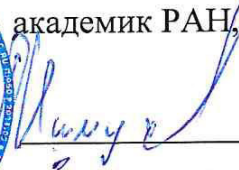


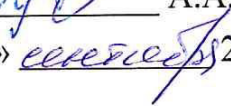
«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ФГАНУ
«Федеральный научный центр
исследований и разработки
иммунобиологических препаратов»
(Институт полиомиелита)

академик РАН, профессор, д.м.н.



 А.А. Ишмухаметов

«3»  2025 г.

ОТЗЫВ

о научно-практической значимости диссертационной работы Кисакова Дениса Николаевича на тему: «Доставка экспериментальных ДНК- и мРНК-вакцин против COVID-19 с помощью электропорации и струйной инъекции», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.3. Молекулярная биология и 1.5.10. Вирусология

Актуальность темы диссертационной работы

В настоящее время накоплен большой опыт широкого применения вакцин на основе нуклеиновых кислот, ДНК и мРНК, возможность получения которого мы не могли даже предположить 5 лет назад. Это позволило выявить недостатки таких препаратов и разрабатывать подходы к их устранению. Использование нуклеиновых кислот для доставки генов в клетки для индукции противовирусного иммунитета позволяет преодолеть ограничения, с которыми столкнулись «классические» вакцины, и расширить спектр инфекций, управляемых средствами вакцинации. Таким образом, этот тип вакцин прочно вошёл в повседневную разработку профилактических препаратов, и требует разработки путей для устранения известных недостатков, одним из которых является доставка антиген-кодирующей конструкции. Диссертационная работа посвящена разработке параметров двух способов доставки, электропорации и струйной инъекции, ДНК- и мРНК-конструкций для вакцинации с последующей оценкой эффективности иммунизации на животной модели с определением уровней антительного и клеточного иммунного ответа. В качестве тестового антигена использован рецептор-связывающий домен (RBD) SARS-CoV-2.

Соответствие темы диссертации указанной специальности

Содержание диссертации соответствует специальностям 1.5.3. «Молекулярная биология» (Направления исследований 6. Молекулярная

вирусология и противовирусные вещества и 7. Генная, белковая и клеточная инженерия), 1.5.10. «Вирусология» (Направления исследований 7. Изучение противовирусного иммунитета, иммунохимические исследования вирусных антигенов, изучение гуморального, клеточного иммунитета и иммунопатологических реакций и 10. Разработка мер предупреждения, диагностики и лечения вирусных заболеваний, совершенствование лабораторной диагностики, терапии, и иммунопрофилактики вирусных инфекций, проблемы санитарной вирусологии).

Основные результаты диссертационной работы

В диссертации Кисакова Д.Н. можно выделить две части исследования. В первой части с использованием ДНК- и мРНК-конструкций, кодирующих ген зелёного флуоресцентного белка (GFP), полученных и охарактеризованных автором, подобраны условия безыгольной иммунизации мышей линии BALB/c методами электропорации и струйной инъекции. Подбор протокола проводили по оценке следующих параметров: травматичность по гистологическому исследованию тканей места введения, эффективность экспрессии GFP в тканях локально, а также возможность распространения конструкции по организму по экспрессии GFP вне места инъекции.

Были подобраны условия электропорации плазмидной конструкцией, которые характеризовались низким уровнем травматичности и обеспечивали высокий уровень экспрессии целевого белка. Однако, этот метод доставки оказался неэффективным для доставки мРНК-конструкций.

Использование струйной инъекции позволило разработать протоколы эффективной и безопасной доставки конструкций на основе обеих видов нуклеиновой кислоты. При этом, мРНК-конструкция доставлялась без дополнительной упаковки, хорошо распространялась в тканях у места введения, но не распространялась системно.

После подбора параметров протокола иммунизации и его применимости для доставки той или иной нуклеиновой кислоты, проводили иммунизацию мышей линии BALB/c целевыми конструкциями, кодирующими ген рецептор-связывающего домена (RBD) SARS-CoV-2, с последующей оценкой параметров иммунного ответа: уровень общих антител к RBD (в ИФА), уровень нейтрализующих антител (в реакции нейтрализации с живым вирусом или в псевдовиральной системе), накопление спленоцитов, реактивных к RBD (методом ELISpot). А также проводили оценку защитного эффекта иммунизации при заражении мышей линии BALB/c вариантом Гамма SARS-CoV-2, разработанной другой научной группой.

