

**ОТЗЫВ официального оппонента**

**доктора биологических наук Дейнеко Елены Викторовны  
на диссертационную работу Старостиной Екатерины Владимировны  
«ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие искусственные антигены вируса  
гриппа», представленную к защите на соискание  
ученой степени кандидата биологических наук по специальности  
1.5.3 – молекулярная биология, биологические науки**

**Актуальность темы диссертационной работы**

По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно среди населения Земного шара фиксируется от трех до пяти миллионов случаев заболеваемости гриппом, приводящих к смертельным исходам (250-5000 тыс. человек). Грипп относится к вирусным заболеваниям, его возбудитель характеризуется высокой степенью изменчивости. Именно такие патогены способны приводить к прогрессирующему распространению инфекции среди человеческой популяции и становиться причиной возникновения широкомасштабных эпидемий. Поскольку возникновение и широко масштабное распространение гриппа не поддается прогнозированию, то совершенно очевидно, что угроза пандемии, подобной «испанке» с потерями в начале 20-го столетия до 50-ти миллионов жизней, все еще продолжает существовать.

Основным методом защиты населения от гриппа является вакцинация, однако эффективность современных гриппозных вакцин недостаточна для предотвращения ежегодных эпидемий и периодических пандемий. Применение традиционных инактивированных вакцин обеспечивает защиту только при совпадении антигенной структуры компонентов вакцины и циркулирующих штаммов. Высокая скорость мутаций в вирусном геноме приводит к быстрой смене циркулирующих штаммов вируса гриппа, что обуславливает необходимость ежегодного пересмотра состава существующих гриппозных вакцин. Кроме того, из-за ошибок в прогнозировании циркулирующих штаммов вируса эффективность вакцинации сезонными вакцинами может резко снижаться. В связи с этим, разработка универсальной гриппозной вакцины приобретает особую актуальность.

Разработанные к настоящему времени методы и подходы в области молекулярной биологии, иммунологии, вакцинологии, клеточной и синтетической биологии, а также биоинформатики, позволяют по-новому взглянуть на открывающиеся возможности создания более совершенных средств защиты от патогенов вирусного и бактериального происхождения, лишенных выше перечисленных недостатков. Применение методов современной биологии дает возможность идентифицировать и изолировать биологические макромолекулы или их фрагменты, которые можно было бы использовать в качестве иммуногенных компонентов для активации иммунной системы в ответ на патоген. Такими компонентами могут выступать белки патогенов (например, белки оболочек возбудителей инфекции), являющиеся иммуногенами. С применением генно-инженерных технологий в настоящее время успешно развивается направление по созданию рекомбинантных субъединичных – искусственно созданных белковых молекул и ДНК-вакцин. Именно этому направлению исследований и посвящена диссертационная работа Е.В. Старостиной, нацеленная на создание иммуногенов, состоящих из консервативных фрагментов белков различных штаммов вируса гриппа. Разработка и создание таких искусственных



иммуногенов, включающих консервативные фрагменты возбудителя, характеризующегося высокой степенью изменчивости, позволяет надеяться на создание «идеальной» вакцины против вируса гриппа, что подчеркивает актуальность выбранной темы исследований диссертанта, а также ее широкую социальную значимость.

В диссертационной работе описаны стратегии проектирования искусственных иммуногенов с учетом современных данных молекулярного анализа геномов различных штаммов вирусов гриппа, созданию генетических конструкций, включающих искусственно созданные фрагменты ДНК, кодирующие консервативные фрагменты белков штаммов вирусов гриппа, а также исследование специфической активности созданных генетических конструкций.

### **Научная новизна и практическая значимость исследования и полученных результатов.**

Научная новизна диссертационной работы Старостиной Е.В. определяется тем, что диссертантом продемонстрированы широкие возможности использования современных методов биоинформатики для рационального проектирования искусственных полиэпитопных антигенов при поиске кандидатов при разработке и создании универсальной вакцины против гриппа. Диссертантом впервые получены ДНК-конструкции, кодирующие искусственные Т- и В-клеточные иммуногены и показано, что они индуцируют вирус-специфические антитела и Т-клеточный иммунный ответ. Показано, что иммунизация мышей с применением таких конструкций, обеспечивает кросс-протективный иммунный ответ против двух сезонных штаммов вируса гриппа A/California/4/09(H1N1pdm09) и A/Aichi/2/68(H3N2) у иммунизированных животных и обеспечивает частичную перекрестную защиту животных от смертельного заражения этими штаммами. Полученные результаты представляют несомненный интерес и могут быть полезны исследователям, работающим в области разработки новых ДНК-вакцин, что подчеркивает значимость данной работы не только с точки зрения фундаментальной науки, но и практического применения при разработке идеальных вакцин против вирусов с высокой степенью изменчивости.

### **Обоснованность и достоверность научных положений и выводов**

Во Введении диссертантом убедительно обоснована актуальность исследования, чётко сформулированы цели и задачи, а также положения, выносимые на защиту. Основной раздел диссертации содержит описание полученных результатов исследования и их обсуждение. Написан хорошо, представленный материал изложен логично, достаточно иллюстрирован. Обсуждение результатов проведено грамотно. Обоснованность полученных результатов обеспечена применением современной научно-методической базы, с использованием современных методов исследований, при постановке экспериментов использовались адекватные контроли.

Достоверность результатов работы не вызывает сомнений. Экспериментальные данные получены на большом объёме проведённых лабораторных исследований с применением современных методик, а также модели гриппозной инфекции на лабораторных животных и исследовании разнообразных маркеров активации иммунного ответа. Сделанные выводы строго базируются на полученных результатах исследования и полностью им соответствуют. Автореферат соответствует основным положениям исследований и выводов, представленным в диссертационной работе.



По материалам диссертации представлено три работы, опубликованных в журналах, входящих в список ВАК. Работа прошла апробацию на ряде российских и международных конференциях. Публикации автора полностью отражают основные результаты проведённых исследований.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертационная работа Старостиной Е.В. построена по классической схеме. Работа изложена на 151 странице, состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, двух разделов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 319 источников на русском и английском языках, из которых более половины опубликовано за последние несколько лет. Работа иллюстрирована 31 рисунком и 10 таблицами.

Во Введении изложена актуальность темы и степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы, а также основные положения, выносимые на защиту, апробация работы и личное участие автора. В обзоре литературы приведены современные литературные данные о структуре и репродукции вируса гриппа, его изменчивости, а также о существующих традиционных вакцинах. Автором проводится анализ новых подходов к разработке универсальных противогриппозных вакцин, представлены данные о ряде кандидатных универсальных вакцин, которые достигли этапа клинических испытаний.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны использованные автором материалы и методы исследования, включая компьютерное моделирование, молекулярное клонирование, работы с культурами прокариотических и эукариотических клеток, с лабораторными животными, а также методы оценки иммунного и протективного ответа, включая ИФА, ELISpot и внутриклеточное окрашивание цитокинов, с помощью проточной цитометрии. В целом данная глава свидетельствует о том, что работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных молекулярно-биологических подходов и компьютерного анализа.

В главе «Результаты и обсуждение» представлены результаты собственных исследований, где последовательно приводятся этапы проведения экспериментов с последующим обсуждением. Работа представлена в виде двух разделов: первый раздел посвящён изучению иммуногенных и протективных свойства полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов, а второй - изучению иммуногенных и протективных свойств ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих искусственные антигены на основе консервативной области ствола гемагглютинаина и белка M2.

