

ОТЗЫВ

официального оппонента

**доктора биологических наук Дейнеко Елены Викторовны
на диссертационную работу Шарабрина Сергея Валерьевича
«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, биологические науки**

Актуальность темы диссертационной работы

Тема диссертационной работы Шарабрина Сергея Валерьевича, несомненно, является актуальной, и посвящена перспективному направлению в вакцинологии, а именно, разработке и созданию мРНК вакцин. В работе проведено исследование молекулярно-биологических особенностей конструирования мРНК-вакцин, что подчеркивает фундаментальный характер оппонируемой работы, а также получены экспериментальные мРНК-вакцины против сезонного гриппа и COVID-19.

мРНК-вакцины на сегодняшний день являются одной из наиболее перспективных и безопасных платформ, которые используют как для создания вакцин против инфекционных заболеваний, так и для терапии онкологических заболеваний. Достижения в области мРНК-вакцин были отмечены Нобелевской премией 2023 г. (Каталин Карико и Дрю Вайсман). мРНК-вакцины имеют ряд преимуществ по сравнению с другими вакцинами: мРНК-вакцины обеспечивают внутриклеточный синтез целевого белка, тем самым они способны активировать оба звена иммунитета, как клеточный, так и гуморальный; они неинфекционны и могут обеспечить экстренное реагирование в отношении организации их производства. В отличие от ДНК-вакцин, для мРНК не требуется проникновения в ядро клетки для обеспечения экспрессии целевого гена, поэтому мРНК-вакцина не способна интегрироваться в геном хозяина, благодаря чему устраняется риск, связанный с онкогенезом.

Пандемия COVID-19 стимулировала развитие технологии мРНК-вакцин, и в 2020 году были одобрены к экстренному применению первые две мРНК-вакцины мРНК-1273 (Moderna Inc) и BNT162b2 (Pfizer/BioNTech). На сегодняшний день уже выделено более 10 линий штаммов коронавируса, которые обладают разной трансмиссивностью и вирулентностью. SARS-CoV-2 является относительно новым человеческим вирусом, который продолжает развиваться и приобретать новые свойства.

Разработка вакцин на основе технологии мРНК востребована для борьбы с такими заболеваниями как грипп из-за высокой вариабельности вирусов, которые вызывают эти инфекции. Сезонные вирусы гриппа А и В, вызывающие около 3–5 миллионов тяжелых случаев заболевания в год и до 600 тыс. случаев летальных исходов во всем мире, представляют собой серьезную опасность для общественного здравоохранения. Постоянный антигенный дрейф циркулирующих вирусов гриппа приводит к тому, что сезонные вакцины против гриппа становятся неэффективными и возникает необходимость ежегодного перевыпуска таких вакцин. Технология мРНК-вакцин позволяет быстро перейти на массовое производство новой вакцины с учетом актуальных штаммов вируса.

В диссертации Шарабрина С.В рассмотрены вопросы как технологического плана, касающиеся отработки протокола получения мРНК *in vitro* с использованием отечественных реактивов, так и задачи, непосредственно связанные с конструированием экспериментальных

мРНК-вакцин против сезонного вируса гриппа и COVID-19, со способами их доставки и исследованию эффективности на модели лабораторных животных.

Научная новизна и практическая значимость исследования и полученных результатов

Диссертантом экспериментально показано, что простое добавление к целевому гену последовательности 5'-НТО известного высокоэкспрессируемого гена, может приводить к формированию сложных вторичных структур в районе участка, включающего 5'-НТО и 5'-конец целевого гена, что приводит к снижению эффективности его трансляции.

При получении ДНК-матриц для синтеза мРНК, на примере гена GFP, кодирующего зелёный флуоресцентный белок, автором показано, что оптимизация вторичной структуры гибридного участка, включающего последовательность 5'-НТО высокоэкспрессируемого гена и 5'-конец гена GFP, путем изменения нуклеотидного состава приводит к удалению сложных шпилечных структур и тем самым позволяет значительно повысить уровень синтеза целевого белка. Эффективность предложенного подхода была продемонстрирована автором при разработке двух экспериментальных мРНК-вакцин против гриппа и COVID-19.

Практическая значимость диссертационной работы Шарабрина С.В. заключается в разработке оригинального протокола для лабораторного получения мРНК с использованием котранскрипционного способа кэпирования и полиаденилирования с добавлением AG-Cap аналога в реакционную смесь и использованием ДНК-матрицы с закодированным поли(А)-хвостом соответственно. Разработанный протокол адаптирован для синтеза мРНК в одну стадию с использованием отечественной базы реагентов. Диссертантом показано, что мРНК-GFP, полученная по данному протоколу, обеспечивает такой же уровень синтеза белка, как и мРНК, синтезированная посттранскрипционным методом.

