

ОТЗЫВ

официального оппонента Леневой Ирины Анатольевны
на диссертацию Пулькиной Анастасии Александровны на тему
«Оптимизация гриппозного вектора с модифицированным белком NS1 для
эффективной презентации антигенов респираторно-синцитиального вируса»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.10 - вирусология

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) оказывает значительную нагрузку на здравоохранение и является основной причиной серьезных заболеваний нижнего респираторно тракта у детей младшего возраста, особенно первого года жизни, а также у пожилых людей и пациентов, страдающих нарушениями иммунной системы. Перенесенная РСВ инфекция не предотвращает последующих реинфекций, поэтому повторные случаи инфицирования РСВ происходят на протяжении всей жизни. Клинические испытания, проведенные в 1960-х годах, выявили, что инактивированная формалином вакцина против РСВ показала не только полную неэффективность против РСВ -инфекции, но и вызвала усиление тяжести заболевания легких у вакцинированных детей. Эти неудачи и риски, ассоциированного с вакциной против РСВ, застопорили на несколько лет усилия по разработке новых вакцин-кандидатов. Исследования последних лет увенчались созданием вакцин против РСВ, несколько из которых уже лицензированы. Тем не менее, каждая из вакцин имеет свои недостатки, поэтому создание различных подходов для разработки новых эффективных и безопасных вакцин против РСВ продолжает оставаться насущной задачей современной медицинской науки. В связи с этим актуальность диссертационной работы Пулькиной А.А., посвященной изучению способа оптимизации гриппозных векторов с модифицированным белком NS1 для эффективной презентации антигенов респираторно-синцитиального вируса, не вызывает сомнений.

Исследования последних лет позволили дать более глубокое понимание патогенеза РСВ, конформационных особенностей белка F РСВ и причин усиления тяжести респираторного заболевания, что поспособствовало развитию новых стратегий разработки вакцинных препаратов для борьбы с данной инфекцией. Одним из перспективных современных подходов к созданию вакцин является использование аттенуированных рекомбинантных вирусов в качестве векторов для доставки протективных антигенов в организм. Включение в состав векторных вакцин чужеродных антигенов приводит к стимуляции гуморального и клеточного звена иммунного ответа к встроенному антигену. Использование вируса гриппа в качестве вектора позволяет создать комбинированный вакцинный препарат, предназначенный для профилактики как РСВ инфекции, так и гриппа, а интраназальный способ введения вакцины позволяет сформировать защитный иммунный ответ во входных воротах инфекции. Представленное диссертационное исследование посвящено конструированию гриппозных векторов, экспрессирующих антигены РСВ и сравнению их иммуногенности и защитной эффективности в отношении РСВ инфекции.

Оценка содержания диссертации и ее оформления. Диссертационная работа изложена на 132 страницах машинописного текста, включая 6 таблиц и 31 рисунок. Работа построена по классическому принципу и включает все необходимые разделы. Во введении обоснована актуальность, степень разработанности темы исследования, определена цель и задачи, сформулирована научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, а также положения, выносимые на защиту. Фактический материал, представленный в диссертации, соответствует целям и задачам, стоящими перед автором.

Литературный обзор включает три основных раздела. Автором проведен вдумчивый и детальный обзор современного состояния вопроса. В первом разделе подробно рассматриваются особенности строения и жизненный цикл РСВ, механизм формирования иммунного ответа на РСВ

инфекцию, а также проблемы разработки РСВ-вакцин. Далее автор описывает преимущества использования гриппозного вектора для создания вакцин, подчеркивая перспективность модификации неструктурного белка NS1 вируса гриппа, который является антагонистом системы интерферонов I типа. В конце обзора автор формулирует заключение, которое еще раз подчеркивает актуальность выбранной темы диссертационного исследования.

Глава «Материалы и методы» включает описание использованных в работе методик с достаточной степенью подробности, имеются ссылки на первоисточники.

Третья глава посвящена результатам, полученным в ходе собственных исследований. Первый раздел главы «Результаты» посвящен получению и характеристике репортерного гриппозного вектора, с использованием которого была продемонстрирована преимущественно внутриклеточная локализация люциферазы NanoLuc, слитой с укороченным белком NS1. Второй раздел посвящен конструированию, сборке и характеристике гриппозных векторов, экспрессирующих РСВ антиген. Автором показано, что использованные в работе способы конструирования генного сегмента NS не оказывают влияния на генетическую стабильность и репродуктивную активность вируса. При изучении экспрессии белков было показано, что интенсивность внутриклеточного иммунофлуоресцентного окрашивания трансгена была снижена в культуре клеток, зараженных векторами, содержащими сигнальный пептид IgGк. По мнению автора это может свидетельствовать либо о внеклеточном транспорте, либо о протеасомной деградации трансгена. Следующие разделы главы «Результаты» посвящены изучению иммуногенности и защитной эффективности сконструированных гриппозных векторов. Показано, что после однократной интраназальной иммунизации полученными векторами у животных формируется РСВ-специфичный Т-клеточный иммунный ответ, который ограничивает репродукцию РСВ в легких. Векторы со вставкой IgGк снижают не только

вирусную нагрузку, но и защищают животных от формирования патологических изменений в легких, что подтверждается данными гистологического исследования. На фоне РСВ инфекции в легких мышей, иммунизированных вектором NS-2AsF был детектирован самый высокий уровень антиген-специфических CD8⁺ эффекторных Т-клеток, включая ко-продуцируемые IL-10 и IFN- γ , а также CD4⁺ регуляторных Т-клеток.

