

ОТЗЫВ

официального оппонента Исаковой-Сивак Ирины Николаевны
на диссертационную работу Пулькиной Анастасии Александровны на тему
«Оптимизация гриппозного вектора с модифицированным белком NS1 для
эффективной презентации антигенов респираторно-синцитиального вируса»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.10 – Вирусология

Актуальность темы выполненной работы

Разработка безопасных и эффективных вакцин против различных патогенов является приоритетной задачей мирового здравоохранения. На данный момент остается достаточно много патогенов, в отношении которых требуется проведение исследований и разработок новых вакцинных кандидатов, учитывая последние достижения в области изучения их патогенеза и механизмов иммунной защиты. В частности, для защиты наиболее уязвимых групп населения от респираторно-синцитиального вируса (РСВ) в настоящее время разрабатывается большое число вакцинных кандидатов с использованием различных вакцинных платформ. Векторные вакцины на основе гриппозного вектора делают возможным проведение сочетанной вакцинации против РСВ и гриппа – другого опасного инфекционного заболевания, ежегодные вспышки которого наносят существенный социально-экономический ущерб всем странам мира. В литературе описан ряд векторных вакцин на основе вируса гриппа, экспрессирующих иммуногенные фрагменты РСВ, однако ни один вариант пока не разрешен к клиническому применению. Соответственно, диссертационная работа, нацеленная на оптимизацию векторной платформы на основе вируса гриппа для эффективной доставки целевых антигенов РС вируса в клетки-мишени, является актуальным и своевременным исследованием.

Степень обоснованности основных научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

В диссертационной работе Пулькиной А.А. впервые проведено исследование локализации неструктурного белка 1 (NS1) вируса гриппа А, используя оригинальный сконструированный рекомбинантный вирус гриппа, экспрессирующий люциферазу NanoLuc с рамки считывания NS1 белка. Использование данного репортерного белка позволило показать, что NS1 белок может выходить во внеклеточное пространство, тем самым стимулируя выработку гуморального иммунного ответа как на сам NS1 белок, так и на слитый с ним трансген. Тем не менее, внеклеточная локализация трансгена была на 2-3 порядка ниже, чем внутриклеточная, что позволило автору сформулировать гипотезу о возможности усиления иммуногенности целевого антигена за счет повышения эффективности его секреции из зараженной химерным вирусом клетки. В настоящем исследовании впервые проведена оптимизация векторной системы на основе широко изученного вируса гриппа А/PR/8/1934 (H1N1), аттенуированного за счет укорочения рамки считывания NS1 белка до 124 аминокислот. Представлены несколько стратегий встраивания целевого антигена РСВ в геном вируса гриппа и оценена способность сконструированных вакцинных кандидатов стимулировать выработку гуморального и Т-клеточного иммунитета в отношении обоих вирусных патогенов, а также протективная активность вирусов в отношении РС инфекции у мышей.

В диссертационной работе впервые доказано, что добавление сигнального пептида к целевому трансгену может обеспечивать формирование более сбалансированного Т-клеточного иммунитета к встроенным Т-клеточным эпитопам РС вируса, по сравнению со стандартной схемой слияния трансгена с укороченным NS1 белком вируса гриппа.

Достоверность полученных в диссертационной работе результатов, обоснованность основных научных положений, выводов и рекомендаций не

вызывает сомнений, поскольку дизайн экспериментов был грамотно спланирован, исследования проведены на современном методическом уровне, а результаты подвергнуты тщательному анализу с использованием релевантных методов статистической обработки данных.

Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов

Представленное диссертационное исследование Пулькиной А.А. имеет существенную научную значимость как с точки зрения фундаментального изучения аспектов регуляции иммунного ответа на конструируемые вакцинные кандидаты с целью усиления иммуногенности встроенного целевого антигена и снижения иммуногенности самого вектора, так и с точки зрения практического применения разработанных принципов для дизайна векторных вакцин против различных возбудителей респираторных заболеваний человека. При этом данные принципы могут быть реализованы не только в случае использования вирусов гриппа в качестве векторов, но и при использовании других векторных систем доставки целевых антигенов в организм.

Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, 3 из которых – в журналах, входящих в Перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ. Опубликованные научные работы в полной мере отражают содержание диссертационного исследования, включая результаты изучения внутриклеточной и внеклеточной локализации трансгена, встроенного в гриппозный вектор, с использованием репортерного белка люциферазы, а также результаты изучения безвредности, иммуногенности и протективной активности различных модификаций гриппозного вектора с использованием химерного белка F РС вируса в качестве целевого антигена. Важно отметить, что в данных работах Пулькина А.А. является первым автором.

Структура и оформление работы

Работа изложена на 132 страницах машинописного текста, построена по классическому принципу и включает следующие разделы: «Введение», «Литературный обзор», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение» и «Выводы». Диссертация проиллюстрирована 31 рисунком и содержит 6 таблиц. Список литературы содержит 277 литературных источников (9 на русском и 268 на английском языках). Диссертационная работа представляет собой целостный труд, который обстоятельно раскрывает заявленную тему.

Во **введении** соискатель привел обоснование актуальности темы исследования, указал степень разработанности темы, сформулировал цели и задачи исследования, научную новизну, теоритическую и практическую значимость работы, а также положения, выносимые на защиту.

В **первой главе** приведен обзор современной литературы по теме исследования. Представлены сведения о респираторно-синцитиальном вирусе, его структурно-функциональной организации, жизненном цикле и особенностям развития иммунного ответа на РСВ инфекцию, включая феномен усиления инфекции на фоне неоптимальной индукции адаптивного иммунного ответа. Также приведены последние данные о разработках вакцин против РСВ с использованием различных вакцинных платформ. В обзоре представлены литературные данные о перспективах использования вирусов гриппа в качестве векторной системы доставки для дизайна вакцин против различных респираторных вирусных и бактериальных инфекций. В заключении главы приведено обоснование необходимости проведения дополнительных исследований по оптимизации гриппозных векторов с целью создания безопасных и эффективных вакцин против патогенов интереса.

Во **второй главе** подробно изложены используемые в работе материалы и методы экспериментальных исследований. Этот раздел производит благоприятное впечатление по объему и содержанию, свидетельствует о том, что исследование выполнялось с использованием современных вирусологических,

биохимических, молекулярно-генетических, патоморфологических и иммунологических методов.

В третьей главе приведено описание полученных результатов исследований, которое включает пять разделов. В первом разделе проведено изучение пространственной локализации трансгена (репортерного белка NanoLuc), слитого с укороченной формой NS1 белка вируса гриппа. Приведены свидетельства преимущественного накопления трансгена внутри зараженной клетки, при этом во внеклеточном пространстве также детектируется встроенный белок, но в существенно меньших количествах. Соответственно, в следующих разделах данной главы приведены результаты конструирования и детального изучения панели рекомбинантных вирусов гриппа, экспрессирующих химерный антиген РСВ, состоящий из двух структурных эпитопов F белка РС вируса. Сконструированные штаммы отличались наличием сигнального пептида IgGк перед последовательностью трансгена, а также способом его встраивания в рамку считывания NS1 белка вируса гриппа. Изучение безопасности, стимуляции врожденного иммунитета при интраназальном введении, а также параметров адаптивного иммунитета как после иммунизации, так и после РСВ инфекции, позволили сделать вывод о преимуществе использования сигнального пептида для индукции наиболее сбалансированного Т-клеточного иммунного ответа к эпитопам РСВ, который препятствует размножению РС вируса без развития иммунопатологических состояний, свойственных формалин-инактивированной вакцине от РСВ. Результаты исследования описаны в единообразной форме, что способствует легкому восприятию материала. Достоверность полученных результатов подтверждена с использованием различных статистических методов анализа.

В четвертой главе автор приводит обсуждение полученных результатов. Обсуждаются возможные причины отсутствия формирования гуморального иммунного ответа на встроенные структурные эпитопы РСВ, а также в контексте современной научной литературы обосновываются полученные результаты

модуляции Т-клеточного иммунного ответа на трансген при добавлении к нему сигнального пептида. В обсуждении подчеркивается важность изучения различных стратегий оптимизации гриппозных векторов с целью разработки безопасных и эффективных векторных вакцин против любых возбудителей респираторных вирусных инфекций.

Выводы, сформулированные автором по результатам проведенной работы, в полной мере соответствуют полученным в ходе выполнения исследования экспериментальным данным.