Исследование эффективности 2-кратной иммунизации плазмидой, несущей ген RBD, с доставкой методом электропорации в четырехглавую мышцу бедра задней лапы мышей показало, что данный метод вызывает формирование более

высоких уровней общих и нейтрализующих антител, а также большее количество гамма-ИФН-продуцирующих специфически активированных спленоцитов, чем иммунизация внутримышечным шприцевым введением.

При 2-кратном введении той же плазмиды методом струйной инъекции в четырехглавую мышцу бедра задней лапы мышей также показано формирование высоких уровней общих и нейтрализующих антител, и гамма-ИФН-продуцирующих специфически активированных спленоцитов. При этом у иммунизированных мышей после заражения вариантом Гамма SARS-CoV-2 наблюдалось снижение содержания вирусной РНК в лёгких. Для оптимизации протокола иммунизации на этой стадии исследования также была проведена оценка эффективности иммунизации в зависимости от дозы, вводимой плазмиды, и было показано, что уровень антител, достигнутый при введении дозы 50 мкг, уже достаточен для обеспечения снижения содержания вирусной РНК в лёгких при поствакцинальном заражении животных.

Далее исследована эффективность иммунизации мРНК-конструкцией, кодирующей ген RBD, при струйной инъекции в четырехглавую мышцу бедра задней лапы мышей. Показано, что данный вид доставки индуцирует формирование высоких уровней общих и нейтрализующих антител, а также гамма-ИФН-продуцирующих специфически активированных спленоцитов. При этом, уровни активации антительного и клеточного ответа были выше или сравнимы с уровнями, вызванными иммунизацией той же конструкцией, но в составе липидных наночастиц с их внутримышечной шприцевой инъекцией. При этом у мышей, иммунизированных струйной инъекцией или липидными наночастицами, после заражения вариантом Гамма SARS-CoV-2 наблюдалось сравнимое снижение содержания вирусной РНК в лёгких.

Достоверность полученных результатов

Эксперименты проведены с использованием современных методов исследования на правильно подобранном современном оборудовании. Полученные экспериментальные данные обработаны с применением адекватных статистических методов, описание которых приведено в главе Методы, а также в соответствующих разделах Результаты. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения.

Научная новизна диссертационной работы

Впервые была проведена черескожная иммунизации животных мРНК-вакциной без дополнительной упаковки с помощью струйной инъекции. При этом уровни активации антительного и клеточного ответа сопоставимы с таковыми при иммунизации мРНК-вакциной, упакованной в липидные наночастицы.

Теоретическая значимость работы

В диссертационной работе показано увеличение эффективности иммунизации ДНК-конструкцией (плазмидой) при использовании метода электропорации по сравнению с внутримышечной инъекцией.

Показана возможность черескожной иммунизации животных мРНК-вакциной без дополнительной упаковки с помощью струйной инъекции, при этом уровни активации антительного и клеточного ответа сопоставимы с таковыми в мРНК-вакциной, упакованной в липидные наночастицы.

Научно-практическая значимость работы

Диссертационная работа имеет несомненную научно-практическую значимость. Разработаны и апробированы протоколы электропорации области четырёхглавой мышцы мышцей линии BALB/c для доставки ДНК-конструкций, характеризующиеся низким уровнем травматичности и высоким уровнем экспрессии целевого белка в месте введения, и показана иммунологическая эффективность данного метода для иммунизации плазмидой, содержащей ген рецептор-связывающего домена (RBD) SARS-CoV-2.

Разработаны и апробированы протоколы струйной инъекции ДНК и мРНК конструкций в четырехглавую мышцу бедра задней лапы мышцей линии BALB/c, характеризующиеся низкой травматичностью, экспрессией целевого белка локально, без системного распространения. На примере ДНК плазмиды и мРНК-конструкции, кодирующих ген рецептор-связывающего домена (RBD) SARS-CoV-2, показана активация антительного и клеточного ответа при иммунизации методом струйной инъекции по разработанному протоколу.