Соискателем сконструированы три оригинальные плазмидные конструкции, содержавшие последовательности НТО из высокоэкспрессируемых генов, которые позволяют проводить клонирование различных целевых генов в составе плазмиды для получения ДНК-матриц, предназначенных для синтеза мРНК *in vitro*, обеспечивающих высокий уровень синтеза белка в эукариотических клетках.

Разработана оригинальная методика очистки синтезированной мРНК *in vitro* с использованием целлюлозы, позволяющая эффективно удалять примеси дцРНК, возникающие в процессе синтеза.

С использованием разработанного протокола диссертантом разработаны две экспериментальные мРНК-вакцины: одна из них против гриппа, вызываемого вирусом A/California/4/2009(H1N1pdm09) и другая – против COVID-19, вызываемого вирусом SARS-CoV-2, штамм Wuhan-Hu-1. Полученные мРНК-вакцины продемонстрировали высокую иммуногенность и способность индуцировать формирование протективного иммунного ответа у лабораторных животных против соответствующих инфекций.

Разработанный Шарабриным С.В. протокол может быть использован для получения мРНК-вакцин против различных соматических и инфекционных заболеваний.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов

Основные результаты диссертационной работы получены лично автором. Достоверность результатов работы не вызывает сомнений. Экспериментальные данные получены с применением современных экспериментальных методов молекулярной биологии и

иммунологии с адекватными контролями. Выводы диссертационной работы базируются на полученных результатах исследования и полностью соответствуют им. Результаты диссертационной работы были представлены на научных конференциях разного уровня, опубликованы в 6 статьях в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Шарabrina С.В. имеет традиционную структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, раздела результатов и обсуждений, состоящего из четырёх частей, заключения, введения и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 119 страницах, содержит 5 таблиц и 46 рисунков. Список используемой литературы включает 210 источников на английском и русском языке.

В разделе Обзор литературы автор кратко описывает общую информацию о вирусах гриппа и коронавирусах. Раскрывает эпидемиологическую значимость разработки мРНК-вакцины против данных патогенов. Далее автор рассматривает историю разработки вакцин против вируса гриппа от первых живых аттенуированных вакцин до современных разрабатываемых типов вакцин, в том числе векторных и мРНК-вакцин. Затем кратко рассматриваются основные используемые в мире вакцины против COVID-19. Следующая часть обзора литературы посвящена подробному разбору мРНК-вакцин. Автор подробно рассматривает структуру мРНК, описывает её элементы и их значимость для вакцины, рассматривает механизм действия вакцины и способы доставки мРНК-вакцины.

В главе Результаты и обсуждение представлены результаты собственных исследований, где последовательно описываются проведенные эксперименты с последующим обсуждением. Работа разделена на 4 части, которых логически изложены этапы разработки мРНК-вакцины.

Первая часть работы посвящена конструированию ДНК-матриц и синтезу мРНК-вакцины. В начале автор рассматривает основные способы синтеза зрелой мРНК *in vitro*, посттранскрипционный с использованием кэпирующего фермента и поли(А)полимеразы; и котранскрипционный, с использованием химических аналогов кэпа и встроенного в ДНК-матрицу поли(А)хвоста. Далее автор подробно описывает конструирование ДНК-матрицы с учётом необходимых изменений для использования котранскрипционного способа синтеза мРНК. Также соискатель проводит исследование различных нетранслируемых областей, необходимых для повышения эффективности трансляции мРНК, в том числе с проведением моделирования вторичной структуры данных областей. В заключении данного раздела автор получает три универсальные ДНК-матрицы для синтеза мРНК: pVAX-C1, содержащая 5'- и 3'-НТО α -глобина; pVAX-C2, содержащая 5'- и 3'-НТО γ -глобина; pVAX-C3, содержащая 5'-НТО β -глобина и 3'-НТО β -глобина. Данные матрицы предназначены для клонирования в их составе любого целевого антигена для дальнейшего синтеза мРНК-вакцины.

