

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Боргояковой Марии Борисовны «ДНК и ДНК/белковая вакцины для профилактики COVID-19», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – молекулярная биология (биологические науки)

Актуальность темы диссертационного исследования

Пандемия, вызванная новым коронавирусом SARS-CoV-2, сделала вызов современному мировому научному и медицинскому сообществу. Совместными усилиями исследователей удалось в краткие сроки понять основные механизмы проникновения вируса в клетку хозяина, разработать вакцины и терапевтические препараты, исследовать особенности реакций иммунной системы на иммуногены различной природы. Установлено, что для проникновения в клетки вирус SARS-CoV-2 использует поверхностный S-белок. Взаимодействие рецептор-связывающего домена (RBD) этого белка с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2) на поверхности клетки вызывает конформационные изменения в структуре S-белка и запускает проникновение вируса в клетку. В многочисленных исследованиях показано, что RBD является мишенью наибольшего числа вируснейтрализующих антител, в результате рецептор-связывающий домен и белок S в целом стали основными мишенями для разработки вакцин, используемых для профилактики COVID-19. Однако с течением времени стало ясно, что гуморальный иммунитет, направленный на нейтрализацию штамма, взятого за основу создания вакцины, теряет свою актуальность при возникновении новых вариантов вируса. Оказались актуальными задачи создания вакцины, способной индуцировать не только наработку вируснейтрализующих антител, но и T-клеточный ответ, включая цитотоксические лимфоциты. Такими свойствами обладают вакцины на основе нуклеиновых кислот. Однако для них существует необходимость подбора средства доставки для увеличения эффективности.

Поэтому поставленная Марией Борисовной цель разработать экспериментальные вакцины для профилактики COVID-19, способные индуцировать оба звена иммунитета, является актуальной задачей современной молекулярной биологии. Решение данной задачи является очень своевременным, поскольку новые подходы, реализованные в ходе работы, могут быть использованы для разработки других профилактических вакцин против различных инфекционных заболеваний, как существующих, так и возникающих вновь.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертация М.Б. Боргояковой посвящена разработке экспериментальных вакцин. Автором постулирует четыре положения, выносимые на защиту, каждое из которых описывает результаты работы, подтверждённые фактическим экспериментальным материалом. Перечисленные положения раскрываются и обсуждаются в тексте диссертации. Сделанные выводы являются научно-обоснованными и полностью отражают результаты работы.

Достоверность результатов

Достоверность проведённых исследований не вызывает сомнений. Мария Борисовна получила результаты с применением современных биохимических, молекулярно-биологических, иммунологических и биоинформационных методов исследования на сертифицированном оборудовании. Полученные результаты были грамотно обработаны адекватными статистическими методами и их достоверность была подтверждена воспроизводимостью в повторах.

Научная новизна диссертационной работы

В рамках работы М.Б. Боргояковой были разработаны и исследованы экспериментальные вакцинные конструкции, которые представляют собой плазмиды и их сочетание с конъюгатом полиглюкин-спермидин и/или полиглюкин-спермидин-белок RBD. ДНК-конструкции pVAX-RBD, pBSI-COV и pBSI-COV-Ub, созданные во время работы, охарактеризованы и запатентованы (патенты РФ №2754230 от 30.08.2021 г., №2806556 и №2806590 от 01.11.2023 г.). Впервые для COVID-19 был описан подход создания комбинированных частиц, которые несут ДНК-конструкцию внутри, а белок-иммуноген RBD экспонируется на поверхности. Данные частицы также запатентованы (патент РФ №2781294 от 11.10.2022 г.)

Структура и основное содержание диссертации

Диссертационная работа Боргояковой Марии Борисовны изложена на 127 страницах машинописного текста и включает список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, выводы и список литературы. Работа иллюстрирована 20-ю рисунками и 6-ю таблицами. Список литературы содержит 275 источников.

Глава «Введение» включает все необходимые разделы, включая актуальность исследования, цели и задачи, новизну и значимость, положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов и другие формальные пункты.

Обзор литературы посвящён подходам к созданию вакцин, реализованным в ходе борьбы с пандемией COVID-19. Описаны принципы разработки вакцин, основанные на использовании иммуногенов различной природы: на основе цельновирионных частиц, субъединичные вакцины, вакцины на основе вирусных векторов и нуклеиновых кислот. Приведён анализ данных, полученных в рамках проведения доклинических и клинических испытаний, в частности эффективность вакцин для профилактики COVID-19, а также проведено обсуждение важности Т-клеточного ответа для развития сильного противовирусного иммунитета. В целом, обзор литературы полноценно отражает мировую ситуацию в области разработки вакцин и содержит обоснование, почему именно ДНК-вакцины стали объектом исследования.

В главе 2 «Материалы и методы» перечислены используемые в работе материалы, включающие олигонуклеотиды, синтетические пептиды, ферменты, реактивы, клеточные линии, питательные среды, буферные растворы. Приведено подробное описание молекулярно-биологических, физико-химических, микроскопических, иммунологических, микробиологических, вирусологических и компьютерных методов, а также методов проведения культуральных работ и работы с животными. Приведённые методы работы проведены на высоком уровне с использованием современного оборудования.