Предложенные протоколы электропорации и струйной инъекции являются эффективными способами доставки ДНК- и мРНК-конструкций, и могут стать отправной точкой при выборе условий доставки вакцинных препаратов на основе нуклеиновых кислот.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа имеет традиционную структуру, изложена на 163 страницах машинописного текста и включает главы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список цитированной литературы, и имеет приложение. Работа иллюстрирована 34 рисунками и 6 таблицами. Список литературы включает 288 источников.

В главе «Введение» обоснована актуальность темы и необходимость проведения настоящего исследования, поставлены цель и задачи, суммированы научная новизна и практическая значимость работы, суммированы положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробации результатов, а также личный вклад автора.

Глава «Обзор литературы» соответствует теме диссертации, демонстрирует знание диссертантом современной научной литературы по теме исследования,

содержит описание вируса SARS-CoV-2, его репликативного цикла и особенностей иммунного ответа, вакцин на основе нуклеиновых кислот и различных систем доставки со свойственными им преимуществами и недостатками, и, самое важное, с результатами использования в доклинических и клинических испытаниях.

Глава «Материалы и методы» написана достаточно детально. Содержит описание использованных в работе материалов, культур клеток (однако описание линии клеток НЕК293Т утеряно, несмотря на использование её для трансфецирования не один раз в ходе исследования) и штаммов SARS-CoV-2, методов работы с бактериями и клетками эукариот, получения и характеристики ДНК-плазмид и мРНК-конструктов, работы с лабораторными мышами и оценки параметров иммунного ответа.

В главе «Результаты и их обсуждение» подробно описана экспериментальная часть диссертационной работы, заключающаяся в создании генетических ДНК- и мРНК-конструкций для иммунизации мышей, разработке протоколов электропорации и струйной инъекции для их эффективной доставки в организм мыши, и последующей оценке эффективности иммунизации по оценке параметров антительного и клеточного иммунитета, а также снижения наличия вирусной РНК в легких иммунизированных мышей при заражении живым вирусом. Также в рамках этой главы проведено обоснование выбранных протоколов и экспериментальных моделей и сопоставление полученных результатов с данными литературы.

Отдельно хочется положительно отметить выбор гетерологичного штамма для проведения реакции нейтрализации: линии PANGO B.1.1 против исходного Wu-1, использованного для иммунизации. Это позволяет избежать описания частного эффекта иммунизации конкретной генетической конструкцией. Однако при оценке антител с помощью ИФА не указана последовательность белка, использованная в качестве иммуносорбента, что не позволяет понять соответствия антигена для иммунизации и антигена для ИФА и специфичности антител.

Глава «Заключение» суммирует полученные в диссертационной работе данные, «Выводы» - обоснованы.

Материалы диссертации доложены на 7 российских и международных конференциях, прошедших на территории РФ и Республики Кыргызстан. Основные результаты диссертации представлены в 17 печатных работах, в том числе 5 статьях в научных журналах, входящих в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук и доктора наук, 12 публикаций в сборниках тезисов конференций.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Однако выявлено *несоответствие*: на стр. 4 указано, что опубликовано 6 статей по диссертационной работе, но в списке публикаций на стр. 20, как и в приложении А диссертации, приведены только 5.

По диссертации имеются некоторые вопросы и замечания:

В ходе диссертационной работы выяснено, что применение электропорации не эффективно для доставки мРНК-конструкций. Какие модификации конструкции или её упаковку можно было бы рассмотреть для возможного улучшения эффективности доставки таким физическим способом?

В диссертации оцениваются параметры на примере ДНК- и мРНК-конструкции гена RBD SARS-CoV-2, при этом ни в Материалах и Методах, ни в Результатах не приводится последовательность взятого гена или хотя бы его соответствия какому-то варианту вируса. По другим частям диссертации можно предположить, что взятая последовательность соответствует гену S исходного штамма Wuhan-1, однако напрямую это нигде не приведено.

В диссертации приведены результаты нескольких экспериментов на животных для оценки эффективности доставки самих конструкций и сравнения методов, а также для оценки эффективности вакцинации конструкции с помощью выбранного метода доставки. Однако в Главе Материалы и методы приводится только 1 протокол этического комитета. Относится ли он ко всем проведённым исследованиям с участием лабораторных животных?