Завершающей главой является «Обсуждение», в котором автор анализирует полученные данные, проводя сравнение с другими исследованиями в данной области. На основании полученных в работе данных автором сделаны выводы, которые логически следуют из материалов диссертации и обоснованы результатами проведенных исследований.

Достоверность результатов диссертационного исследования обусловлена выбором современных молекулярно-генетических, вирусологических и иммунологических методов, а также адекватному статистическому анализу полученных данных. Сформулированные соискателем выводы, положения, выносимые на защиту, а также рекомендации обоснованы и опираются на анализ полученных в ходе работы результатов.

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ: 3 научные статьи в журналах, входящих в Перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ, и 8 тезисов докладов, 1 патент на изобретение. Материал диссертации в опубликованных работах отражен достаточно полно.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые показано, что трансгены, слитые с укороченным белком NS1 вируса гриппа, обнаруживаются во внеклеточном пространстве зараженных клеток. Продемонстрирована возможность фокусирования Т-клеточного иммунного ответа на эпитопах встроенного трансгена. В работе показано, что включение сигнального пептида IgGк в трансген повышает защитную эффективность векторов вируса гриппа А с модифицированным белком NS1 в отношении

РСВ инфекции. Продемонстрировано, что защитный механизм интраназальной иммунизации мышей вектором, содержащим сигнальный пептид IgGк, связан с формированием РСВ-специфичных CD8⁺ Т клеток, в частности ко-продуцентов IL-10 и IFN- γ , а также привлечением CD4⁺ регуляторных Т клеток в ткани легких.

Представленное научное исследование несет как как **теоретическую, так и практическую значимость**. Полученные в рамках проведенного исследования результаты были учены при создании вакцины RSV/Flu-01E, предназначенной для профилактики РСВ инфекции у пожилых людей, находящейся на этапе клинических исследований I и II фазы. Кроме того, полученные результаты могут быть использованы при конструировании других векторов, кодирующих вставки протективных антигенов различных патогенов.

Рекомендации по использованию результатов работы. Полученные результаты подчеркивают важность поиска оптимального дизайна конструкции вирусных векторов с целью повышения иммуногенности встроенных антигенов. В результате проведенных исследований показано, что введение последовательности сигнального пептида IgGк в состав трансгена позволяет сфокусировать и усилить Т-клеточный иммунный ответ к эпитомам вставки. Основные результаты и выводы работы являются весьма важными для развития научных направлений, таких как вирусология, вакцинология, молекулярная биология, а также для практического здравоохранения.

В рецензируемой диссертационной работе не выявлены существенные недостатки. В качестве дискуссионных вопросов, уточнений и замечаний можно отметить следующие:

1. В настоящее время для разрабатываемых и уже лицензированных вакцин для профилактики РСВ одним из важных вопросов является вопрос о продолжительности поствакцинального иммунитета. Есть ли у Вас какие-то данные по длительности иммунитета,

индуцированного Вашими конструкциями? Имеются ли такие данные в исследованиях других групп?

2. В настоящее время нет данных о том, будет ли изменяться РСВ при широком применении вакцин для профилактики этой инфекции. Если будут выявлены изменения в белках РСВ, требующие обновление вакцин, насколько будут эффективны конструкции, разработанные на основе вируса гриппа, при повторной вакцинации? Ситуация интересна также тем, что формирование иммунитета при интраназальной вакцинации конструкциями с использованием в качестве вектора вируса гриппа происходит аналогично формированию иммунитета при вакцинации живой вакциной, а в таком случае возможно формирование иммунитета не только к гомологичному, но и гетерологичному штамму вируса гриппа.

3. В работе имеются некоторые неточности, например, в Рис.17 в диссертации не показаны значения p для каждой группы при определении титра вируса в легких животных, только идет констатация факта, что отличия от контроля достоверны, в литературном обзоре на мой взгляд можно не включать подраздел 1.1.1. Респираторно-синцитиальный вирус, поскольку в нем отсутствует какое то содержание, логичнее было бы использовать такую нумерацию

1.1. Респираторно-синцитиальная вирусная инфекция


1.1.1. Структурно-функциональная организация РСВ.

1.1..2. Жизненный цикл РСВ

Возникшие вопросы и замечания носят частный и дискуссионный характер, ни в коей мере не снижают значимость, ценность и положительную оценку работы, и не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту.

Заключение. Диссертационная работа Пулькиной Анастасии Александровны на тему «Оптимизация гриппозного вектора с модифицированным белком NS1 для эффективной презентации антигенов респираторно-синцитиального вируса» представляет собой законченное научное исследование. По актуальности, научной новизне, объему проведенного исследования, глубине анализа полученных данных, использованных методов, научной и практической значимости диссертация Пулькиной А.А. соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013г. (в редакции Постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., №650 от 29.05.2017 г., №1024 от 28.08.2017 г., №1169 от 01.10.2018 г., №426 от 20.03.2021 г., №1539 от 11.09.2021 г., №1690 от 26.06.2022 г., №101 от 26.01.2023 г.), предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Пулькина Анастасия Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.10 – вирусология».

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»  Ленева Ирина Анатольевна

« 6 » марта 2024 г.

105064 Москва, Малый Казенный переулок, дом 5а.

Тел. +7(495) 917-49-00, e-mail: wnyfd385@yandex.ru

Подпись Ленева И.А. удостоверяю

Начальник отдела кадров

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»



Лукачева Елена Васильевна