Вторая часть работы описывает способ очистки мРНК от примесей дцРНК. дцРНК может появляться при синтезе *in vitro* из-за неспецифической активности T7 полимеразы. Данные примеси за счёт активации рецепторов врождённого иммунитета могут снижать эффективность мРНК-вакцины при иммунизации *in vivo*. Для очистки мРНК автор предлагает свою модификацию способа очистки на целлюлозе. Эффективность очистки продемонстрирована с помощью методов *in vitro* и *in vivo*. Методом капиллярного электрофореза автор показывает, что в мРНК, синтезированной с помощью T7 полимеразы, присутствуют короткие молекулы, которые отсутствуют в очищенной мРНК. Скорее всего, они являются комплементарными к целевому продукту и образуют примеси дцРНК. Дот-блот анализ так же продемонстрировал отсутствие сигнала в очищенной фракции мРНК при

инкубации с моноклональными антителами к дцРНК. Методами *in vivo* показано, что очищенная мРНК не приводит к повышению уровня IFN α в сыворотке крови лабораторных животных и не приводит к экспрессии раннего маркера активации лимфоцитов CD69.

Следующие две части диссертационной работы демонстрируют применение полученных результатов при разработке экспериментальных мРНК-вакцин против гриппа и COVID-19 и комплексному исследованию их иммуногенных свойств.

Так, при разработке вакцины против гриппа, в качестве антигена автор использовал гемагглютинин вируса гриппа A(H1N1)pdm09 без трансмембранного и цитоплазматического домена. Его последовательность была встроена в сконструированную ранее ДНК матрицу pVAX-C3. Работоспособность полученной мРНК-вакцины мРНК-C3-H1 была продемонстрирована на культуре клеток НЕК-293. Иммунизация лабораторных животных методом струйной инъекции показала, что разработанная мРНК-вакцина формирует гуморальный и клеточный иммунный ответ. Кроме того, она обеспечивает 100% защиту лабораторных животных при заражении летальной дозой адаптированного к мышам вируса гриппа A/California/4/2009(H1N1pdm09).

При разработке экспериментально мРНК-вакцины против COVID-19 в качестве антигена был использован рецептор-связывающий домен (RBD) белка S вируса SARS-CoV-2, штамм Wuhan-Hu-1. Работоспособность полученной мРНК-вакцины мРНК-C1-RBD была продемонстрирована на культуре клеток НЕК-293. Иммунизация лабораторных животных методом струйной инъекции показала, что разработанная мРНК-вакцина формирует гуморальный и клеточный иммунный ответ. В эксперименте с живым вирусом показано, что мРНК-вакцина обеспечивает частичную защиту животных от заражения Гамма-вариантом вируса SARS-CoV-2, вирусная нагрузка в тканях легких иммунизированных животных ниже в сравнении с интактной группой.

В целом, диссертационная работа выполнена на высоком научном и методическом уровне. В работе имеются небольшие неточности орфографического и технического характера, которые в целом не портят общее впечатление о выполненной работе и не влияют на её окончательную оценку. Тем не менее к работе есть несколько вопросов, в основном дискуссионного характера.

Замечания

1. Проводили ли вы в своей работе сравнение влияния разных комбинаций нетранслируемых областей на эффективность трансляции мРНК?

2. На сколько корректно использовать для контроля моновалентной мРНК вакцины против гриппа трёх валентную вакцину с отличающимся штаммовым составом?

3. Почему не использовали другие вакцины против COVID-19 в качестве контроля для вашей вакцины?

4. Почему не приведены списки пептидов, использованных для стимуляции Т-клеточного ответа?

Указанные замечания не снижают значимости полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования С.В. Шарабрина.

Заключение

Таким образом, в своей диссертационной работе Шарабрин С.В. решил ряд вопросов, связанных с технологией получения мРНК-вакцин. Работоспособность предложенного

подхода получения мРНК-вакцин продемонстрирована на примере разработки экспериментальных мРНК-вакцин против гриппа и COVID-19.

Диссертационная работа Шарабрина Сергея Валерьевича «Разработка экспериментальных мРНК-вакцин против гриппа и COVID-19», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология, биологические науки, является завершённой научно-исследовательской работой. Работа полностью соответствует критериям пункта 9 «Положения о присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в ред. Постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г.; №1024 от 28.08.2017 г.; №1168 от 01.01.2018 г.; №426 от 20.03.2021 г.; №1786 от 26.10.2023 г., с изм. Внесенными №62 от 25.01.2024 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, кандидата наук, а её автор Шарабрин Сергей Валерьевич заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Дейнеко Елена Викторовна,
Доктор биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика,
профессор, главный научный сотрудник, зав. лабораторией
биоинженерии растений

/Дейнеко Е.В./

Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН»
пр-т академика Лаврентьева, 10, 630090, Новосибирск
+7-913-740-8108
эл. почта: deineko@bionet.nsc.ru
03 мая 2024 г.

Подпись д.б.н., проф. Дейнеко Е.В. **заверяю**
Ученый секретарь
ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН»
кандидат биологических наук
Орлова Галина Владимировна



/Орлова Г.В./