает комплексное представление о текущем состоянии разработки профилактических средств против данного заболевания.

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

В главе «Результаты и обсуждение» отражены все полученные результаты и проведен их анализ.

На первом этапе диссертационной работы Грановского Д.Л. была проанализирована стабильность рекомбинантного полноразмерного протективного антигена. Было произведено искусственное «состаривание» rPA83 при +25 °С. Инкубация при +25 °С позволяет моделировать нарушение холодовой цепи при хранении и транспортировке вакцинного препарата.

В качестве носителя, адъюванта и стабилизатора для рекомбинантного РА был предложен подход, основанный на использовании сферических частиц, сформированных белком оболочки ВТМ. СЧ ВТМ представляют собой хорошо изученные соединения с доказанной безопасностью и адъювантными свойствами в отношении вирусных антигенов, таких как SARS-CoV-2, краснуха, бешенство и др. СЧ ВТМ характеризуются высокой адсорбционной способностью, что позволяет им эффективно связываться с белками-мишенями любого размера и структуры. В ходе выполнения работы была продемонстрирована стабилизация rPA83 с помощью СЧ ВТМ.

На следующем этапе для повышения стабильности протективного антигена был смоделирован и получен модифицированный полноразмерный протективный антиген сибирской язвы, rPA83m. Аминокислотная последовательность rPA83m содержала как замены в сайтах протеолиза, так и замены подверженных дезаминированию остатков аспарагина на глутамин. Оптимизированная версия rPA83m при экспрессии в *E. coli* продемонстрировала повышенный выход полноразмерного белка по сравнению с нативным вариантом.

На следующем этапе разработки вакцины применяли комбинацию модифицированного РА (rPA83m) с СЧ ВТМ. Исследования подтвердили, что бактериальный антиген эффективно адсорбируется на поверхности вирусных СЧ с сохранением своей антигенной специфичности.

Далее на модели ускоренного “состаривания” белка при +37 °С был продемонстрирован стабилизирующий эффект СЧ ВТМ на гРАm. Эксперимент проводился в течение 40 дней. Более продолжительный эксперимент, проводимый в течение 241 дня при +25 °С, также подтвердил стабилизацию целевого белка за счет СЧ ВТМ. При +4 °С модифицированный белок гРАm продемонстрировал свою стабильность в независимости от добавления СЧ ВТМ, что связывается авторам работы со свойствами самого белка.

Таким образом, оба подхода к стабилизации гРА83 – как введение стабилизирующих мутаций в белковую последовательность, так и применение СЧ ВТМ в качестве стабилизирующей платформы доказали свою результативность.

На следующем этапе диссертационной работы была оценена иммуногенность и протективное действие исследуемых рекомбинантных белков на морских свинках. Эксперименты на лабораторных животных выполнялись совместно с ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

Было установлено, что гРА83m проявляет иммуногенные свойства как в виде самостоятельного препарата, так и в комплексе с СЧ ВТМ. Иммуногенность препарата не падала после инкубации при 37 °С в течение 27 ней.

Для изучения протективного действия вакцинных препаратов иммунизированных животных заражали полностью вирулентным штаммом *B. anthracis* 81/1. Для заражения была выбрана доза 50 LD50 спор *B. anthracis* штамма 81/1, что составляет 2500 спор на животное. Спустя 20 дней после заражения наблюдалась низкая смертность животных в контрольных группах, поэтому было произведено повторное заражение в дозе 500 LD50.

Выживаемость животных в группах, иммунизированных препаратами свободного гРА83m или композиции гРА83m с СЧ ВТМ, была статистически значимо выше, чем в контрольных группах, однако данные варианты статистически значимо между собой не отличались.

На следующем этапе работы в качестве альтернативы полноразмерному модифицированному белку был предложен вариант, включающий два белка, первый из которых содержал домены I и II РА, а второй – домены III и IV РА. Была продемонстрирована стабильность этих белков, а также одновременная адсорбция полученных антигенов на поверхности СЧ ВТМ. Данных по иммуногенности и протективности данной композиции препарата не приводится.

