

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

ИНСТИТУТ
ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ

СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИХБФМ СО РАН)

Просп. ак. Лаврентьева, 8, г. Новосибирск, 630090
тел. (383) 363-51-50
факс (383) 363-51-53
E-mail: nibocho@nibocho.nsc.ru
http://www.nibocho.nsc.ru

УТВЕРЖДАЮ

И.о. директора ИХБФМ СО РАН
к.х.н. Владимир Васильевич Коваль



06.05.2024 № 15245-22-06/250

На № _____

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Боргояковой Марии Борисовны
«ДНК и ДНК/белковая вакцины для профилактики COVID-19»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология

Актуальность темы исследования

Пандемия COVID-19 - острого респираторного заболевания, вызванного коронавирусом SARS-CoV-2, отчетливо показала недостаточную готовность и системы ВОЗ, и научного сообщества, и соответствующих государственных служб, к появлению нового вирусного агента. Исторически сложилось, что наиболее эффективным способом предотвращения распространения вирусных заболеваний, включая пандемию, является массовая вакцинация, которая может не только сократить число заболевших, но и облегчить тяжесть течения заболевания. Именно поэтому пандемия COVID-19 привела к колоссальному скачку исследований в области создания вакцинных препаратов на разных платформах, включая традиционные, основанные на инактивированных вирусах или рекомбинантных белках, а также инновационные, используемые до этого только в узких целях, такие как мРНК-вакцины и вакцины на основе вирусных векторов. Кроме того, в это же время было одобрено использование на людях первой ДНК-вакцины. Следует отметить, что наряду с рядом существенных достоинств ДНК-вакцин, одним из их основных недостатков является низкая иммуногенность при введении в организм «голой» плазмидной ДНК, что требует создания

средств их доставки в клетки –мишени, а также использования комплексных подходов повышения иммуногенности ДНК-вакцин. Именно эти задачи решались Боргояковой М.Б. в данной диссертационной работе, целью которой являлась разработка экспериментальных ДНК- и ДНК/белковых вакцин для профилактики COVID-19 и в изучении их иммуногенных и протективных свойств на мышах линии BALB/c. Кроме того, сама технология ДНК вакцин является достаточно новой и требует дальнейшего изучения и совершенствования.

Таким образом, актуальность и практическая значимость темы диссертационной работы Боргояковой Марии Борисовны, связанной с разработкой ДНК- и ДНК/белковых вакцин для профилактики COVID-19 не вызывают никаких сомнений.

Научная новизна, обоснованность и достоверность выносимых на защиту положений, научных выводов, рекомендаций и заключений, сформулированных в диссертации

В ходе выполнения диссертационной работы Боргояковой М.Б. был получен результаты, имеющие большое практическое значение и защищенные патентами РФ. В частности, были разработаны две плазмиды pVAXrbd и pBSI-COV-Ub, первая из которых обеспечивала экспрессию в эукариотических клетках и секрецию во внеклеточное пространство белка RBD, а вторая - кодировала искусственный полиэпитопный белок, собранный из фрагментов белков E, M, N, S вируса SARS-CoV-2, узнаваемых комплексами МНС I и II мыши и человека. При конструировании плазмиды pVAXrbd в последовательность RBD была введена оригинальная сигнальная последовательность, представляющей из себя гибрид сигнальных последовательностей люциферазы и фиброина, обеспечивающая секрецию синтезированного трансгена. Структура и свойства этих плазмид защищены патентами РФ (Патенты на изобретение РФ №2754230 от 30.08.2021 г., №2806556 и №2806590 от 01.11.2023 г.)

Кроме того, для повышения иммуногенности ДНК-вакцины были получены самособирающиеся наночастицы, представляющие из себя комплекс плазмидной ДНК и конъюгата рекомбинантного белка RBD с поликатионом полиглюкин-спермидин. Эта разработка также защищена патентом РФ (№2781294 от 11.10.2022 г.)

В целом, используемые в работе подходы к созданию ДНК-вакцин против SARS-CoV-2 нельзя назвать принципиально новыми, однако используемая автором комбинация разных подходов по повышению их активности, безусловно, является оригинальной разработкой.

Результаты получены с использованием современных методов, молекулярной биологии, генной инженерии и иммунологии. Для оценки

достоверности полученных данных автором применены адекватные статистические методы. Обоснованность и достоверность выдвигаемых на защиту положений не вызывает сомнений.

Достоверность полученных результатов подтверждается шестью публикациями в отечественных и зарубежных журналах. По результатам выполнения работы получены три патента РФ на плазмиды, кодирующие собственно ДНК-вакцины и один патент РФ на средства их доставки в организм.

