**ОТЗЫВ**

**официального оппонента кандидата биологических наук Шуляковой Инны Вадимовны на диссертацию Кудрова Глеба Александровича «Иммуногенность и протективность интраназальных векторных вакцин на основе вируса Сендай против SARS-CoV-2-инфекции, вызванной актуальными вариантами коронавируса», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология (биологические науки)**

**Актуальность диссертационного исследования.** Вакцинация является одним из наиболее эффективных способов профилактики инфекционных заболеваний и позволяет существенно снизить заболеваемость, риск развития тяжелых форм и летальных исходов. Особенно наглядно ее значение было продемонстрировано в ходе пандемии COVID-19, когда широкое применение вакцин позволило существенно снизить заболеваемость, частоту развития тяжелых форм и COVID-ассоциированных летальных исходов. Вместе с тем продолжающаяся эволюция SARS-CoV-2, появление и распространение новых вариантов вируса и необходимость поддержания эффективной иммунной защиты населения определяют актуальность дальнейшего совершенствования подходов к вакцинопрофилактике.

Особое значение приобретает разработка комбинированных схем иммунизации, предусматривающих последовательное применение парентеральных и мукозальных вакцин. Парентеральная вакцинация обеспечивает формирование выраженного системного иммунного ответа, способного сохраняться в течение длительного времени и защищать прежде всего от развития заболевания и тяжелого течения. Последующая интраназальная иммунизация может дополнять эту защиту формированием специфического иммунитета непосредственно во входных воротах инфекции. Индукция секреторных IgA и местного клеточного иммунного ответа в слизистых оболочках дыхательных путей потенциально позволяет ограничивать репродукцию возбудителя и снижать вероятность его передачи в популяции. Таким образом, сочетание парентеральной и интраназальной вакцинации представляет особый интерес как подход, направленный одновременно на защиту привитого человека от заболевания и ограничение распространения возбудителя в популяции.

Перспективным подходом к созданию мукозальных вакцин является использование рекомбинантных вирусных векторов, обеспечивающих доставку и экспрессию целевых антигенов непосредственно в клетках

слизистых оболочек дыхательных путей. Использование таких платформ позволяет индуцировать как местный, так и системный специфический иммунный ответ. Особый интерес представляет вирус Сендай, обладающий природным тропизмом к респираторному эпителию, что делает его привлекательной платформой для разработки интраназальных вакцин. Исследование иммуногенности и протективной эффективности таких вакцин имеет значение как для разработки самостоятельных препаратов для интраназальной вакцинации, так и для оценки перспектив их последующего применения в комбинированных схемах иммунизации.

Таким образом, диссертационная работа Кудрова Глеба Александровича посвящена актуальной проблеме современной вирусологии и вакцинологии — исследованию иммуногенности и протективной эффективности прототипов интраназальных вакцин на основе рекомбинантного вируса Сендай, экспрессирующих антигены вируса SARS-CoV-2.

**Соответствие темы диссертации паспортам научных специальностей.** Диссертационная работа полностью соответствует пунктам 5, 7, 10, 11 паспорта заявленной научной специальности 1.5.10 Вирусология (биологические науки).

**Основные результаты диссертационного исследования.** В рамках диссертационного исследования получены приоритетные результаты о возможности формирования протективного иммунного ответа путем интраназальной вакцинации животных рекомбинантными вирусными векторами на основе вируса Сендай штамма Москва, несущих ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2.

В ходе выполнения диссертационного исследования автором получены следующие значимые результаты:

1. Экспериментально охарактеризован профиль безопасности рекомбинантных RBD и полноразмерного гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 in vivo при интратрахеальном введении очищенных антигенов животным. Показано, что использование эукариотической системы экспрессии предотвращает развитие системного цитокинового шторма и острого повреждения лёгких.

2. Показана возможность экспонирования гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 на поверхности вирионов рекомбинантного вируса Сендай, что обеспечивает два механизма презентации антигена: непосредственно в составе вирусных частиц и посредством его экспрессии в инфицированных клетках. Такой подход создает предпосылки для индукции комплексного мукозального и системного иммунного ответа.

