

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу **Шарабрина Сергея Валерьевича**

на тему:

“Разработка экспериментальных мРНК-вакцин против гриппа и COVID-19”,  
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология

### **Актуальность диссертационной работы**

Сезонные респираторно-вирусные инфекции являются серьезной медицинской проблемой и существенной нагрузкой на экономику. Проживание людей в крупных мегаполисах и широкие возможности миграции могут приводить и часто приводят к тому, что сезонные инфекции могут перерасти в пандемии, как это было в случае COVID-19. В свою очередь, уровень зараженности населения определенным вирусом на уровне пандемий ведет к его высокой изменчивости, снижающей эффективность иммунитета у переболевших. Аналогичная проблема эффективности иммунного ответа на определенный циркулирующий штамм вируса появляется и при разработке вакцин. Поэтому задача быстрой разработки и производства вакцин для борьбы с конкретным штаммом вируса является высоко актуальной. Одним из самых современных подходов к решению этой задачи и уже доказавших свою эффективность, являются вакцины на основе мРНК. Диссертационная работа Шарабрина Сергея Валерьевича была посвящена разработке экспериментальных мРНК-вакцин против вируса гриппа и вируса SARS-CoV-2, вызывающего инфекцию COVID-19, в результате чего получены лабораторные прототипы указанных вакцин.

### **Научная новизна исследования**

Получены прототипы новых мРНК вакцин против вируса гриппа и коронавируса, вызывающего COVID-19. В работе предложен новый подход одностадийного ферментативного синтеза молекул мРНК, позволяющий получать молекулы, содержащие 5'-кэп и 3'-поли(А)хвост. Поскольку в Российской Федерации до сих пор официально не зарегистрированы отечественные разработки мРНК вакцин, предлагаемое исследование достаточно оригинально.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

В результате работы Шарабрина С.В. получены новые теоретические знания о том, как наиболее эффективно конструировать 5'- и 3'- нетранслируемые области в мРНК, используемых для вакцинации для эффективной наработки белка в клетках.

Получены экспериментальные мРНК вакцины – мРНК-C3-H1, кодирующая белок гемагглютинины вируса гриппа A(H1N1)pdm09 и мРНК-C1-RBD, кодирующая рецептор-связывающий домен (RBD) белка S вируса SARS-CoV-2. Практическую значимость, помимо самих полученных прототипов вакцин против вируса гриппа и COVID-19, имеет также предложенный в работе эффективный метод очистки на целлюлозе синтезированных молекул мРНК от примеси двуцепочечных мРНК. Полученные Сергеем Валерьевичем универсальные конструкции ДНК, позволяющие клонировать различные целевые кДНК в контексте 5'- и 3'- нетранслируемых областей, могут быть востребованы для синтеза широкого спектра мРНК вакцин. Таким образом, работа имеет существенное практическое значение в области здравоохранения.

### **Структура и общая характеристика диссертационной работы**

Диссертация С. В. Шарабрина построена по стандартной схеме, и содержит все необходимые разделы: развернутое введение, обзор литературы, материалы и методы исследования. Разделы результаты и их обсуждение объединены, присутствует заключение по работе, выводы и список цитированной литературы. Работа изложена на 119 страницах, содержит 46 рисунков и 5 таблиц; список цитируемой литературы включает 210 источников.

Во введении Сергей Валерьевич отмечает актуальность исследования, формулирует цель и 5 задач, дает краткий обзор актуальности разработки вакцин на основе мРНК, освещает существующие пробелы в технологии конструирования, очистки и доставки таких вакцин в клетки реципиентов.

Обзор литературы дает общие представления о вирусе гриппа и вирусе SARS-CoV-2, о многообразии существующих на сегодняшний день вакцин против указанных вирусов. Отдельный раздел обзора литературы посвящен современным представлениям о том, что необходимо включать в структуру мРНК вакцин, какова их эффективность, какие недостатки выявлены, и до сих пор не решены. Обзор литературы хорошо иллюстрирован, он дает исчерпывающее представление о проблематике мРНК в целом. Стоит особенно отметить, что основная часть литературных источников – это работы последних пяти лет.

Отдельно хочется отметить широкое методологическое разнообразие работы. Сергей Валерьевич использует методы биоинформатического анализа баз данных, конструирование плазмидных векторных молекул, оптимизированный ферментативный синтез модифицированных мРНК, их очистки, анализ продукции целевых белков, анализ иммуногенности, анализ вирус-нейтрализующей активности сыворотки

иммунизированных мышей, анализ активации неспецифического иммунного ответа, и наконец, анализ протективных свойств разработанных прототипов мРНК вакцин. Диссертационные работы с таким широчайшим набором экспериментальных методов встречаются не часто и вызывают большое уважение.