Замечания по оформлению работы отсутствуют.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

В результате проведенного исследования был предложен способ оптимизации гриппозного вектора с модифицированным NS1 белком, при котором повышается иммуногенность встроенного иммуногенного фрагмента целевого патогена, и при этом снижается иммунодоминантность Т-клеточных эпитопов вируса гриппа. Результаты диссертационной работы могут быть в дальнейшем использованы для разработки векторных вакцин против различных возбудителей респираторных инфекций.

Замечания и вопросы к работе

При ознакомлении с материалами диссертационного исследования возникли следующие замечания и вопросы:

1. В разделе материалов и методов отсутствует информация о том, как именно проводилась кодонная оптимизация последовательности трансгенов для экспрессии в составе гриппозного вектора PR8.
2. Каков критерий аттенуации вирусов гриппа в экспериментах на мышах? В соответствующем разделе диссертации проводилось сравнение репликации сконструированных рекомбинантных вирусов в легких мышей, однако в

данном эксперименте отсутствовали контрольные группы животных, которым бы вводили заведомо вирулентный или аттенуированный варианты вирусов. Некорректно утверждать, что вирусы были аттенуированными, потому то демонстрировали сходный уровень репликации в легких мышей, который колебался в пределах $4-5 \log_{10}$ ЭИД₅₀.

3. Проводилось ли подтверждение антигенной идентичности искусственного гибридного белка РСВ F₂₄₈₋₂₉₀₊₄₀₉₋₄₅₁ F-белку нативного РС вируса? Слияние двух структурных фрагмента белка без использования гибкого линкера могло привести к искажению пространственного расположения аминокислот и, как следствие – к утрате В-клеточных эпитопов вируса. Подтверждением сохранности эпитопов могла бы служить реактивность химерного белка с коммерческими антителами паливизумаб и 101F. Поскольку в работе для подтверждения экспрессии эпитопов РСВ использовалась гипериммунная сыворотка к данному химерному белку, а не к нативному вирусу, в реальности пространственная укладка встроенных фрагментов РСВ могла отличаться от природной, что и не позволило выявить антительный ответ в ИФА к цельному РС вирусу даже после трех иммунизаций.
4. На рисунке 22 приведены результаты оценки антигемагглютинирующих антител у четырех вариантов векторных вакцин, однако не приведены данные для вектора без вставки. Есть ли понимание, как встраивание чужеродных антигенов в гриппозный вектор влияет на развитие гуморального иммунитета в отношении антигенов вируса гриппа?
5. Чем обосновывается выбор инактивированного вируса гриппа A/Guandong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09 для стимуляции клеток в процессе оценки грипп-специфического Т-клеточного иммунного ответа на иммунизацию вакцинными вариантами на основе штамма PR8?
6. При обсуждении результатов исследования автор отмечает, что в настоящей работе не изучали защитный эффект сконструированных химерных вирусов гриппа в отношении гриппозной инфекции, поскольку в более ранних работах

была показана способность вектора с укороченным NS1 белком защищать иммунизированных животных против широкого спектра вирусов гриппа А. Однако ранее не изучались варианты, у которых адаптивный иммунный ответ был целенаправленно переключен с вектора на вставку. Будут ли варианты, содержащие сигнальный пептид IgGк, обладать тем же уровнем перекрестной защиты от вирусов гриппа, если кросс-протективность гриппозных вакцин во многом определяется именно индукцией вирусспецифических Т-клеток?

Приведенные выше вопросы и замечания носят частный характер и не влияют на общую положительную оценку работы.

Заключение

Работа Пулькиной Анастасии Александровны представляет законченную научно-квалификационную работу, в которой содержится решение актуальной научной задачи в области вирусологии по возможности усиления безопасности, иммуногенности и протективной активности вакцин против РСВ, сконструированных на основе гриппозного вектора.

Содержание диссертационного исследования на тему «Оптимизация гриппозного вектора с модифицированным белком NS1 для эффективной презентации антигенов респираторно-синцитиального вируса» свидетельствуют о высоком методическом уровне и потенциале работы в соответствии с современным уровнем и тенденциями развития вирусологии и иммунологии.

По совокупности актуальности, научной новизны, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Пулькиной Анастасии Александровны на тему «Оптимизация гриппозного вектора с модифицированным белком NS1 для эффективной презентации антигенов респираторно-синцитиального вируса» соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного

