

Отзыв официального оппонента

На диссертационную работу Волковой Натальи Вячеславовны на тему
«Получение экспериментальных ДНК-вакцин против лихорадки Марбург»,
представленную на соискание степени кандидата биологических наук по
специальностям 1.5.3-молекулярная биология
1.5.10-вирусология

Актуальность темы

Заболевание, вызываемое вирусом Марбург (MVD), является редкой и тяжелой геморрагической лихорадкой, которая поражает людей и часто приводит к гибели заболевших. Возбудителем MVD является РНК-содержащий вирус, принадлежащий к семейству филовирусов (*Filoviridae*) – вирус Марбурга, который был в первые идентифицирован в Марбурге, Франкфурте (Германия) и Белграде (Сербия) в 1967 г. в результате множественной лабораторной вспышки MVD. С тех пор периодически происходили случаи и вспышки MVD, в Демократической Республике Конго в 1998 - 2000 г., в Анголе в 2004 - 2005 г., в Уганде – 2012, 2014 и 2017 г. В 2021 году был зафиксирован случай MVD в Республике Гвинея – провинция Гикеду (Guéckédou).

Отсутствие вакцин и лечебно-профилактических препаратов, позволяющих эффективно противостоять MVD, является глобальной проблемой здравоохранения и вызовом для современной науки. Попытки создания новых средств борьбы с этим заболеванием не прекращаются во всем мире. Уникальность вируса и инфекции им вызываемой, также как дефицит возможности проведения адекватных клинических исследований по оценке защитной эффективности новых лечебных и профилактических препаратов от MVD, противостоят успеху появления зарегистрированных лекарственных

средств, способных защитить население планеты, а также сотрудников специализированных лабораторий, в которых проводятся работы с вирусом Марбург.

Научная новизна и практическая значимость исследования и полученных результатов

Научная новизна и оригинальность результатов, полученных автором, не вызывают сомнения. Использование подхода, связанного с доставкой в клетки генетической информации, кодирующей и экспрессирующей вирусные белки иммуногены, рассматривается в мире, как передовой уровень создания вакцинных препаратов. При помощи компьютерного анализа и генно-инженерных работ впервые были получены уникальные ДНК-конструкции, кодирующие структурные белки вируса Марбург.

Впервые проведен дизайн ДНК-вакцинных конструкций pVAKS-2PM и pVAKS-3PM против лихорадки Марбург, включающих одновременно два структурных белка NP и VP40 и три белка NP, VP40 и GP в качестве основы профилактической ДНК-вакцины.

Впервые показано, что трансфекция клеток HEK293T одновременно двумя ДНК-вакцинными конструкциями pVAKS-GPDM и pVAKS-2PM, и только одной плазмидой pVAKS-3PM приводит к формированию вирусоподобных частиц морфологически и иммунохимически схожих с нативным вирусом Марбург.

Впервые в одном эксперименте при помощи методов Elispot и ICS проверена способность ДНК-вакцинных конструкций pVAKS-GPDM и pVAKS-3PM индуцировать антиген-специфический CD4⁺ и CD8⁺T-клеточный иммунный ответ у мышей Balb/c.

Показано, что трехкратная иммунизация морских свинок экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM обеспечивает

формирование антител, нейтрализующих проникновение в клетки псевдовирусов, содержащих поверхностный гликопротеин вируса Марбург.

Показано, что трехкратная иммунизация морских свинок экспериментальной ДНК-вакциной pVAKS-GPDM обеспечивает защиту морских свинок от летальной дозы вируса Марбург при внутримышечном введении.