3. Доказана способность препарата на основе рекомбинантного вируса Сендай, несущего ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2, индуцировать специфический мукозальный и системный иммунный ответ у животных.

4. Доказана способность препарата на основе рекомбинантного вируса Сендай, несущего ген гликопротеина S вируса SARS-CoV-2, формировать протективный иммунный ответ у животных.

По теме диссертации опубликовано 7 работ, включая 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 3 тезиса докладов и 1 патент РФ на изобретение.

**Структура и общая характеристика диссертационной работы.** Диссертация изложена на 176 страницах машинописного текста и построена по классическому плану: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы (300 источников) и 4 приложения. Работа иллюстрирована 20 рисунками и 2 таблицами.

Текст диссертации начинается с главы Введение, где автор приводит обоснование актуальности исследования и степень разработанности темы исследования. Далее приведены цель и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследования, четыре положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов, сведения об апробации, о публикациях и о личном вкладе. Личный вклад автора раскрыт подробно и корректно: обозначены как этапы, выполненные лично соискателем, так и вклад соисполнителей.

В главе 1 автор проводит обзор литературы. Глава состоит из 8 разделов. В разделе 1.1 автор рассматривает общие сведения о вирусе SARS-CoV-2, его классификации и эволюции. В разделе 1.2 изложены данные об эволюции возбудителя. В разделе 1.3 автор приводит информацию о структурно-функциональной организации основного протективного антигена вируса SARS-CoV-2 – гликопротеина S. Раздел 1.4 посвящен ограничениям существующих системных парентеральных вакцин и логично переходит в раздел 1.5, в котором автор описывает особенности мукозального иммунного ответа и его значение для вакцинации. В разделе 1.6 приведено описание различных платформ, используемых для разработки интраназальных вакцин для профилактики COVID-19, а в разделе 1.7 приведено подробное описание векторов на основе вируса Сендай. Глава завершается разделом 1.8, в котором автор подводит итог всего обзора литературы.

В главе 2 автор приводит информацию по используемым материалам и методам. В разделе Материалы автор описывает рекомбинантные вакцинные

конструкции на основе вируса Сендай, рекомбинантные белки, использованные штаммы вируса SARS-CoV-2, использованные культуры клеток, синтетические пептиды, антитела, коммерческие наборы, питательные среды, реактивы, растворы и буферы, а также лабораторных животных и оборудование. В разделе Методы автор приводит подробное описание модели оценки провоспалительной активности антигенов, мультиплексного анализа цитокинов, прижизненной КТ, анализа экспрессии целевых иммуногенов, методы введения препаратов животным, процедуры отбора образцов крови и смывов у животных, определение специфического клеточного иммунного ответа, определение специфического гуморального иммунного ответа (методами ИФА и в реакции нейтрализации), определение титра вируса (ПЦР и высев), гистологический и патоморфологический анализ, а также методы, использованные для статистической обработки экспериментальных данных.

В главе 3 автор приводит результаты и обсуждение собственных исследований. Глава разделена на четыре раздела. Раздел 3.1 посвящен исследованиям провоспалительной активности рекомбинантных антигенов – полноразмерного гликопротеина S и рецептор-связывающего домена гликопротеина S вируса SARS-CoV-2. В разделе 3.2 автор приводит результаты оценки эффективности вакцинных конструкций на основе рекомбинантного вируса Сендай штамма Москва, экспрессирующих белки RBD и S варианта Дельта вируса SARS-CoV-2. В данном разделе приведена характеристика вакцинных конструкций, результаты исследования иммуногенности и протективности вакцинных конструкций на двух моделях животных: сирийских хомяках и мышах линии BALB/c. Следующий раздел 3.3 посвящен обоснованию смены антигенного состава. Глава завершается разделом 3.4, в котором автор приводит результаты оценки эффективности вакцинной конструкции на основе рекомбинантного вируса Сендай штамма Москва, экспрессируюшего гликопротеин S вируса SARS-CoV-2 JN.1. В данном разделе автор приводит характеристику вакцинной конструкции, результаты исследования иммуногенности (оценку специфических IgA, IgG и ВНА), а также результаты оценки защитной эффективности на модели hACE2-трансгенных мышей.