Глава 3 посвящена полученным результатам и их обсуждению. Данный раздел разделён на две части. В первой части описывается конструирование ДНК-вакцины pVAXrbd и создание на её основе комбинированных частиц, для которых определены физико-химические и иммунологические свойства. Проведена оценка экспрессии целевого гена в культуре эукариотических клеток, показано её наличие как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Следует отметить, что белок RBD был выявлен в культуральной среде, что говорит о высокой степени секреции белка, которая была достигнута введением в конструкцию специальной лидерной последовательности. Самособирающиеся частицы, сформированные с использованием плазмиды pVAXrbd и конъюгатов полиглюкин-спермидин и полиглюкин-спермидин-белок RBD, были охарактеризованы с помощью электронной микроскопии и других методов. Иммунизация мышей данными частицами привела к формированию гуморального и клеточного иммунитета, что обеспечило снижение вирусной нагрузки в лёгких в эксперименте *in vivo* по заражению иммунизированных животных.

Во второй части главы 3 описывается конструирование ДНК-вакцины, кодирующей искусственный Т-клеточный иммуноген, состоящий из иммунодоминантных фрагментов различных белков вируса SARS-CoV-2 – pBSI-COV-Ub. Фрагменты были выбраны по максимальному содержанию эпитопов, рестриктируемых системами МНС I и II человека и мыши. К иммуногену добавили убиквитин для увеличения эффективности процессинга иммуногена в клетке. Экспрессия целевых генов была показана также на уровне мРНК и белка. Иммунизация мышей ДНК-вакциной привела к индукции клеточного ответа, который обеспечил снижение вирусной нагрузки в лёгких иммунизированных животных. Иммунизация мышей комбинированной конструкцией, содержащей pBSI-COV-Ub в качестве ядра и белок RBD на поверхности (за счёт использования конъюгата полиглокин-спермидин-белок RBD), привела к формированию как гуморального, так и клеточного иммунного ответа.

Результаты исследований полноценно проиллюстрированы рисунками и таблицами. В заключении подводятся итоги исследования, автор обобщает результаты исследования и отмечает их теоретическую и практическую значимость.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с общепринятыми требованиями, соответствует её содержанию и даёт представление о проделанной работе и результатах.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы, полнота опубликования результатов

Детализация диссертации и автореферата свидетельствует о том, что автором лично и при его участии проведён заявленный объём исследований. Личное участие автора выразилось в анализе литературных данных, в проведении всех работ с плазмидами, включая конструирование, наработку, очистку и исследование экспрессии целевых генов в эукариотической культуре, в работе с животными, включая иммунизацию и забор образцов, в исследовании иммуногенности, включая оценку специфической активности сывороток и Т-клеточный ответ, а также в статистическом анализе полученных результатов. Автор лично подготовила к публикации статьи по материалам проделанной работы. Среди них 3 – в журналах, индексируемых Web of Science, 2 – в РИНЦ, 1 – глава в книге издательства IntechOpen. Результаты работы доложены на шести международных конференциях. Получено четыре патента РФ на изобретения, что подчёркивает практическую ценность работы и наличие научной новизны работы.

Вопросы и замечания к диссертационной работе

Принципиальных замечаний к диссертационной работе М.Б. Боргояковой нет.

Стоит отметить некоторую краткость в изложении выводов, что, однако, не влияет на общее положительное впечатление о работе.

Вопросы дискуссионного характера:

1. Проводилось ли автором сравнение собственных экспериментальных препаратов с вакцинными препаратами против COVID-19, имеющимися на рынке?

2. Почему в качестве модели для исследования протективности были взяты мыши BALB/c, а не мыши, чувствительные к COVID-19?

3. При исследовании иммуногенности незащищенной ДНК приведены результаты, которые демонстрируют отсутствие специфического и вируснейтрализующего ответа. Говорит ли это о том, что ДНК-вакцина не работает при отсутствии других компонентов?

4. Насколько безопасно использование полученных ДНК-вакцин, могут ли они рекомбинировать с геномной ДНК иммунизируемого животного/человека? Какие существуют методы снижения опасности встраивания плазмидного материала в геномную ДНК?

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о присуждении учёных степеней

Диссертационное исследование отличается актуальностью, новизной, высоким качеством выполненной экспериментальной работы, а также значимыми результатами, что является закономерным следствием высокого профессионального уровня автора. Автореферат полностью отражает содержание диссертации, тщательно оформлен и хорошо проиллюстрирован. Диссертационная работа Боргояковой Марии Борисовны на тему «ДНК и ДНК/белковая вакцины для профилактики COVID-19», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - молекулярная биология, является законченной, самостоятельной научно-квалифицированной работой, в которой решена актуальная научная задача, имеющая значение для молекулярной биологии. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.3 - молекулярная биология (п. 1, 9, 13, 15) и требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (с изменениями в ред. Постановления Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016 и №426 от 20.03.2021), предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор, Боргоякова Мария Борисовна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - молекулярная биология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции экспрессии генов, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Рыкова Елена Юрьевна

Адрес: 630090, Россия, г. Новосибирск,
пр. Ак. Лаврентьева, 10.
<http://www.bionet.nsc.ru>,
Rykova.Elena.2014@bionet.nsc.ru

Подпись д.б.н. Рыковой Е.Ю. заверяю:
Учёный секретарь ИЦиГ СО РАН
Кандидат биологических наук

26.04.2024



Орлова Г.В.