Структура и общая характеристика диссертационной работы

Диссертация Боргояковой М.Б. построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Текст диссертации изложен на 127 страницах, включает 20 рисунков и 6 таблиц. Список литературы включает 275 источников.

В разделе «Введение» определена актуальность темы исследования, обозначены научная новизна и практическая значимость работы, а также представлены цель и задачи исследования и положения, выносимые на защиту.

Глава 1 «Обзор литературы» посвящена анализу литературных источников в области разработки вакцин против COVID-19. В обзоре последовательно рассмотрены различные типы вакцин от классических - инактивированных вакцин, заканчивая мРНК- и ДНК- вакцинами, причем основной акцент сделан на те подходы/вакцинные препараты, которые находятся на разных стадиях доклинический и клинических исследований или представляют собой коммерчески доступный препарат. Для каждого типа вакцин приведены способы их введения в организм и пути повышения иммунного ответа. В целом, обзор интересный, содержит большой объем информации, необходимой для понимания сути диссертационной работы, однако данный обзор носит все-таки описательный, а не аналитический характер.

В главе «Материалы и методы» описаны использованные в работе генно-инженерные методы получения плазмидных ДНК, методы работы с клеточными культурами, а также методы оценки иммуногенности и протективности вакцин *in vivo*. Все методы, в том числе и статистические, являются современными и адекватными поставленным задачам.

В главе «Результаты и их обсуждение» детально отражены результаты, полученные в работе, и проведены их анализ и интерпретация. Глава 3 фактически состоит из двух больших блоков исследований, из которых первый посвящен созданию комбинированной ДНК/белковой вакцины, а второй - созданию ДНК-вакцины, кодирующей искусственный

полиэпитопный иммуноген, содержащий эпитопы разных белков вируса SARS-CoV-2 и сигналы, стимулирующие Т-клеточный иммунитет.

ДНК-белковая вакцина состояла из плазмиды, pVAXrbd, кодирующей рецептор связывающий домен (RBD) белка S вируса SARS-CoV-2, поскольку известно, что большинство нейтрализующих антител узнают этот домен. Для улучшения иммуногенных свойств данной ДНК-вакцины автор диссертационной работы использовал оптимизацию состава кодонов, а также вторичной структуры мРНК для эффективной экспрессии в клетках млекопитающих. Кроме того, в структуру белка были включена оригинальная сигнальная последовательность, являющаяся гибридом сигнальных последовательностей активно секретируемых белков люциферазы и фиброина, обеспечивающая эффективный транспорт белка RBD из клетки.

Интересным аспектом в создании ДНК-белковой вакцины является использование для доставки плазмидной ДНК *in vivo* ее компактизации в наночастицы с использованием конъюгата рекомбинантного белка RBD с разработанным ранее в ГНЦВБ «Вектор» катионным полимером полиглюкин-спермидин. В результате был создан препарат CCR-RBD, представляющий собой ДНК-белковую вакцину, обеспечивающую активацию и клеточного, и гуморального иммунного ответа, что и было достоверно показано Боргояковой М.Б.

Второй блок исследований посвящен созданию и анализу иммуногенных свойств ДНК-вакцины, кодирующей искусственный полиэпитопный иммуноген, стимулирующей Т-клеточный иммунитет. Для этого автором была использована стратегия, основанная на выборе фрагментов нескольких вирусных белков (S, N, M и E), содержащих кластеры перекрывающихся эпитопов. После объединения фрагментов в одну последовательность к её N-концу добавили универсальный Т-хелперный эпитоп. Кроме того, для усиления иммуногенных свойств в состав последовательности, кодирующей трансенг ввели и последовательность, кодирующую убиквитин, а ДНК-вакцина получила название pBSI-COV-Ub. В результате автором работы были получены две ДНК-вакцины: содержащие и не содержащие убиквитин. Интересным является тот факт, что анализ иммуногенных свойств (активация Т-клеточного ответа) полученных ДНК-вакцин, показал, что pBSI-COV-Ub лучше активировала Т клеточный ответ, однако отличия от pBSI-COV были статистически недостоверными.

Как и в случае с ДНК-вакциной pVAXrbd, для компактизации и доставки *in vivo* ДНК-вакцины pBSI-COV-Ub М.Б. Боргоякова использовала конъюгат RBD с полиглюкин-спермидин (PGS-RBD), а соответствующие наночастицы, получившиеся в результате связывания pBSI-COV-Ub с PGS-

RBD - комбинированная вакцина CCV-BSI - вызывали после иммунизации лабораторных животных формирование высоких значений гуморального и клеточного иммунитета.

