

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Серёгина Сергея Викторовича «Оптимизация конструкций рекомбинантных ДНК для получения иммунобиологических препаратов», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

### Актуальность проблемы

Благодаря развитию и расширению молекулярно-биологической и генно-инженерной методической базы за последние 30 лет достигнут значительный прогресс в биотехнологии производства БАВ, в области структурно-функциональных исследований геномов патогенных микроорганизмов и вирусов, а также в создании вакцинных и диагностических средств нового поколения. Существенно расширены представления и о факторах патогенности возбудителей инфекций.

Однако многие проблемы, связанные с изучением молекулярных механизмов патогенеза и разработкой вакцин против ВИЧ-инфекции и ряда особо опасных инфекций, вызываемых, в частности, вирусами Эбола, Марбург и Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) всё ещё остаются нерешёнными. Ввиду отсутствия средств специфической профилактики ВИЧ-инфекции это заболевание остается серьезной проблемой общественного здравоохранения во всём мире. Согласно совместному докладу Европейского центра по контролю и профилактике заболеваемости (ECDC) и Европейского регионального бюро ВОЗ, сделанному в 2013 г. по уровню заболеваемости ВИЧ Россия находится в ряду европейских лидеров - вместе с Эстонией и Украиной, по крайней мере, в 2006-2012 годах.

Не лучшим образом обстоят дела и с инфекцией, вызываемой ККГЛ. Какой-либо вакцины для людей или животных против ККГЛ до сих пор не существует. Стремительное развитие симптоматики и потенциально высокий уровень смертности на ранних сроках развития ККГЛ определяют необходимость создания эффективной вакцины и разработки методов экспресс-диагностики ККГЛ для обеспечения мониторинга ситуаций с возможными вспышками этого опасного заболевания в эндемичных по ККГЛ районах.

В этой связи диссертационная работа Серёгина С.В., посвящённая конструированию рекомбинантных плазмидных ДНК и получению на их основе бактериальных штаммов-продуцентов различных белков-иммуномодуляторов, а также конструированию кандидатных ДНК-вакцин против ВИЧ/СПИД и ККГЛ и разработке новых методов экспресс-

диагностики и генотипирования вируса ККГЛ является, несомненно, чрезвычайно актуальным исследованием, имеющим важное значение как для науки, так и для практического здравоохранения.

### **Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов диссертации.**

Диссертационная работа Серёгина С.В. представляет собой большое по объёму разноплановое исследование с использованием современных молекулярно-биологических, генно-инженерных методов и компьютерных методов анализа. В частности, с использованием генно-инженерных методов соискателем были сконструированы серии плазмидных векторов, предназначенных для экспрессии целевых генов, как в клетках *E. coli*, так и эукариотических клетках. На основе этих векторов были получены продуценты БАВ, рекомбинантных антигенов и ДНК-вакцины против ВИЧ и ККГЛ нового поколения.

Всё изложенное позволяет говорить о высоком профессиональном и методическом уровне исследования. Большой объем экспериментального материала, применение многопланового подхода, использование современных высокоинформативных методов исследований и теоретическое обобщение полученных данных, позволили соискателю сформулировать основные научные положения и выводы диссертационной работы, объективность и высокая степень достоверности которых не вызывает сомнений.

### **Научная новизна и практическая значимость работы**

Соискателем сконструирована оригинальная векторная плазида pRTU1, предназначенная для клонирования и экспрессии целевых генов в клетках *E. coli*. На основе этой плазмиды созданы эффективные бактериальные штаммы-продуценты ряда природных, мутантных и химерных иммуномодулирующих белков, в том числе: интерлейкина-2 человека и двух его мутантных аналогов; двух химерных белков ILA и AIL, состоящих из интерлейкина-2 человека и цитотоксической А-субъединицы шига-токсина; анафилатоксина С5а человека; ангиогенина человека; белка, гомологичного рецептору  $\gamma$ -интерферона человека двух штаммов вируса натуральной оспы.

Сконструирована также рекомбинантная плазида pcDNA-TCl, содержащая под контролем CMV-промотора искусственный ген TCl, кодирующий множественные CTL-эпитопы основных антигенов ВИЧ-1. Эта плазида в настоящее время успешно используется в ГНЦ ВБ «Вектор» для разработки современных вакцин нового поколения.