Критериям при выборе протокола введения ДНК и мРНК конструкций выбраны гистологическая оценка распространения препарата из места введения, повреждения в месте введения и иммуногенность вакцины. Интересно было бы посмотреть на оценку общего состояния (вес, клиническое состояние и т.п.) животных после проведения иммунизации по разработанным протоколам

В диссертации приводится утверждение, что варианта Гамма «SARS-CoV-2 был выбран на основе восприимчивости мышей линии BALB/c», что показано в приводимой ссылке на литературу (ссылка 272). Однако, при выборе дозы ссылка на литературу не соответствует обозначенному факту, а выбранные сроки эвтаназии не соответствует конечным точкам, рассматривавшийся в исходной статье (ссылка 272). Также представляется не совсем корректным говорить о защитной эффективности вакцинации на основании данных, полученных на низковосприимчивых животных, в которых наблюдается выделение вируса и вирусной РНК в течение 120 ч с постоянным снижением титров, поскольку наблюдаемое снижение вирусной нагрузки в тканях лёгких может быть связано не только с формированием специфического адаптивного иммунного ответа.

Текст диссертации и автореферата, к сожалению, написан очень невнимательно: изобилует орфографическими и пунктуационными ошибками, несогласованиями, неотредактированным машинным переводом, неудачными

формулировками (например, ...макроорганизм на основе нуклеиновых кислот...) и терминологическими ошибками (например, вакцина на основе нескольких иммуногенов названа универсальной, а не комбинированной); некоторые сокращения также могут меняться в процессе написания текста (СИ и С/И); род и вид вирусов приводятся без курсива. Форматирование текста и ссылок на литературные данные, включая список собственных публикаций автора, не однообразно по диссертации, а переносы таблиц на другую страницу оформлены неверно (отсутствует перенос заголовков столбцов). А также приходится отмечать низкое качество (разрешение) рисунков, которое часто не позволяет прочесть подписи на рисунке (например, рисунок 11). Также иногда отсутствуют ссылки при использовании заимствованных иллюстраций (например, рисунок 1). Список сокращений включает не все сокращения, введенные в тексте диссертации.

Русскоязычные источники приводятся в английской транскрипции, несмотря на то, что англоязычная версия статьи отсутствует, например, ссылка 272.

Высказанные замечания не снижают достоверность полученных результатов и обоснованность сделанных выводов.

Заключение

Диссертационная работа Кисакова Дениса Николаевича на тему: «Доставка экспериментальных ДНК- и мРНК-вакцин против COVID-19 с помощью электропорации и струйной инъекции», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.3. Молекулярная биология и 1.5.10. Вирусология является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальных задач, имеющих существенное значение практическое значение для создания и применения современных рекомбинантных вакцин, на основе генетических конструкций.

Диссертация Кисакова Д.Н. полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 в редакции постановления Правительства РФ от 30.07.2014 г. № 723, от 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 26.05.2020 г. № 751, от 20.03.2021 г. №426, от 11.09.2021 г. №1539, от 26.09.2022 г. №1690, 26.01.2023 г. №101, 18.03.2023 г. №415, 26.10.2023 г. №1786, от 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 №1382), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.3. Молекулярная биология и 1.5.10. Вирусология.

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на расширенном заседании отдела актуальных и вновь возникающих инфекций с пандемическим потенциалом (протокол №7 от 03.09.2025 г.)

Отзыв составил:

Заведующий отделом актуальных и вновь возникающих инфекций с пандемическим потенциалом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»

(Институт полиомиелита)

доктор биологических наук

e-mail: kozlovskaya_li@chumakovs.ru

тел.+7 (495)841 90-54, доб. (3137)

Любовь Игоревна Козловская

Заведующий лабораторией молекулярной биологии вирусов

ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)

кандидат биологических наук

shustova_eu@chumakovs.ru

тел.+7 (495)841 01-91, доб. (3744)

Елена Юрьевна Шустова

Подпись д.б.н. Л.И. Козловской, к.б.н. Е.Ю. Шустовой заверяю:

Ученый секретарь

ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»

(Институт полиомиелита),

кандидат биологических наук

«3» сентября 2025 г.



А.В. Белякова

Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. 108819, город Москва, внутренний территориальный городской муниципальный округ Филимонковский, посёлок Института полиомиелита, дом 8, корпус 1, тел. (495) 841–90–02, факс (495) 549–67–60. E-mail: sue_polio@chumakovs.ru, www.chumakovs.ru