В финальной части работы представлены общее заключение и выводы, в которых систематизированы ключевые результаты проведенного исследования.

**Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Достоверность результатов обеспечивается значительным объемом экспериментальных данных и использованием современных методов

исследования. В работе использованы вирусологические, иммунологические, молекулярно-биологические, статистические методы, а также методы работы с животными. Выводы непосредственно следуют из представленных результатов, соответствуют поставленным задачам и отражают основные результаты проведенного исследования.

**Научная новизна исследования.** Научная новизна диссертационной работы заключается в получении новых экспериментальных данных об иммуногенности и протективной эффективности рекомбинантных вакцин на основе вируса Сендай при интраназальном введении, а также в обосновании выбора антигена для создания мукозальной вакцины против SARS-CoV-2.

В работе проведена оценка провоспалительной активности рекомбинантных RBD и полноразмерного S-белка варианта Дельта SARS-CoV-2 при их интратрахеальном введении hACE2-трансгенным мышам. Установлено, что введение исследованных антигенов не сопровождается развитием выраженного системного воспалительного ответа и повреждением легочной ткани, несмотря на транзиторное повышение уровня IL-6.

Показана возможность экспонирования полноразмерного S-белка SARS-CoV-2 на поверхности вирионов рекомбинантного вируса Сендай штамма Москва наряду с его внутриклеточной экспрессией. Такой способ представления антигена представляет интерес с точки зрения формирования гуморального и клеточного иммунного ответа при интраназальной иммунизации.

Существенным результатом работы является сравнительная оценка иммуногенности и протективной эффективности вакцинных конструкций, экспрессирующих RBD и полноразмерный S-белок SARS-CoV-2. Установлено, что использование полноразмерного S-белка обеспечивает более выраженный защитный эффект на исследованных животных моделях. В частности, показано, что однократное интраназальное введение рекомбинантного вируса Сендай, экспрессирующего полноразмерный S-белок варианта Дельта, обеспечивает отсутствие детектируемого инфекционного вируса у сирийских хомяков после заражения гомологичным вариантом SARS-CoV-2.

Отдельного внимания заслуживают результаты исследования обновленной вакцинной конструкции, экспрессирующей полноразмерный S-белок варианта JN.1. Показано, что однократная интраназальная иммунизация индуцирует системный и мукозальный гуморальный иммунный ответ, сопровождающийся формированием вируснейтрализующих антител широкой специфичности. На модели hACE2-трансгенных мышей продемонстрировано

отсутствие детектируемого вируса в дыхательных путях после заражения вариантом JN.1.

**Теоретическая и практическая значимость.** Теоретическая значимость диссертационной работы заключается в расширении представлений об особенностях формирования специфического иммунного ответа при интраназальном введении рекомбинантных вирусных векторов, экспрессирующих антигены SARS-CoV-2. Полученные результаты позволяют оценить влияние выбора антигена на иммуногенность и протективную эффективность вакцинных конструкций на основе вируса Сендай. Показано преимущество использования полноразмерного S-белка по сравнению с его рецептор-связывающим доменом для формирования защитного иммунного ответа на исследованных экспериментальных моделях. Данные об экспонировании S-белка на поверхности рекомбинантных вирионов наряду с его внутриклеточной экспрессией дополняют представления об особенностях представления антигенов при использовании данной векторной платформы.

Практическая значимость работы определяется получением экспериментальных данных, необходимых для дальнейшей разработки интраназальных вакцин против SARS-CoV-2. В ходе исследования подтверждена возможность использования векторной платформы на основе рекомбинантного вируса Сендай штамма Москва для создания препаратов для специфической профилактики COVID-19. В рамках исследования автором была продемонстрирована способность разработанных вакцинных конструкций индуцировать системный и мукозальный иммунный ответ после интраназальной вакцинации животных, а также обеспечивать защиту лабораторных животных от экспериментальной инфекции после однократного интраназального введения. Полученные результаты могут быть использованы при дальнейшем совершенствовании антигенного состава мукозальных вакцин и проведении последующих доклинических исследований.

