

## Отзыв официального оппонента

доктора биологических наук, профессора Забережного Алексея Дмитриевича на диссертационную работу Ожаровской Татьяны Андреевны «Разработка вакцинного препарата для профилактики Ближневосточного респираторного синдрома (БВРС) и оценка его эффективности», представленную к публичной защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 14.03.09 – «клиническая иммунология, аллергология» и 03.01.03 – «молекулярная биология».

Работа Ожаровской Татьяны Андреевны является самостоятельной квалификационной работой, выполненной в последние годы в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации)

Актуальность выбранной темы не подлежит сомнению. Коронавирусы представляют серьёзную опасность для человека, что показала пандемия SARS-CoV-2. Работа посвящена разработке вакцинного препарата на основе рекомбинантного аденовируса для профилактики Ближневосточного респираторного синдрома (БВРС) и всесторонней оценке его безопасности и эффективности. Для изготовления вакцины была выбрана консенсусная последовательность гена гликопротеина S методом сравнения геномов современных штаммов БВРС-КоВ. Были получены рекомбинантные векторы на основе аденовируса человека 5-го серотипа, экспрессирующие различные варианты гена гликопротеина БВРС-КоВ, проведён их всесторонний анализ. Разработаны состав и форма вакцинного препарата для профилактики БВРС, произведены экспериментальные серии препарата и доказано их соответствие требованиям, предъявляемым к вирусным векторным вакцинам. Исследованы протективные свойства вакцинного препарата *in vivo*. Проведена

доклиническая оценка безопасности и иммуногенности вакцинного препарата для профилактики БВРС в опытах на животных.

**Научная новизна** диссертационной работы очевидна, она подтверждается недавним патентом РФ «Иммунобиологическое средство и способ его использования для индукции специфического иммунитета к вирусу ближневосточного респираторного синдрома (варианты)», полученным в соавторстве. Впервые получены рекомбинантные аденовирусы, экспрессирующие: ген гликопротеина S с последовательностью трансмембранного домена гликопротеина G вируса везикулярного стоматита (S-G), последовательность рецептор-связывающего домена (RBD) белка S с трансмембранным доменом гликопротеина G вируса везикулярного стоматита (RBD-G), последовательность рецептор-связывающего домена с Fc-фрагментом иммуноглобулина G человека (RBD-Fc). Впервые проведено одновременное сравнение иммуногенности пяти различных вариантов гена белка S БВРС-КоВ в составе аденовирусных векторов: S (полноразмерный гликопротеин), S-G, RBD, RBD-G, RBD-Fc. Показано, что все разработанные формы гликопротеина S индуцируют формирование S-специфического гуморального и клеточного иммунного ответа у иммунизированных животных. Создан новый вакцинный препарат на основе Ad5-RBD-G и Ad5-S, который обеспечивает индукцию высокого уровня как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Показана протективная активность кандидатной вакцины в опытах на животных.

**Теоретическая и практическая значимость работы** определяется следующими факторами. В результате проведенных исследований получены рекомбинантные аденовирусы, на основе которых разработан вакцинный препарат для профилактики БВРС. Данный препарат является высокоиммуногенным и безопасным. Дальнейшие доклинические испытания препарата позволили получить разрешение на проведение клинических исследований, которые завершились в настоящее время. По их результатам

будут поданы документы для получения разрешения на регистрацию вакцины для медицинского применения.

**Достоверность результатов** диссертационной работы подтверждается объемом проведенных исследований, достаточным количеством наблюдений, современными методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе цели и задачам. Примененные статистические методы адекватны поставленным задачам. Проверка статистических гипотез осуществлялась при допустимом в медико-биологических исследованиях 5%-ом уровне значимости (0,05). Результаты диссертационной работы были представлены на XVII Молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2017), международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни» (Москва, 2018), XIX всероссийской конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (Москва, 2019), XXXI Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2019), двух международных конференциях «Perspective technologies in vaccination and immunotherapy» (Москва, 2018 и 2020).

По материалам диссертации опубликованы 11 печатных работ, 5 из которых – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для публикации основных научных результатов диссертации. Общий объем публикаций составил 111 печатных страниц (6,81 авторских листов), доля авторского участия достигает 70%

**Оценка содержания диссертации и её оформления.** Структура и объём диссертации полностью соответствуют требованиям ВАК РФ. Диссертационная работа изложена на 191 странице машинописного текста, включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы (265 источников, из которых отечественных

публикаций – 20, иностранных публикаций – 245). Работа содержит 15 таблиц и 31 рисунок.

В разделе «Введение» обосновывается актуальность темы диссертации, формулируются её цель и задачи, научная новизна и практическая значимость.

В разделе «Обзор литературы» представлена актуальная информация о структуре и репликативном цикле БВРС-КоВ, описано строение протективного антигена БВРС-КоВ и его рецептора, дана информация об иммунном ответе при инфицировании БВРС-КоВ, в том числе описаны врожденный, адаптивный иммунный ответ к БВРС-КоВ. Описаны природные резервуары БВРС-КоВ и существующие схемы воспроизведения БВРС на восприимчивых животных. Затронута тема разработки вакцин против БВРС-КоВ.

