ОТЗЫВ

официального оппонента Ленёвой Ирины Анатольевны, доктора биологических наук на диссертационную работу Авдошиной Дарьи Валерьевны на тему: «Экспериментальные подходы к созданию и оценке эффективности терапевтических ДНК-вакцин против ВПЧ-ассоциированного рака», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология

Актуальность темы диссертации

Инфицирование высокоонкогенными типами вируса папилломы человека является причиной около 5% онкологических заболеваний в мире. Одним из перспективных подходов к лечению злокачественных новообразований, ассоциированных с хронической инфекцией ВПЧ, является терапевтическая вакцинация. Более половины всех разработанных на сегодняшний день терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированных заболеваний нацелены на белки Е6 и Е7 ВПЧ 16 типа, поскольку этот тип ответственен за более чем 50% случаев РШМ, рака анальной области и плоскоклеточного рака ротоглотки во всем мире. Множественные разработанные к настоящему времени терапевтические вакцины все еще показывают низкую эффективностью в клинических испытаниях. Это определяется как низким трансляционным потенциалом данных, получаемых в доклинических исследованиях, так и этническими особенностями населения, в основном иммунной системы, определяющей давление на вирус и направляющей его эволюцию. Среди вакцинных платформ вакцины на основе ДНК являются наиболее перспективными с точки зрениях простоты и скорости разработки, а также их безопасности. ДНК-вакцины способны индуцировать как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ. Тем не менее, сравнительно низкая иммуногенность, обусловленная в значительной мере неэффективной внутриклеточной доставкой ДНК, является ограничением для клинического применения ДНК-вакцин.

Таким образом, высокая потребность в эффективных терапевтических вакцинах против ВПЧ-ассоциированного рака определяет актуальность диссертационного исследования. Разработка адекватных и тщательно охарактеризованных *in vivo* и *in vitro* моделей для изучения ВПЧ-ассоциированного онкогенеза, а также установления влияния аминокислотных замен в вакцинных антигенах, способов доставки ДНК-вакцин и схем иммунизации на способность поствакцинального иммунного ответа ограничивать рост и метастазирование ВПЧ-ассоциированных опухолей позволит разработать новое поколение эффективных терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированного рака.

Диссертация Авдошиной Дарьи Валерьевны посвящена разработке компонентов и методологии доклинических испытаний терапевтических ДНК-вакцин против злокачественных заболеваний, ассоциированных с хронической инфекцией вирусом папилломы человека 16 типа, основанных на белках вируса Е6 и Е7. Автором был решен ряд **задач,** включающих: (1) анализ изменчивости аминокислотных последовательностей белков Е6 и Е7 изолятов ВПЧ16, циркулирующих на территории Европы, включая европейскую часть РФ, и конструирование ДНК-вакцинных конструктов, кодирующих консенсусные белки Е6 и Е7 ВПЧ16; (2) подбор оптимальных методов доставки плазмид *in vivo* на мышах, и схем ДНК-иммунизации; (3) оценку иммуногенности полученных консенсусных последовательностей Е6 и Е7 ВПЧ16 на мышах; (4) исследование способности полученных консенсусных последовательностей Е6 и Е7 ВПЧ16 в составе ДНК-вакцинных конструкций ограничивать рост и метастатическую активность опухолевых клеток TC-1/luc2, оценена корректность использования данной модели для указанной цели; (5) разработку новой модели для тестирования терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированного рака на основе опухолевой клеточной линии мышей 4T1luc2, оценку ее эффективности и предикативной силы.

Научная новизна

В работе впервые был проведен анализ белков Е6 и Е7 циркулирующих на территории Европы и европейской части РФ вариантов ВПЧ16, как по общей изменчивости, так и по региональным различиям. Впервые было определено пороговое значение ионной силы буфера, необходимого для эффективной доставки ДНК *in vivo*. Впервые было продемонстрировано, что одиночное введение ДНК Е7 ВПЧ16 индуцирует продукцию цитокина ФНО-α, а также увеличивает количество воспалительных инфильтратов в печени, при совместном введении с ДНК Е6 приводит к снижению иммунного ответа на Е6, что исключает возможность их совместного введения. Впервые была проведена характеристика *in vitro* широко используемой в доклинических испытаниях терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированных злокачественных новообразований модели TC-1/luc2 и показаны возможные механизмы, за счет которых данная модель не позволяет в полной мере оценить терапевтический потенциал вакцинных кандидатов. Были впервые получены производные высоко туморогенной, спонтанно метастазирующей клеточной линии 4T1luc2, экспрессирующие Е6 и Е7 ВПЧ16, показана возможность их использования для оценки терапевтического потенциала модельных ДНК вакцин на основе Е6 и Е7 ВПЧ16.

Теоретическая и практическая значимость

Заключается в том, что были получены данные по вариабельности аминокислотной последовательности белков Е6 и Е7 циркулирующих Европе и европейской части РФ вариантов ВПЧ16, которые могут быть использованы для конструирования новых актуализированных терапевтических вакцин против неоплазий и опухолей, ассоциированных с инфекцией ВПЧ для европейской популяции. Определенные в рамках работы основные физические параметры методов электропорации и сонопорации, влияющих на их эффективность при доставке плазмидной ДНК *in vivo*, могут быть использованы при разработке протоколов доставки ДНК мышам указанными методами с применением другого, отличного от используемого в работе,

оборудования. Определенное в работе пороговое значение ионной силы буфера, необходимое для эффективной доставки ДНК *in vivo*, может быть учтено при разработке протоколов непринудительной и принудительной доставки ДНК *in vivo*. Полученные данные о негативных последствиях совместного/одновременного введения двух иммуногенов на основе белков Е6 и Е7 ВПЧ позволят корректировать схемы вакцинации данными иммуногенами. Продемонстрированная зависимость эффективности отбора кандидатных вакцин с высокой иммуногенностью от используемых доклинических моделей, что позволит проводить более строгий отбор релевантных животных моделей в доклинических исследованиях. Разработанная в рамках диссертационного исследования модель на основе сингенной клеточной линии мышей, линии 4T1luc2, экспрессирующей белки Е6/Е7 ВПЧ16, как аналога «естественных» агрессивных опухолей, ассоциированных с ВПЧ16, позволит более строго оценивать эффективность кандидатных вакцин против ВПЧ.

Основные научные результаты, изложенные в диссертации, представлены в виде 5 печатных работ, из них 4 – научные статьи и 1 – научный обзор. Все работы опубликованы в журналах, индексируемых в международных библиографических базах данных: Web of Science, Scopus и RSCI. Все публикации соответствуют требованиям категорирования журналов, в которых должны быть опубликованы результаты диссертационного исследования.

Степень обоснованности и достоверности представленных положений и выводов

Достоверность полученных данных определяется достаточным числом исследований, комплексным подходом к проведению исследований, выполненных с использованием современных молекулярно-биологических методов, программного обеспечения и статистической обработкой полученных результатов. Все научные выводы и положения, выносимые на защиту, правомерны и основаны на результатах собственных исследований

автора, обоснованность не вызывает сомнений. Работа выполнена на современном научно-методическом уровне и имеет внутреннее единство. Материалы исследования были представлены и обсуждены автором в 14 докладах на международных и отечественных конференциях.

Научная специальность, которой соответствует диссертация Результаты и научные положения диссертации соответствуют пунктам 4, 7, 10 и 11 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа представлена на 192 страницах машинописного текста. