

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Пулькиной Анастасии Александровны на тему: «Оптимизация гриппозного вектора с модифицированным белком NS1 для эффективной презентации антигенов респираторно-синтициального вируса», представленной в ДС Д 21.1.01.017 к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 «Вирусология»

Респираторно-синтициальный вирус (РСВ), наряду с вирусом гриппа и коронавируса SARS-CoV-2, один из основных клинически значимых респираторных патогенов, поражающих, в основном, детей первых месяцев жизни и пожилых людей.

Одним из наиболее эффективных средств борьбы с инфекцией РСВ является вакцинация. Но она, в основном, направлена на выработку вируснейтрализующих антител, в то время, как при вирусной инфекции важную защитную роль играют антиген-специфические Т-клетки.

Вакцины на основе рекомбинантных аттенуированных вирусных векторов индуцируют как гуморальный, так и Т-клеточный иммунный ответ, однако при их применении возникает проблема доминирования антигенных детерминант вектора. Таким образом, для создания эффективной векторной вакцины против инфекции РСВ необходимы исследования по оптимизации дизайна генетических конструкций самого вектора.

Вакцинные векторы вируса гриппа имеют ряд преимуществ. В частности, неструктурный белок NS1 является отличной мишенью для конструирования векторных вакцин, поскольку его укорочение ведет как к аттенуации вируса, так и к стимуляции цитокинового ответа. Но уровень гуморального и Т-клеточного ответа, как правило, невысокий. Поэтому существует необходимость в оптимизации стратегии конструирования векторов на основе вируса гриппа с модифицированным белком NS1 с целью повышения эффективности презентации эпитопов трансгена лимфоцитам.

Существенной проблемой векторов на основе вируса гриппа является доминирование эпитопов вектора над эпитопами гена интереса. Поэтому вопрос оптимизации дизайна конструкции гриппозных векторов с модифицированным белком NS1 остается открытым.

Вышеуказанное, а также значительная распространенность РСВ на территории России определяет актуальность представленной работы, целью которой являлась оценка влияния дизайна гриппозных векторов, экспрессирующих гены антигенов респираторно-синтициального вируса, ассоциированных с укороченным до 124 аминокислотных остатков (а.о.) белком NS1, на их иммуногенность и защитную эффективность в отношении экспериментальной инфекции РСВ.

Для достижения поставленной цели автор должен был решить несколько задач: получить репортерный гриппозный вектор, оценить его эффективность; сконструировать набор векторов на основе вируса гриппа с модифицированным белком NS1, экспрессирующих идентичный трансген участков белка F РСВ, но различающихся наличием или отсутствием сигнального пептида IgGк и расположением трансгена относительно укороченного до 124 а.о. NS1; изучить репродуктивную активность, безопасность и иммуногенность сконструированных векторов в экспериментах на белых мышах; оценить защитную эффективность векторов при однократной интраназальной иммунизации на модели экспериментальной РСВ-инфекции у мышей; охарактеризовать иммунный ответ в ходе РСВИ у иммунизированных животных.

Для выполнения поставленных задач применялись общепризнанные вирусологические, молекулярно-биологические и статистические методы исследования.

Научная новизна работы состоит в том, что впервые было показано, что белки трансгенов, слитые с укороченным до 124 а.о. белком NS1 вируса

гриппа А, детектируются во внеклеточном пространстве зараженных клеток.

Сконструирован оригинальный трансген для создания рекомбинантных векторов на основе вируса гриппа. Впервые показана возможность реконструкции сегмента гена NS путем встраивания новой открытой рамки считывания для последовательности гена антигена РСВ, дополненного геном сигнального пептида IgGк. Впервые показана возможность образования Т-клеточного иммунного ответа при дополнении гена интереса последовательностью гена сигнального пептида IgGк. Продемонстрирована защитная эффективность созданных рекомбинантных вирусных векторов в отношении экспериментальной РСВИ белых мышей. При этом наибольший уровень подавления репликативной активности вируса при отсутствии токсического действия достигался при иммунизации животных гриппозными векторами, содержащими ген сигнального пептида IgGк. Показана связь защитного механизма интраназальной иммунизации мышей рекомбинантным вектором NS-2AsF с формированием РСВ-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, а также привлечением CD4<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток в ткани легких.

Теоретическая значимость работы состоит в том, что доказано, что введение гена последовательности сигнального пептида IgGк в состав трансгена позволяет сфокусировать и существенно усилить Т-клеточный иммунный ответ к эпитопам рекомбинантного белка. При этом защита мышей от экспериментальной РСВИ достигалась уже после однократной иммунизации животных благодаря формированию РСВ-специфического Е-клеточного иммунного ответа даже в отсутствие вирус нейтрализующих антител.

Полученные в рамках проведенных исследований результаты были использованы при создании вакцины RSV/Flu-01E, предназначенной для профилактики РСВИ у пожилых людей и находящейся на этапе

клинических исследований I и II фазы. Кроме того, результаты исследований могут быть использованы при конструировании других векторов, кодирующих вставки протективных антигенов патогенов, для которых актуальна индукция Т-клеточного иммунного ответа.

Основные результаты, представленные в диссертационной работе, опубликованы в 3 научных статьях, 4 из которых входят в Перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ, 1 патенте на изобретение. По теме диссертации опубликовано 8 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

При проведении оценки представленного автореферата диссертации А.А. Пулькиной было отмечено, что в работе, в соответствии с требованиями п.25 «Положения о порядке присуждения ученых степеней...», изложены основные идеи и выводы диссертации, показан вклад автора в проведенное исследование, приведена степень новизны и практическая значимость полученных результатов исследований и содержится другая необходимая справочная информация, т.е. по формальным признакам работа соответствует указанному пункту «Положения...».

В целом, детальное рассмотрение представленного реферата позволяет сделать заключение об актуальности и наукоемкости диссертационной работы. Немногочисленные грамматические ошибки не оказывают существенного негативного влияния на оценку ее качества.

Объем диссертации (132 страницы), количество иллюстративного материала (6 таблиц и 31 рисунок) и цитируемых источников литературы (277 отечественных и зарубежных источников) соответствует т.н. «золотому стандарту» для кандидатских диссертаций (объем 130-170 страниц, 30-40 единиц иллюстративного материала, от 180 до 250 ссылок на литературные источники).

**ВЫВОД:** Содержание автореферата диссертации Пулькиной Анастасии Александровны на тему: «Оптимизация гриппозного вектора с модифицированным белком NS1 для эффективной презентации антигенов респираторно-синтициального вируса», на соискание ученой степени кандидата биологических наук, дает основание, в соответствии с требованиями п.25 «Положения о порядке присуждения ученых степеней...», для положительной оценки представленной работы и заключения о возможности присуждения соискателю искомой ученой степени.

Отзыв составила:

Старший научный сотрудник отдела  
ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник



Плекханова Тамара Михайловна

Начальник 3 НИУ

ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России  
доктор медицинских наук,  
полковник медицинской службы

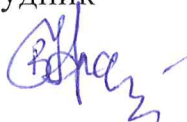


Петров Александр Анатольевич

Подпись Плекхановой Т.М. заверяю

Ученый секретарь научно-технического совета

ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России  
кандидат медицинских наук,  
старший научный сотрудник



Краснянский Владимир Павлович

«18» марта 2024 г.