Практическая значимость результатов диссертационной работы не вызывает сомнений и связана с получением автором экспериментальной ДНК-вакцины pVAKS-GPDM, содержащей последовательность, кодирующую основной белок иммуноген вируса Марбург, способной в результате иммунизации животных индуцировать антиген-специфический клеточный иммунный ответ, обеспечивать формирование антител, нейтрализующих инфекционную активность вируса Марбург, а также способной защищать животных от летальной инфекции, вызванной внутримышечным введением этого вируса. Результаты работы востребованы для продолжения разработки и регистрации лекарственного средства для профилактики MVD на основе полученной экспериментальной ДНК-вакцины. Кроме того, результаты вносят вклад в создание новых вариантов вакцин в отношении других вирусных инфекций, а также вакцин в отношении MVD на основе альтернативных систем доставки генетической информации, например, мРНК вакцин или субъединичных вакцин и вакцин на основе вирусоподобных частиц. Данные иммуногенной и протективной активности, предложенной в диссертационной работе экспериментальной ДНК-вакцины pVAKS-GPDM, могут быть использованы в качестве опорных характеристик эффективности при разработке новых вариантов профилактических препаратов против MVD.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, так как базируется на широком массиве экспериментально полученных данных,

современных методах исследований, сопоставленных с существующим уровнем научных данных. Положения, представленные на защиту, согласуются с данными, приведенными диссертантом в работе. Сделанные выводы обоснованы и являются логическим заключением, поставленных в диссертации цели и задач. Результаты диссертационной работы широко обсуждались на Российских и международных конференциях и были опубликованы в 3 статьях журналов, входящих в список рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Структура и объем работы

Диссертация построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой научной литературы, включающего 174 источника преимущественно зарубежных авторов. Работа изложена на 127 страницах, включает 34 рисунка и 4 таблицы.

Во введении автор обосновывает необходимость проведения работы, а также формулирует цель и задачи работы.

Глава 1 «Обзор литературы» посвящена анализу данных доступной литературы, в отношении вируса Марбург, существующих животных моделей для изучения патогенеза филовиральных инфекций, в частности, вызываемых вирусами Марбург и Эбола, а также описанию современного состояния подходов и успехов разработки средств профилактики MVD.

Глава 2 «Материалы и методы» содержит достаточно детальное описание использованных в диссертационной работе материалов, животных, методов и подходов получения экспериментальных данных.

Глава 3 «Результаты и обсуждение» состоит из шести основных разделов. Первые три раздела посвящены дизайну и конструированию трех ДНК-вакцинных конструкций (pVAKS-GPDM, pVAKS-2PM и pVAKS-3PM), кодирующих мажорные белки вируса Марбург NP, VP40 и GP. Четвертый

раздел посвящен доказательству экспрессии целевых генов в клетках НЕК293Т, трансфицированных полученными экспериментальными плазмидами. В пятом разделе представлены результаты исследования иммуногенности полученных вакцинных конструкций у мышей Balb/c. Так, в начале главы приводится сравнительное исследование антительного ответа у иммунизированных животных, по результатам которого выбирают две наиболее иммуногенные конструкции, pVAKS-GPDM и pVAKS-3PM, для исследования Т-клеточного ответа. ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-GPDM, показавшая наиболее высокие титры антител и ответы CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, была отобрана автором для дальнейшего исследования иммуногенности, а также вируснейтрализующей активности сывороток крови морских свинок. Протективные свойства ДНК-вакцинной конструкции pVAKS-GPDM были оценены с использованием модели MVD, индуцированной внутримышечным введением морским свинкам вируса Марбург. Результаты этих работ описаны в шестой главе.

Наиболее значимые результаты диссертационной работы Волковой Н.В. сформулированы в основных положениях, выносимых на защиту, а именно: ДНК-вакцинная конструкция pVAKS-GPDM, содержащая ген, кодирующий поверхностный гликопротеин вируса Марбург без муциноподобного домена, при внутримышечной иммунизации индуцирует продукцию антител, обладающих вируснейтрализующей активностью и обеспечивает защиту морских свинок, инфицированных 100% летальной дозой вируса Марбург.

Глава “Заключение” подводит итог проделанной работы, описанный в виде вступления, описывающего актуальность диссертационной работы, и последовательного изложения достигнутых в работе результатов.

Выводы четко сформулированы, точно отражают результаты проделанной работы и соответствуют поставленным цели и задачам.

Содержание автореферата диссертации полностью соответствует содержанию диссертационной работы Волковой Н.В.

