

Заключение диссертационного совета МГУ.015.4
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук
Решение диссертационного совета от «12» декабря 2024 г. №12

О присуждении Зыковой Анне Андреевне, гражданке РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Конструирование наночастиц на основе рекомбинантных белков, содержащих антигены вируса гриппа» по специальности 1.5.3. молекулярная биология принята к защите диссертационным советом 31 октября 2024 г., протокол № 10.

Соискатель, Зыкова Анна Андреевна 1994 года рождения, в 2018 году окончила ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по направлению 06.04.01 Биология (специальность «Вирусология»).

Соискатель работает младшим научным сотрудником лаборатории систем молекулярного клонирования Института Биотехнологии им. К.Г. Скрябина Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук».

Диссертация выполнена в лаборатории систем молекулярного клонирования Института Биотехнологии им. К.Г. Скрябина Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук».

Научный руководитель – кандидат биологических наук, **Куприянов Виктор Васильевич**, старший научный сотрудник лаборатории систем молекулярного клонирования Института Биотехнологии им. К.Г. Скрябина Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

Васин Андрей Владимирович

доктор биологических наук, доцент, профессор РАН, ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Институт биомедицинских систем и биотехнологий, директор института;

Соловьев Андрей Геннадьевич

доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-

химической биологии имени А.Н. Белозерского, заведующий отделом биохимии вирусов растений;

Тимофеева Татьяна Анатольевна

кандидат биологических наук, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского, руководитель лаборатории физиологии вирусов
дали положительные отзывы на диссертацию.

Выбор официальных оппонентов основывался на их компетентности в области изучения структуры вирусов, экспрессии рекомбинантных белков и разработки вакцинных препаратов, наличием научных статей по данной тематике, опубликованных в высокорейтинговых международных рецензируемых журналах.

Соискатель имеет 9 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 3 работы, из них 3 статьи, опубликованных, в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3. молекулярная биология.

Статьи в рецензируемых научных изданиях:

1. Zyкова A.A., Blokhina E.A., Stepanova L.A., Shuklina M.A., Tsybalova L.M., Kuprianov V.V., Ravin N.V. Nanoparticles based on artificial self-assembling peptide and displaying M2e peptide and stalk HA epitopes of influenza A virus induce potent humoral and T-cell responses and protect against the viral infection //Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2022. – Т. 39. – С. 102463. JIF 4,2. Доля участия 70%. 0.9 п. л.
2. Zyкова A.A., Blokhina E.A., Stepanova L.A., Shuklina M.A., Ozhereleva O.O., Tsybalova L.M., Kuprianov V.V., Ravin N.V. Nanoparticles Carrying Conserved Regions of Influenza A Hemagglutinin, Nucleoprotein, and M2 Protein Elicit a Strong Humoral and T Cell Immune Response and Protect Animals from Infection //Molecules. – 2023. – Т. 28. – №. 18. – С. 6441. JIF 4,2. Доля участия 60%. 1 п. л
3. Blokhina E.A., Mardanova E.S., Zyкова A.A., Stepanova L.A., Shuklina M.A., Tsybalova L.M., Ravin N.V. Plant-Produced Nanoparticles Based on Artificial Self-Assembling Peptide Bearing the Influenza M2e Epitope //Plants. – 2023. – Т. 12. – №. 11. – С. 2228. JIF 4,0. Доля участия 40%. 0.6 п. л.

Зыкова А.А. внесла решающий вклад в публикации по теме диссертации: личный вклад состоит в анализе научной литературы, планировании и проведении большинства экспериментов, обработке и анализе полученных данных, подготовке публикаций. Основные результаты, представленные в перечисленных работах, получены самим автором.

На диссертацию и автореферат поступило 3 дополнительных отзыва, все положительные.

Диссертационный совет отмечает, что представленная диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена важная научная проблема и изложены новые научно обоснованные решения в области разработки рекомбинантной гриппозной вакцины.

Значимость работы обусловлена возможностью использования разработанных рекомбинантных наночастиц для создания кандидатных противогриппозных вакцин, характеризующихся возможностью защиты от широкого спектра штаммов вируса гриппа. Более того, разработанные методы создания наночастиц-носителей целевых антигенов могут быть использованы для создания рекомбинантных вакцин против других актуальных патогенов человека и животных.