**Значение полученных результатов для развития соответствующей отрасли науки.** Результаты диссертационной работы имеют значение для развития вирусологии и вакцинологии, прежде всего в области создания мукозальных вакцин против респираторных вирусных инфекций. Полученные данные расширяют представления о возможностях использования рекомбинантного вируса Сендай в качестве платформы для интраназальной иммунизации и позволяют более обоснованно подходить к выбору антигенов при разработке векторных вакцин.

**Основные замечания и вопросы по рассматриваемой работе.**

Принципиальных замечаний нет. В работе имеются минимальные орфографические и пунктационные ошибки и опечатки, а также технические

неточности в оформлении списков и аббревиатур. В порядке дискуссии хотелось бы отметить ряд вопросов, возникших при ознакомлении с диссертацией.

1. В работе неоднократно используется термин «стерилизующий иммунитет» для характеристики защиты, формируемой разработанными вакцинными конструкциями. Вместе с тем отсутствие детектируемого инфекционного вируса в исследованных тканях на 5-6-е сутки после заражения не исключает возможности его репродукции на более ранних этапах инфекции, особенно с учетом обнаружения вирусной РНК в легких и носовых раковинах вакцинированных животных. В связи с этим представляется целесообразным уточнить критерии, на основании которых автор делает вывод о формировании именно стерилизующего иммунитета.

2. В работе показано, что однократная интраназальная иммунизация рекомбинантными вирусами Сендай, экспрессирующими RBD или полноразмерный гликопротеин S вируса SARS-CoV-2, индуцирует у мышей BALB/c сопоставимые высокие уровни вируснейтрализующих антител (среднегеометрические титры 127 и 184, соответственно). Вместе с тем протективная эффективность исследованных вакцинных конструкций существенно различается. Учитывая, что вируснейтрализующие антитела рассматриваются в качестве одного из основных коррелятов защиты при SARS-CoV-2-инфекции, возникает вопрос: чем автор объясняет различия в протективной эффективности вакцинных конструкций при относительно близких титрах нейтрализующих антител?

3. Какова предполагаемая продолжительность протективного иммунитета после интраназального введения разработанных вакцинных конструкций, и насколько устойчивым может быть индуцированный системный и мукозальный иммунный ответ?

Перечисленные замечания и вопросы носят дискуссионный характер, не ставят под сомнение достоверность полученных результатов и не снижают общей положительной оценки диссертационной работы.

**Заключение.** Диссертационная работа Кудрова Глеба Александровича «Иммуногенность и протективность интраназальных векторных вакцин на основе вируса Сендай против SARS-CoV-2-инфекции, вызванной актуальными вариантами коронавируса», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология (биологические науки), представляет собой законченную научно-квалификационную работу, в которой решена актуальная научная задача по разработке и оценке доклинической эффективности мукозальных вакцин.

По актуальности, научной новизне, высокому научно-методическому уровню, совокупности новых научных результатов и научно-практической значимости диссертационная работа Кудрова Глеба Александровича «Иммуногенность и протективность интраназальных векторных вакцин на основе вируса Сендай против SARS-CoV-2-инфекции, вызванной актуальными вариантами коронавируса» соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, согласно п. 9–14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 и последующих редакций Постановлений Правительства РФ (№335 от 21.04.2016; №748 от 02.08.2016; №1024 от 28.08.2016; 1168 от 01.10.2018; №426 от 20.03.2021; 1539 от 11.09.2021; №1690 от 26.09.2022; № 101 от 26.01.2023; № 415 от 18.03.2023; №1786 от 26.10.2023 № 1382 от 16.10.2024, с изменениями и дополнениями, вступившими в силу с 01.01.2025), а ее автор, Кудров Глеб Александрович, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 - Вирусология (биологические науки).

**Официальный оппонент:**
Ведущий научный сотрудник,
Заведующий лабораторией Государственной коллекции вирусов,
Заведующий отделом Государственной коллекции вирусов
ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России
кандидат биологических наук

_____ /Шулякова Инна Вадимовна/
«06» декабря 2026 г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18. Телефон: 8-499-193-30-01. Электронная почта: info@gamaleya.org

Подпись Шуляковой И.В. заверяю:
Ученый секретарь
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России
кандидат биологических наук _____ /Сысолятина Е.В./