Замечания

По сути и изложению диссертационной работы Волковой Н.С. есть ряд замечаний:

1) Автор не включил в состав диссертационной работы результаты секвенирования, получаемых ДНК-плазмид, хотя такие данные были бы полезными для подтверждения подлинности и воспроизводимости достигнутых данных.

2) В диссертационной работе автор крайне редко прибегает к сравнению полученных им данных с аналогичными данными, описанными в литературном обзоре, в результате вопросы расхождения результатов из обзора литературы и полученных автором остаются не обсужденными и не понятно, как автор объясняет такие разногласия и что думает о перспективах предложенной им ДНК-вакцины. Например, в литературном обзоре упоминается, что иммунизация приматов вакциной rVSV-GP привела к индукции антител, в титре 1/12800 (реакция ИФА), которые сохранились в сыворотке крови у животных через год после вакцинации. Это позволило обеспечить защиту животных при заражении летальной дозой вируса Марбург (штамм Musoke). При этом уровень NAbs сохранялся на среднем уровне (от 1/1606 до 1/7250). В тоже время в собственных экспериментах с использованием морских свинок автор получил более скромные титры антител в ИФА (1/800-1/6400) и NAbs (1/20 -1/40).

3) В диссертационной работе не приведено экспериментальное обоснование целесообразности применения схемы трехкратной иммунизации вариантами ДНК-вакцины и поэтому остается не ясным, почему автор выбрал для иммунизации дозу вакцины 100 мкг с трехкратной схемой ее введения.

4) В таблице 3 - результаты исследования наличия антиген-специфических антител с помощью ИФА в сыворотках крови мышей линии Balb/c, трехкратно иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями, автор не приводит результаты статистического сравнения титров антител между вакцинными конструкциями, но при этом заключает, что наибольшие титры специфических антител вырабатываются у мышей линии Balb/c, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями pVAKS-GPDM и pVAKS-3PM.

К диссертанту также есть несколько вопросов:

1) Известно, что основным препятствием к широкому признанию и регистрации ДНК-вакцин на основных мировых рынках остается риск их интеграции в геном клетки хозяина, каким образом автор диссертационной работы решил данную проблему в процессе создания своей ДНК-вакцины?

2) В работе Волковой Н.В. не приводятся данные о штамме/ах вируса Марбург, использованном в исследованиях, также как не приведены данные заражающих доз вируса Марбург, использованных для инфицирования морских свинок, может ли автор сообщить информацию о штаммах и дозах вируса Марбург, использованных в работе, поскольку без таких сведений невозможно адекватно оценить защитную способность вакцины?

3) Какие производственные и аналитические методы были использованы автором для отчистки от примесей (фрагментов белков) в составе плазмидных конструкций и какими аналитическими методами подтверждали отсутствие этих примесей в образцах экспериментальных ДНК-вакцин, использованных для иммунизации животных?

4) По мнению автора, на основе совокупности полученных данных, может ли разработанная ДНК-вакцина быть предложена для дальнейших исследований защитной эффективности в модели летальной инфекции, вызванной вирусом Марбург у не человекообразных приматов?

**Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным
Положением о порядке присуждения ученых степеней**

Несмотря на высказанные замечания, в целом работа представляется крайне интересным и практически важным исследованием, выполнена с использованием современных методов молекулярной биологии и вирусологии. По своей актуальности, методическому уровню, ценности и новизне полученных результатов диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Волкова Наталья Вячеславовна, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.3 – молекулярная биология и 1.5.10 – вирусология.

Сергеев Артемий Александрович



Доктор медицинских наук,
Глава Представительства компании
АВВА Фармасьютикалс Лтд. в городе Москве
Адрес: 111116, г. Москва ул. Авиамоторная дом 4, корпус 3, офис 8.
Телефон: +7 (495) 269 00 16, добавочный 3008
E-mail: sergeev@rnd.avvapharma.com
Сайт компании: www.avvapharma.com

Подпись Сергеева А.А. заверяю:

Руководитель юридической службы
Представительства компании
АВВА Фармасьютикалс Лтд. в г. Москве



К.И. Мельников