Сконструированы химерные гены и получены в клетках *E. coli* рекомбинантные белки на основе самособирающегося белка SAP, содержащие консервативные антигены вируса гриппа А: М2е пептид, фрагмент второй субъединицы гемагглютинина (НА2) и эпитопы нуклеопротеина. На первом этапе в клетках *E. coli* был продуцирован рекомбинантный белок SAP. Этот белок после рефолдинга *in vitro* собирался в наноразмерные частицы. Получены рекомбинантные белки на основе SAP, к которому был присоединен М2е пептид или М2е пептид вместе с НА2. Оба белка образовывали наночастицы размером 20 - 50 нм. Иммуногенность и протективное действие полученных рекомбинантных белков были изучены на лабораторных животных (мыши). Показано, что SAP частицы, несущие М2е и НА2, индуцируют гуморальный и Т-клеточный ответ, который способен защитить животных от гриппозной инфекции.

На следующем этапе работы для расширения спектра иммунного ответа в состав SAP белков с М2е и НА2 были добавлены эпитопы из нуклеопротеина NP, а также Т-хелперный эпитоп PADRE для дополнительной стимуляции Т-клеточного ответа. Полученный в клетках *E. coli* рекомбинантный белок формировал наночастицы размером 15-35 нм. Иммунизация мышей этими наночастицами индуцировала гуморальный иммунный ответ против М2е и вируса гриппа А/Н3N2, а также способствовала формированию антиген-специфичных CD4⁺ и CD8⁺ эффекторных Т-клеток памяти, секретирующих цитокины. Иммунизация наночастицами обеспечивала защиту мышей от заражения вирусом гриппа.

В заключительной части работы была изучена возможность получения в растительной системе экспрессии наночастиц на основе SAP. Для продукции рекомбинантных белков в растениях *Nicotiana bethamiana* применялся самореплицирующийся вирусный вектор рEff. Из всех вариантов рекомбинантных белков эффективно продуцировался только белок на основе SAP, содержащий М2е. Полученный

в растениях белок после рефолдинга собирался в наночастицы размером 15-30 нм. Иммунизация мышей этими наночастицами индуцировала иммунный ответ и обеспечивала защиту от заражения вирусом гриппа А.

Диссертация представляет собой самостоятельное законченное исследование, обладающее внутренним единством. Положения, выносимые на защиту, содержат новые научные результаты и свидетельствуют о личном вкладе автора в науку:

1. Полученные в бактериальной и растительной системе экспрессии рекомбинантные наночастицы на основе самособирающегося белка SAP могут быть использованы в качестве носителей эпитопов вируса гриппа.

2. SAP, к С-концу которого присоединен M2e пептид вируса гриппа А, образует наночастицы сферической формы, которые при иммунизации мышей индуцируют гуморальный иммунный ответ против M2e и обеспечивают защиту от летальной гриппозной инфекции.

3. SAP, к С-концу которого присоединены консервативный фрагмент гемагглютинаина HA2 и M2e пептид вируса гриппа А, образует наночастицы сферической формы. При иммунизации мышей препарат индуцирует гуморальный иммунный ответ против M2e и вируса гриппа А, образование M2e-специфичных многофункциональных CD4⁺ эффекторных Т-клеток памяти, и обеспечивает защиту от летальной гриппозной инфекции.

4. SAP, к N-концу которого присоединены эпитопы нуклеопротеина и универсальный Т-хелперный эпитоп PADRE, а к С-концу - консервативный фрагмент гемагглютинаина HA2 и M2e пептид вируса гриппа А, образует наночастицы сферической формы. При иммунизации мышей препарат индуцирует гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ против M2e и вируса гриппа А, и обеспечивает защиту от летальной гриппозной инфекции.

На заседании 12 декабря 2024 г. диссертационный совет принял решение присудить Зыковой А.А. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 6 докторов наук по специальности – молекулярная биология, участвовавших в заседании, из 17 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 14, против 0, недействительных бюллетеней 0.

Председатель

диссертационного совета, д.б.н., проф.

Карпова О.В.

Ученый секретарь

диссертационного совета, д.б.н.

Никитин Н.А.

12.12.2024 г.