В главе Результаты и обсуждение можно условно выделить 5 блоков, соответствующих поставленным задачам. Сначала Шарабрин С.В. проводит сравнение эффективности получения мРНК посттрансляционным и ко-трансляционными методами на примере мРНК зеленого флуоресцентного белка GFP и оценивает эффективность трансляции с полученных мРНК матриц в эукариотических клетках, в результате чего делает заключение о большей пригодности ко-трансляционного метода. На следующем этапе работы Сергей Валерьевич конструирует ДНК-матрицы, позволяющие проводить наработку целевых мРНК в контексте эффективных для трансляции 5'- и 3'-нетранслируемых областей. Далее, в работе успешно решается вопрос очистки получаемых молекул мРНК. В финальной части Шарабрин С.В. с учетом разработанных методов синтеза и очистки мРНК с заданными последовательностями, получает экспериментальные мРНК вакцины к вирусу гриппа А штамма California и вирусу SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1. Полученные прототипы вакцин в данном исследовании успешно тестированы на животных и продемонстрированы высокие защитные свойства вакцин.

Выводы, сделанные в исследовании, базируются на полученных результатах, которые, в свою очередь, были отражены в 6 публикациях в отечественных и зарубежных журналах. Хочется отметить цельность работы – от клонирования к получению прототипов вакцин и доказательству их протективной эффективности. Автореферат отражает все основные результаты исследования, представленные в диссертации.

Работа интересная, написана в динамичном стиле, а качество полученных в работе результатов характеризует Шарабрина Сергея Валерьевича как сложившегося специалиста в области молекулярной биологии и генной инженерии.

#### **Замечания:**

1. В диссертации присутствуют некорректные выражения, как например: “К недостаткам этого метода так же можно отнести необходимость правильных посттрансляционных модификаций....” (С. 20). В главе “Материалы и Методы”:

“...проводили SDS-ПААГ в редуцирующих условиях”. В обзоре литературы встречаются вариации описания на 5’ или 3’ конце мРНК находится КЭП (С. 24).

2. В задаче №1 фигурирует мРНК-GFP без расшифровки, что подразумевает указанная аббревиатура в используемом контексте.

3. В обзоре литературы мне не хватило описания почему AG-Cap является эффективным субстратом T7 РНК-полимеразы и почему он первым попадает в активный центр. Этот вопрос является одним из ключевых для рассматриваемой технологии получения мРНК вакцины, и поэтому более подробный разбор этого вопроса был бы крайне желателен.

4. На Рисунках 17, 21, 24 и 27, представляющих данные проточной цитометрии, подписи осей даны в нечитаемом виде, что мешает восприятию материала.

5. При обсуждении результатов по моделированию вторичной структуры 5’НТО и 20 первых нуклеотидов мРНК GFP, представленных в таблице 4, говорится о появлении добавочной шпильки, соответствующей кодирующей области GFP. Поскольку на рисунках вторичных структур нумерация нуклеотидов представлена неразборчиво, желательно было бы каким-то дополнительным способом выделить обсуждаемую шпильку.

6. Выражение “универсальные ДНК матрицы для синтеза мРНК” не вполне корректно, поскольку речь идет об универсальных ДНК модулях или кассетах, обеспечивающих синтез мРНК желаемых последовательностей.

Сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не снижают научную ценность полученных результатов и сделанных выводов, и не снижают общего очень хорошего впечатления от диссертационной работы.

### **Заключение**

Диссертационная работа Шарабрина Сергея Валерьевича на тему: “Разработка экспериментальных мРНК-вакцин против гриппа и COVID-19”, представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология, по своей актуальности, новизне, уровню проведенных исследований и практической значимости полностью соответствует всем требованиям в пп. 9-14, Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 (с изменениями в ред. в ред. Постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016; № 1024 от 28.08.2017; № 1168 от 01.10.2018; № 426 от 20.03.2021; №1786 от 26.10.2023 с изм., внесенными Постановлением

01.10.2018; № 426 от 20.03.2021; №1786 от 26.10.2023 с изм., внесенными Постановлением Правительства РФ №62 от 25.01.2024), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Шарабрин Сергей Валерьевич заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология.

**Официальный оппонент:**

Ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии ФГБУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ФГБУН ИХБФМ СО РАН), доктор биологических наук (03.01.03 -Молекулярная биология)

630090, г. Новосибирск,  
пр. Ак. Лаврентьева, 8  
телефон: 8 (383) 363-51-90  
e-mail: o.koval@niboch.nsc.ru

подпись д.б.н. Коваль О.А. заверяю  
Учёный секретарь ФГБУН ИХБФМ СО РАН  
телефон: 8 (383) 363-51-55  
e-mail: secretary@niboch.nsc.ru  
к.б.н.

Коваль Ольга Александровна



дата отзыва: 06 мая 2024 г.



Логашенко Евгения Борисовна

Коваль Ольга Александровна

630090, г. Новосибирск,  
пр. Ак. Лаврентьева, 8  
телефон: 8 (383) 363-51-90  
e-mail: o.koval@niboch.nsc.ru

подпись д.б.н. Коваль О.А. заверяю  
Учёный секретарь ФГБУН ИХБФМ СО РАН  
телефон: 8 (383) 363-51-55  
e-mail: secretary@niboch.nsc.ru  
к.б.н.

Логашенко Евгения Борисовна

дата отзыва: 06 мая 2024 г.