

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора Филатова Александра Васильевича на диссертационную работу Ожаровской Татьяны Андреевны на тему «Разработка вакцинного препарата для профилактики Ближневосточного респираторного синдрома (БВРС) и оценка его эффективности», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 14.03.09 – «клиническая иммунология, аллергология» и 03.01.03 – «молекулярная биология»

### Актуальность темы диссертации

До первой вспышки тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС) было известно, что среди людей циркулирует ограниченное количество коронавирусов, вызывающих только легкие респираторные заболевания. После вспышки ТОРС в 2003 году стало очевидно, что коронавирусы могут преодолевать видовой барьер и вызывать у людей опасные для жизни инфекции. Поэтому необходимо уделять повышенное внимание данным инфекционным агентам, а также вести разработку вакцин для предотвращения распространения уже открытых коронавирусов.

Актуальность проблемы, представленной в диссертационной работе, связана с тем, что до сих пор нет ни одного одобренного средства для профилактики или лечения Ближневосточного респираторного синдрома (БВРС). Данное заболевание, вызываемое высокопатогенным коронавирусом – коронавирусом Ближневосточного респираторного синдрома (БВРС-КоВ), по-прежнему вызывает озабоченность во всем мире, но особенно в Саудовской Аравии и соседних странах. В настоящее время зарегистрировано около 2,5 тысяч случаев инфекции БВРС-КоВ в 27 странах по всему миру, летальность составляет 34,5%. БВРС-КоВ инфицирует людей любого возраста, однако пожилые люди, имеющие сопутствующие заболевания (такие как сахарный диабет, болезни почек, сердца и органов дыхательной системы, рак), а также несвоевременная диагностика – все это факторы, влияющие на исход заболевания.

После обнаружения БВРС-КоВ в 2012 г. во многих странах возникали спорадические случаи, внутрибольничные инфекции и многочисленные групповые очаги БВРС. Передача от человека к человеку привела как к

крупным вспышкам в Саудовской Аравии, так и за ее пределами: в 2015 году в Южной Корее зарегистрировали 186 случаев заболевания и 38 смертей. Несмотря на то, что в России не было зарегистрировано ни одного случая БВРС, существует опасность завоза возбудителя данного заболевания в страну. Поэтому диссертационное исследование, направленное на разработку вакцинного препарата для профилактики Ближневосточного респираторного синдрома (БВРС) и оценку его доклинической безопасности и эффективности, является несомненно актуальным и своевременным, особенно учитывая текущую пандемию, вызванную другим коронавирусом – SARS-CoV-2.

### **Научная новизна диссертационной работы**

С использованием методов биоинформатического анализа разработан дизайн генетических конструкций, на основе которых с помощью современных молекулярно-биологических методов 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), RBD 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. Экспериментально показано, что все разработанные формы гликопротеина S индуцируют формирование S-специфичного гуморального и клеточного иммунного ответа у лабораторных животных.

Получен новый оригинальный лиофилизированный вакцинный препарат, который обеспечивает индукцию высокого уровня как гуморального, так и клеточного иммунного ответа, показана его протективная активность. Данная рекомбинантная вакцина защищена Патентом РФ на изобретение RU 2709659 C1.

### **Степень обоснования и достоверности полученных результатов**

Достоверность полученных результатов подтверждается четким планированием экспериментов и соответствующей проверкой результатов на

каждом этапе разработке кандидатной вакцины для профилактики БВРС. Первичную последовательность полученных аденовирусных векторов, несущих различные варианты гена гликопротеина S БВРС-КоВ, подтверждали методом полногеномного секвенирования. Экспрессию различных вариантов целевого гена полученными аденовирусными векторами подтверждали методом иммуноблоттинга. Иммуногенность разработанной кандидатной вакцины оценивали по индукции как клеточного, так и гуморального иммунного ответа на двух видах лабораторных животных (мышьях и обыкновенных игрунках).