Текст диссертации написан последовательно, структурированно и логично. Иллюстрации результатов приведены в высоком качестве. Текст диссертационной работы практически не содержит опечаток и неточностей.

Положения, выносимые на защиту, и выводы полностью соответствуют поставленным задачам и полученным данным.

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

1. Цель работы, а также название представляются не вполне точными (“Цель исследования заключалась в разработке, получении и характеристике стабильного

рекомбинантного субъединичного вакцинного кандидата против сибирской язвы на основе структурно модифицированных вирусов растений.”). Данная формулировка подразумевает, что основой препарата являются модифицированные вирусы растений. В работе основой являлся протективный антиген *B. anthracis*, в СЧ ВТМ выступали в качестве стабилизирующего агента.

2. В разделе «Материалы и методы» отсутствует информация о получении вируса табачной мозаики. В разделе 2.1 (стр. 62) представлена только информация о получении сферических частиц из ВТМ.
3. При получении в бактериальной системе экспрессии рекомбинантных белков rPA83m, rPA(3+4)m и rPA(1+2)m были определены оптимальные условия синтеза целевого продукта (+37 °C, 4 ч для rPA(3+4)m и rPA(1+2)m; +20 °C, 6 – 9 ч для rPA83m). По представленным результатам сложно сказать, как условия роста после индукции ИПТГ влияют на степень деградации как немодифицированного протективного антигена, так и модифицированных вариантов. Очистку рекомбинантных белков проводили в денатурирующих условиях с добавлением 6М гуанидин-HCl. Использование денатурирующих условий при очистке белка может быть связано с нерастворимостью белка, а также с необходимостью сохранения стабильности белка. Чем был обусловлен выбор денатурирующих условий при очистке белка остается неясным.
4. В работе не указано, к каким рекомбинантным белкам, нативному и/или модифицированному РА, была получена поликлональная мышиная сыворотка.
5. В экспериментах по определению иммуногенности препаратов на лабораторных животных (рис 17, стр. 111) обсуждается, что не было выявлено разницы между титрами антител к rPA83m, выработанными в ответ на иммунизацию rPA83m+Al(OH)₃ (медиана титра 1,22x10⁶) и любым из контрольных препаратов. По представленным данным препарат rPA83m+Al(OH)₃ статистически отличается от RBS и СЧ. При этом даже при неинкубированных препаратах добавление Al(OH)₃ негативно сказывается на иммуногенности, что статистически значимо.
6. В экспериментах по оценке протективности рекомбинантных вакцинных кандидатов на лабораторных животных в связи с низким уровнем смертности в контрольных группах спустя 20 дней после первого заражения пришлось провести второе заражение выживших особей. Для корректного проведения исследования необходимо предварительное тестирование вирулентного штамма на интактных морских свинках с целью установления минимальной летальной дозы

Заключительная часть работы посвящена созданию вакцинного кандидата, в котором полноразмерный модифицированный протективный антиген был заменен на два белка. Данные результаты демонстрируют задел для дальнейших исследований. Полученных экспериментальных данных по исследованию полноразмерного модифицированного антигена вполне достаточно для обоснования выводов диссертационной работы. Дополнительное включение заключительного раздела в данном

случае представляется излишним. Следует подчеркнуть, что данное замечание имеет исключительно пояснительный характер и не снижает научной ценности представленной работы.

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 1.5.10 – 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 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, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», ведущий научный сотрудник лаборатории систем молекулярного клонирования
Марданова Евгения Сергеевна

18.05.2025

Контактные данные:

mardanovaes@mail.ru, +7 (916) 615-26-02

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

1.5.3 – молекулярная биология (биологические науки)

Адрес места работы:

119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Тел: +7 (495) 954-52-83

Факс: +7 (495) 954-27-32

e-mail: info@fbras.ru

Подпись сотрудника Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» Мардановой Е.С. удостоверяю:

Ученый секретарь

кандидат биологических наук

Орловский А.Ф.