Для создания Т-клеточных вакцинных конструкций диссертантом использовался подход, основанный на компьютерном дизайне искусственных полиэпитопных белков-антигенов, в состав которых были включены консервативные Т-клеточные эпитопы, локализованные в последовательностях всех основных белков вируса гриппа. В работе приводятся доказательства экспрессии целевых генов, входящих в состав ДНК-вакцинных конструкций, с использованием двух методов: РТ-ПЦР и иммуноблоттинга. Автором показано, что у мышей, иммунизированных смесью ДНК-вакцинных конструкций p-Ub-muTA<sub>g</sub> и p-LP-muTA<sub>g</sub>-LAMP, формируется вирус-специфический иммунный ответ, который обеспечивает перекрёстную защиту против двух штаммов вируса гриппа, A/California/4/2009(H1N1pdm09) и A/Aichi/2/68(H3N2). Полученные результаты

свидетельствует о том, что комбинация двух искусственных полиэпипоппных Т-клеточных иммуногенов в составе ДНК-вакцины способна индуцировать у мышей перекрестный протективный иммунитет в отличие от иммунизации живыми вакцинными штаммами.

Вторая часть диссертации посвящена получению и исследованию вакцинных конструкций с использованием консервативных фрагментов стебля гемагглютинаина и консервативного белка М2 вируса гриппа А (AgН1, AgН3 и AgМ2). Автором показано, что спроектированные ДНК-вакцинные конструкции при совместной иммунизации мышей линии BALB/с индуцируют ответы специфических антител и цитотоксических лимфоцитов, и также обеспечивают защиту животных от заражения двумя вирусами гриппа А/California/07/09(Н1N1pdm09) и А/Aichi/2/68(Н3N2). При этом Т-клеточный ответ в группе мышей, иммунизированных смесью целевых ДНК-вакцинных конструкций, был достоверно выше ответов в группах животных, иммунизированных вакцинными штаммами А/California/07/09(Н1N1pdm09) и А/Aichi/2/68(Н3N2).

### **Замечания.**

При прочтении диссертации у меня возникли некоторые вопросы, главным образом, дискуссионного характера:

1. Почему для доставки спроектированных искусственных иммуногенов были использованы только ДНК-вакцинные конструкции? Возможно, если бы иммуногены были получены в виде рекомбинантных белков и использованы для иммунизации животных, гуморальный иммунный ответ был бы более выражен?

2. На модели лабораторных животных диссертант экспериментально подтвердил, что иммунизация полученными ДНК-вакцинными конструкциями обеспечивала кросс-протективную защиту от двух вирусов гриппа типа А, значительно различающихся по антигенным свойствам. Есть ли основания полагать, что эти вакцины будут способны обеспечить кросс-протективную защиту как от т вирусов гриппа А, так и от вирусов гриппа В одновременно?

### **Заключение**

В целом, диссертационная работа оставляет очень хорошее впечатление. Указанные незначительные недостатки носят в основном дискуссионный характер и не умаляют достоинств выполненной работы. Диссертационная работа Е.В. Старостиной «ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие искусственные антигены вируса гриппа» представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3 - молекулярная биология», является завершённым научно-исследовательским трудом, имеющим существенное значение для молекулярной биологии, вирусологии и здравоохранения.

В диссертации проведён глубокий анализ ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих искусственные полиэпипоппные антигены вируса гриппа и исследована их специфическая активность *in vitro* и *in vivo*. Полученные автором результаты достоверны, положения и выводы обоснованы. Автореферат соответствует основному содержанию диссертации. Опубликованные автором научные статьи полностью соответствуют теме диссертационной работы.

Диссертационная работа Е.В. Старостиной отвечает критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, с изменениями постановления Правительства РФ от



21.04.2016 г. №335 «О внесении изменений в Положении ученых степеней», а ее автор Старостина Екатерина Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук 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  
29 ноября 2021 г.

Подпись д.б.н., проф. Дейнеко Е.В. заверяю:

**Орлова Галина Владимировна**  
Ученый секретарь  
ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН»  
кандидат биологических наук



/Орлова Г.В./