Все проведенные эксперименты выполнены с использованием современных молекулярно-биологических, иммунологических, вирусологических и биоинформатических методов исследования.

Статистическая обработка данных выполнена на высоком уровне с применением адекватных методов и критериев. Сформулированные соискателем выводы и положения, выносимые на защиту, основаны на глубоком анализе полученных результатов по каждой из поставленных задач.

#### **Теоретическая и практическая значимость полученных результатов**

В рамках диссертационной работы разработана и исследована кандидатная векторная вакцина для профилактики БВРС. Показано, что иммунизация полученным лиофилизированным вакцинным препаратом приводит к формированию напряженного протективного иммунитета у лабораторных животных. Кроме того, показана безопасность препарата в рамках доклинических исследований (не выявлено негативного влияния вакцины на общее состояние животных). Разработанная лиофилизированная векторная вакцина для профилактики БВРС после регистрации может быть внесена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям.

Несомненную практическую значимость имеют методы, которые были разработаны в рамках диссертационной работы и используются в филиале «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава Российской Федерации: метод проверки наличия микоплазмы в клеточных сборах, вирусных сборах и концентратах рекомбинантных аденовирусов (rAd5, rAd26); метод определения остаточной ДНК культуры клеток НЕК293 в концентратах и готовой лекарственной форме препаратов на основе

рекомбинантных аденовирусов (rAd5, rAd26); метод определения количества аденовирусных частиц (rAd5, rAd26) с использованием спектрофотометрии, что подтверждено актами о внедрении результатов в практику. Также получен патент РФ на изобретение RU 2709659 C1.

Результаты диссертации представлены на российских и международных конференциях, по материалам диссертации опубликованы 11 печатных работ, среди них 5 в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Получен 1 патент РФ.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертационная работа Ожаровской Татьяны Андреевны 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 оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, содержит 15 таблиц и 31 рисунок. Диссертационная работа и автореферат написаны грамотным литературным языком с использованием общепринятой терминологии.

Раздел «Введение» содержит обоснование актуальности темы диссертационной работы и степень ее разработанности, цели и задачи исследования, научную новизну темы, ее теоретическую и практическую значимость, методологию и методы исследования, основные положения, выносимые на защиту, описание личного вклада автора и степени достоверности полученных результатов.

Раздел «Обзор литературы» содержит общую характеристику коронавирусов, описание структуры и жизненного цикла БВРС-КоВ, а также описание протективного антигена БВРС-КоВ и его рецептора (дидептидил пептидазы 4 человека). Отдельным пунктом вынесена характеристика иммунного ответа к БВРС-КоВ. Также в данном разделе изложены клинические проявления БВРС, указаны природные резервуары БВРС-КоВ, животные модели БВРС и подробно проанализированы кандидатные вакцины для профилактики БВРС-КоВ, исследуемые в мире в настоящее время. Данный раздел диссертационной работы четко структурирован и прекрасно иллюстрирован.

Вторая глава диссертационной работы посвящена описанию материалов и методов, которые диссертант использовал для выполнения исследования. В работе применялись современные молекулярно-биологические, бактериологические, вирусологические, иммунологические и биоинформатические методы, а также методы работы с лабораторными животными. Описаны статистические методы, примененные для обработки полученных данных.

Результаты собственных исследований представлены в одной главе, включающей 7 подразделов. В первом подразделе проведен выбор консенсусной последовательности и различных форм гена гликопротеина S БВРС-КоВ. Во втором подразделе подробно описано конструирование рекомбинантных аденовирусных векторов, экспрессирующих различные варианты гена S. Третий раздел посвящен исследованию иммуногенности полученных аденовирусных векторов у мышей. В четвертом подразделе осуществлялся выбор состава и формы вакцинного препарата для профилактики БВРС. Исследование протективных свойств вакцинного препарата для профилактики БВРС на соматически трансгенных мышах проводилось в пятом подразделе. Шестой подраздел посвящен изучению безопасности и иммуногенности полученного вакцинного препарата на приматах. Завершает главу «Результаты собственных исследований» седьмой подраздел, в котором исследовали влияние предсуществующего иммунного ответа к аденовирусному вектору у добровольцев на эффективность иммунизации полученной кандидатной вакциной.

В разделе «Обсуждение результатов» автором анализируются полученные результаты, проводится сравнение с другими исследованиями в данной области и всестороннее обсуждение полученных данных.

Раздел «Заключение» кратко резюмирует изложенные в диссертационной работе результаты. Работа завершается семью выводами, отражающими суть полученных сведений и логично вытекающих из результатов работы.

Автореферат диссертации полностью отражает основное содержание работы.

По диссертационной работе имеются замечания:

1. При использовании аденовирусных вакцин потенциальной проблемой является возможное влияние предсуществующих, а также вакцин-индуцированных антивекторных антител. Ранее в НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи была разработана и успешно применена схема иммунизации с альтернативным использованием Ad26 и Ad5 векторов, Такая схема в значительной степени снимает вопрос о влиянии анти-векторных антител. В представленной работе использовался исключительно Ad5 вектор. Выбор вектора (стр. 91) обосновывается тем, что «из ряда известных аденовирусов, самыми изученными являются аденовирусы человека 5-го серотипа, поэтому они стали основой для создания рекомбинантных векторов.» Я думаю, что представленную работу следует более точно согласовать с основными разработками НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи.

2. Очень привлекательным является прием, который использовала Ожаровская Т.А., для получения «соматически трансгенных мышей». Этот подход хорошо было бы дополнить данными, демонстрирующими экспрессию трансгена у подопытных животных.

3. На Рис. 31 приведены данные о напряженности гуморального иммунитета у добровольцев в зависимости от уровня предсуществующих анти-векторных антител. Однако критерий разделения на подгруппы описан недостаточно четко.

4. Раздел 3.3.1.2 называется «Оценка гликопротеин-специфических изоформ IgG в сыворотках крови мышей». В разделе делается вывод, что «наибольший вклад в общий титр антиген-специфических иммуноглобулинов вносят изоформы IgG1 и IgG2a». При такой постановке вопроса и сделанном выводе, на Рис. 17 в каждой панели было бы логичнее сравнивать ответ на один и тот же антиген, но в различных субтипах, а не сравнивать в одном субтипе ответ на разные формы антигена.

5. В некоторых случаях автор допускает использование лабораторного жаргона. Например, на стр. 100 говорится о «молекулярных массах электрофоретических полос». Молекулярную массу имеют белки, а не электрофоретические полосы.

Высказанные замечания не затрагивают полученных результатов и сущности сделанных выводов, а также не влияют на общую положительную оценку рассматриваемой диссертации.

## Заключение

Диссертационная работа Ожаровской Татьяны Андреевны на тему «Разработка вакцинного препарата для профилактики Ближневосточного респираторного синдрома (БВРС) и оценка его эффективности», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 14.03.09 – «клиническая иммунология, аллергология» и 03.01.03 – «молекулярная биология» является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение по разработке эффективной кандидатной вакцины для профилактики БВРС.

По своей актуальности, научной новизне, практической значимости и объему проведенных исследований диссертационная работа Ожаровской Т.А. соответствует требованиям 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), а ее автор достоин присуждения искомой ученой степени кандидата наук по специальностям 14.03.09 – «клиническая иммунология, аллергология» и 03.01.03 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Филатов Александр Васильевич,

доктор биологических наук, профессор,  
заведующий лабораторией иммунохимии,

Федерального государственного бюджетного учреждения

"Государственный научный центр «Институт иммунологии»

Федерального медико-биологического агентства России

115478, г. Москва, Каширское шоссе, дом 24.

Тел.: 8(499)617-77-65

Эл. почта: [avfilat@yandex.ru](mailto:avfilat@yandex.ru)

*Филатов*

Филатов А.В.