Раздел «Материалы и методы» изложен на 36 страницах максимально кратким языком, при этом в разделе содержится вся информация, необходимая для воспроизведения описанных методик. Объем и разнообразие методических подходов, включая самые современные, производят положительное впечатление, т.к. далеко выходят за рамки средней кандидатской диссертации. Не будет преувеличением сказать, что проведена большая работа. При этом в методическом подходе нет ничего лишнего, работа спланирована на высоком профессиональном уровне.

В разделе «Результаты собственных исследований» проведён выбор консенсусной последовательности и различных форм гена гликопротеина S БВРС-КоВ. Получены плазмиды, содержащие полноразмерный геном аденовируса человека 5 серотипа и несущие последовательности различных вариантов гена S БВРС-КоВ. На их основе получены рекомбинантные аденовирусы, кодирующие различные варианты гена S БВРС-КоВ. Проведено исследование экспрессии гена S БВРС-КоВ в составе полученных рекомбинантных аденовирусов методом иммуноблоттинга. Проведено исследование иммуногенности различных форм белка S БВРС-КоВ у

грызунов. Исследована напряженность гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей при иммунизации аденовирусными векторами, экспрессирующими различные варианты гена S БВРС-КоВ. Определены состав и форма вакцинного препарата для профилактики БВРС. Приведено обоснование выбора дозы вакцинного препарата. Получены лиофильно высушенные препараты рекомбинантных векторов Ad5-S и Ad5-RBD-G. И проведено исследование экспериментальных серий вакцины для профилактики БВРС. Дана оценка чувствительности к БВРС-КоВ мышей, экспрессирующих в легких ген hDPP4. Изучены протективные свойства вакцинного препарата для профилактики БВРС на мышах. Проведён анализ безопасности и иммуногенности вакцинного препарата для профилактики БВРС на приматах. Немаловажно проведение исследования влияния предсуществующего иммунного ответа к аденовирусному вектору на эффективность иммунизации.

Выводы и практические предложения логически вытекают из результатов собственных исследований и обобщают весь объём информации, а автореферат соответствует содержанию диссертации.

В качестве дискуссии хотелось бы задать автору вопрос. При размножении рекомбинантных репликативно-дефектных аденовирусов в культуре клеток, конститутивно экспрессирующих компенсаторный ген E1, учитывалась возможность рекомбинации и образования самостоятельных по репликации генетических вариантов аденовируса. Почему их появление отслеживали при помощи молекулярного анализа, а не при помощи заражения клеточных культур, перmissive для аденовируса дикого типа?

В целом диссертация написана высокопрофессиональным языком. В работе иногда встречаются нестандартные формулировки. В разделах 2.1.5 и 2.2.2 упомянуты «эндорибонуклеазы рестрикции». Возможно, речь идёт об эндонуклеазах. Впервые встретился термин «опалесцирующий бенд», более

привычно звучит «зона» или «полоса». Выражение о том, что плаزمида «была трансформирована в компетентные клетки *E. coli*» - типичная опечатка.

Отмеченные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертации, представляющей собою законченное исследование, содержащее научную новизну и соответствующее специальностям 14.03.09 – «клиническая биология, аллергология»; 03.01.03 – «молекулярная биология».

### **Заключение.**

Диссертационная работа Ожаровской Татьяны Андреевны «Разработка вакцинного препарата для профилактики Ближневосточного респираторного синдрома (БВРС) и оценка его эффективности» является завершенной научно-квалификационной работой, выполненной самостоятельно на высоком научном уровне, в которой решена важная народно-хозяйственная проблема: разработка вакцинного препарата на основе рекомбинантного аденовируса для профилактики Ближневосточного респираторного синдрома (БВРС) и проведена всесторонняя оценка его безопасности и эффективности. Диссертация обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выдвигаемые для публичной защиты, обоснованные выводы, которые свидетельствуют о личном вкладе автора диссертации в науку и характеризуются существенной практической значимостью.

Диссертационная работа Ожаровской Татьяны Андреевны по актуальности, научной новизне полученных результатов, их практической значимости, достоверности и обоснованности научных положений и выводов, по объему выполненных исследований и степени внедрения в научно-исследовательскую практику полностью отвечает требованиям ВАК Минобрнауки России (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительством Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, утвержденного Правительством Российской Федерации (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 01 октября 2018 г. № 1168, от 24 февраля 2021 г. № 118, от 07 мая 2021 г. №

458, от 11 сентября 2021 г. № 1539), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 14.03.09 – «клиническая иммунология, аллергология»; 03.01.03 – «молекулярная биология».

**Официальный оппонент:**

Доктор биологических наук, профессор,  
член-корреспондент РАН,  
директор ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и  
технологический институт биологической промышленности»

Забережный Алексей Дмитриевич

16.08.2022

Подпись А.Д. Забережного удостоверяю  
Учёный секретарь ФГБНУ ВНИТИБП  
кандидат сельскохозяйственных наук



Маркова Евгения Владимировна

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности»  
(ФГБНУ ВНИТИБП)  
141142, Московская область, г.о.Лосино-Петровский, пос. Биокомбината, д. 17, к.1  
<http://внитибп.рф>, E-mail: [vnitbp@mail.ru](mailto:vnitbp@mail.ru), Тел/факс: +7 (496) 567-32-63