В заключении автором кратко обобщены полученные результаты и изложены (тоже кратко) перспективы использования созданных ДНК- и комбинированных вакцин. Переход к выводам логически обоснован.

Положения, выносимые на защиту, и выводы полностью соответствуют поставленным задачам и полученным данным. Автореферат соответствует содержанию и выводам диссертации, оформлен в традиционном стиле и соответствует установленным требованиям.

Значение полученных соискателем результатов исследования для развития соответствующей отрасли науки

Проведенные М.Б. Боргояковой исследования и полученные научные результаты обладают безусловной важностью для развития молекулярно-биологического направления, связанного с разработкой вакцинных и терапевтических препаратов на основе ДНК. Полученные в диссертационном исследовании результаты подтверждают принципиальную возможность использования выбранного подхода для создания ДНК-вакцин против COVID-19. Полученные в работе научные данные имеют важное практическое значение для разработки новых вакцин на основе ДНК, а также вносят вклад в понимание фундаментальных механизмов их действия.

Рекомендации по использованию результатов и выводов, приведенных в диссертации

Разработка ДНК-вакцин в настоящее время ведется во многих ведущих странах мирах, обладающих собственной биотехнологической промышленностью. Вакцины на основе ДНК обладают большими преимуществами по сравнению с РНК-вакцинами, среди которых наиболее важными являются развитые генно-инженерные подходы и технологическая база, легкость получения, относительная безопасность, и, конечно, стабильность в широком диапазоне условий. Кроме того, ДНК-вакцины способны индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет. Недостатком ДНК-вакцин, как и любых препаратов на основе нуклеиновых кислот - является проблема их доставки в организм. Результаты, полученные Боргояковой М.Б. показавшие перспективность исследований в данном направлении, имеют важное прикладное значение и могут быть использованы для разработки инновационных вакцинных препаратов против COVID-19. Разработанные методы и подходы, могут быть в дальнейшем применены в процессах опытно-промышленного производства ДНК-вакцин на базе профильных научных организаций или биотехнологических компаний.

Замечания и вопросы

1. Основным замечанием по диссертации Боргояковой М.Б. является излишняя краткость изложения результатов, отсутствие их анализа и сопоставления собственных результатов автора с результатами, приведенными в обзоре литературы.
2. Отсутствует обсуждение полученных результатов, оценка полученных уровней активации клеточного и гуморального иммунитета под действием каждой из ДНК-вакцин с точки зрения необходимой для получения терапевтического эффекта.
3. Не ясно, проводилось ли в параллельном эксперименте сравнение иммуногенных свойств CCV-BSI и CCV-RBD.
4. Ввиду краткости изложения не ясно как оценивалось синергическое действие комбинированных препаратов. Понятно, что плазмидная ДНК без доставки практически не работает. Из приведенных данных невозможно рассчитать индекс синергии, если она есть на самом деле.
5. В Заключении по Диссертации не сформулированы перспективы дальнейшего развития исследований в области ДНК-вакцин против COVID-19.
6. Есть опечатки в терминах, например, биослойная интерферометрия вместо бислойная интерферометрия и некоторые другие.

Приведенные замечания носят дискуссионный характер и не уменьшают научную и практическую значимость диссертационной работы М.Б. Боргояковой.

Заключение

Диссертационная работа Боргояковой Марии Борисовны «ДНК и ДНК/белковая вакцины для профилактики COVID-19» по актуальности, объему проведенных исследований, методическому уровню, научной ценности и практической значимости отвечает критериям, установленным п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (в действующей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям, поскольку является научно-квалификационной работой, в которой созданы прототипы двух ДНК-вакцинных препаратов и показано, что комбинация различных стратегий, улучшающих иммуногенность ДНК вакцин, включающих оптимизацию кодонного состава, присоединение сигнальных последовательностей и использование средств доставки, позволяют получить вакцинные препараты, способные индуцировать специфический иммунный ответ и снизить вирусную нагрузку в легких при заражении вирусом. На основании всего вышесказанного, автор данной

диссертационной работы, Боргоякова Мария Борисовна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Отзыв заслушан и одобрен на заседании межлабораторного семинара ИХБФМ СО РАН 03.05.2024 г. (протокол №19).

Отзыв подготовила:

Заведующая лабораторией биохимии нуклеиновых кислот
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН
Зенкова Марина Аркадьевна


Зенкова Марина Аркадьевна, басму
биологических наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8
Телефон: (383)363-51-60
Эл. почта: marzen@niboch.nsc.ru

«Подпись Зенковой Марины Аркадьевны заверяю»
ученый секретарь ФГБУН Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН
к.б.н. Логашенко Евгения Борисовна



«06» мая 2024 г.