В результате выполнения диссертационной работы соискателем получены принципиально новые данные, касающиеся повышения эффективности ДНК-вакцин. В частности, эти результаты поддерживают концепцию, согласно которой убиквитин-зависимое нацеливание полиэпитопной конструкции на протеасому, а также ее оптимизация путем использования спейсерных последовательностей, содержащих сайты протеасомного расщепления и мотивы для связывания эпитопов с ТАР, обеспечивает рациональный дизайн полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов, нацеленный на повышение их иммуногенности.

Получен набор рекомбинантных ДНК на основе сконструированных векторов pV1, pV2, pV3, предназначенный для создания перспективных ДНК-вакцинных препаратов против ВИЧ/СПИД и ККГЛ. Соискателем с соавторами разработаны и внедрены в производство современные методы экспресс-диагностики ККГЛ и генотипирования вируса ККГЛ, основанные на ОТ-ПЦР и ПДРФ. Предложенный набор праймеров для детекции РНК вируса ККГЛ в биологических образцах является в определенной мере универсальным, учитывающим особенности строения геномов всех известных генетических вариантов вируса ККГЛ. Получен рекомбинантный нуклеокапсидный белок N вируса ККГЛ, который может быть успешно использован в диагностических тест-системах по обнаружению антигена вируса ККГЛ в клинических образцах. Большая часть исследований и разработок защищена патентами РФ на изобретения.

Таким образом, в диссертационной работе изложены новые научно обоснованные генно-инженерные и биотехнологические решения, использование которых может внести значительный вклад в развитие медицинской биотехнологии и вакцинологии в стране.

### **Общая характеристика работы.**

Диссертационная работа С.В. Серегина изложена на 311 стр. формата А4 машинописного текста, имеет традиционную структуру и состоит из: списка сокращений, общей характеристики работы, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка работ, опубликованных по теме диссертации, и списка цитируемой литературы (содержит 532 источника). В разделе диссертации "Общая характеристика работы" в краткой форме изложено состояние проблемы в области получения БАВ и разработки эффективных противовирусных препаратов с применением генно-инженерных технологий, ясно сформулированы цели и задачи исследования.



Раздел «Обзор литературы» состоит из двух подразделов. В первом приведены этапы становления генетической инженерии в хронологическом порядке и кратко охарактеризованы современные экспрессионные системы с акцентом на методы получения, клонирования и экспрессии целевых генов в прокариотической системе. Очень подробно рассмотрены автором результаты, полученные другими исследователями при использовании *ресА*-промотора в экспрессирующих векторных системах.

Второй подраздел посвящен созданию и перспективам использования ДНК-вакцин. Особое внимание автор уделил истории разработок различных вакцин против ВИЧ/СПИД и современному состоянию исследований в этом направлении с акцентом на создание и клинические испытания ДНК-вакцин как вакцин будущего. Приведен также полный список разрешенных к использованию ветеринарных ДНК-вакцин.

В разделе «Материалы и методы исследования» дается подробное описание реактивов, материалов, использованных генно-инженерных и молекулярно-биологических методик и приводятся способы синтеза искусственных генов и сборки экспрессирующих генетических конструкций. Материалы этого раздела изложены детально и последовательно.

Раздел «Результаты и обсуждение» в целом выглядит хорошо, построение материала вполне логично. Следует отметить, что автор применил оригинальный прием: каждый подраздел открывает небольшая глава, кратко характеризующая объект исследования и включающая литературные данные, имеющиеся к моменту начала работы. Такая компоновка материала вполне оправдана, поскольку способствует лучшему пониманию логики работы и восприятию ее в целом.

Список литературы составлен очень аккуратно и грамотно. Особо хочется отметить, что автор уделил достаточно внимания публикациям в отечественных научных изданиях – их насчитывается 73 (из 532).

Содержание диссертации характеризуется четким, последовательным изложением, текст работы проиллюстрирован 65 рисунками и 11 таблицами. Общее впечатление от работы весьма благоприятное, она воспринимается как целостный завершенный научный труд, выполненный автором на высоком научно-методическом уровне.

Результаты исследования достаточно полно апробированы, докладывались на более чем 25 международных, всероссийских и региональных научных форумах. По материалам диссертации опубликовано 35 научных статей в ведущих отечественных и зарубежных журналах. Характеризуя работу в целом можно утверждать, что цели работы и задачи



исследования глубоко продуманы и научно обоснованы. Поставленные соискателем задачи были полностью выполнены, результаты исследования, полученные с помощью современных генно-инженерных и молекулярно-биологических методов являются достоверными. Выводы и положения, выносимые на защиту, полностью соответствуют полученным результатам. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации. Диссертационная работа, по таким критериям, как: актуальность исследования, научная новизна и практическая значимость, - соответствует уровню докторской диссертации. Научная новизна и приоритетность выполненных исследований подтверждена 8-мью патентами Российской Федерации на изобретения. Все это позволяет высоко оценить диссертационное исследование Серёгина С.В.

Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы нет, хотя к соискателю есть вопросы дискуссионного характера:

1. Сконструированная соискателем векторная плазмида pRTU1, действительно обеспечивает эффективную индуцируемую экспрессию целевых генов под контролем сильного промотора *recA Proteus mirabilis*, но в этой системе экспрессии есть и существенный недостаток. Прежде всего это высокая токсичность применяемых индукторов (митомицин С, налидиксовая кислота, УФ-облучение) для бактериальных клеток-продуцентов и как следствие этого невозможность осуществления продолжительной индукции синтеза целевого продукта. Находит ли эта система экспрессии применение в настоящее время?
2. Чем обусловлено отмеченное в работе выраженное угнетение пролиферации бласт-трансформированных Т-лимфоцитов при воздействии на них химерного белка АИЛ в концентрации 10 мкг/мл? И правомерно ли на основе этих экспериментов делать заключение, что такие химеротоксины, вероятно, могут быть использованы в качестве иммунодепрессанта?
3. Почему при характеристике полученного в работе рекомбинантного ангиогенина человека определялась только его иммуноспецифичность (метод иммуноблоттинга с использованием моноклональных антител к ангиогенину человека), но не проводилось испытание функциональной активности рекомбинантного белка?
4. Допущены отдельные стилистические ошибки, искажающие смысл предложений:
  - «Специфическая активность полученных ДНК-вакцинных конструкций (имеется ввиду продуктов их экспрессии) оценивалась как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*».

- «Было показано, что плаزمида (имеется ввиду продукты экспрессии гена *CTI* с *Ub* на N-конце химерной белковой молекулы), кодирующая иммуноген *UbC3* (с *Ub* на N-конце химерной белковой молекулы), оказалась наиболее иммуногенной, так как она вызывала максимальную экспрессию комплексов [пептид-молекула МНС-I класса] на поверхности трансфецированных клеток, а также индуцировала ответы *CD8+* *CTL* на большее количество пептидов по сравнению с другими плазмидами».

Высказанные замечания несколько не умаляют достоинств рецензируемой работы. Объем полученных результатов, как и самих научных исследований, весьма значителен. Квалификация автора как специалиста в области генетической инженерии не вызывает никаких сомнений, как и ценность представленных им результатов.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Разработанные диссертантом подходы к созданию вакцин нового поколения против ВИЧ и ККГЛ, основанные на искусственных ДНК-вакцинных конструкциях, индуцирующих *CTL*-ответы на множественные специфические эпитопы вирусных белков, могут быть использованы в аналогичных работах применительно к созданию средств специфической профилактики других вирусных инфекций.

Предложенные соискателем современные методы экспресс-диагностики ККГЛ и генотипирования вируса ККГЛ в биологических образцах, могут быть использованы на региональном и федеральном уровне организаторами здравоохранения при планировании мероприятий по мониторингу и контролю над распространением ККГЛ и раннему выявлению этого заболевания.

Материалы диссертации целесообразно включить в соответствующие курсы лекций для студентов ВУЗов, врачей факультетов усовершенствований последипломного образования.

### **Заключение**

Докторская диссертация Серегина С.В. «Оптимизация конструкций рекомбинантных ДНК для получения иммунобиологических препаратов», является законченной научной квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований сформулированы положения, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное достижение в молекулярной биологии, вирусологии и вакцинологии — представлено концептуальное решение создания эффективных



противовирусных ДНК-вакцин, а также средств диагностики и генотипирования ККГЛ.

Диссертационная работа по актуальности изучаемой проблемы, степени научной новизны, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте публикаций материалов в научных печатных изданиях, полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к докторским диссертациям, критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (постановление Правительства № 842 РФ от 24.09.2013 г.), а её автор Серегин Сергей Викторович заслуживает присуждения степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

**Официальный оппонент:**

заведующий лабораторией генной инженерии  
ФГБНУ «НИИ биохимии»  
доктор биологических наук, профессор  
Беклемишев А.Б.

630117, г.Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

Факс: (383) 333-67-58,

Контактный телефон – (383) 335-96-58

[beklem@niibch.ru](mailto:beklem@niibch.ru)

Учёный секретарь

ФГБНУ «НИИ биохимии» СО РАМН



Гольцова Т.В.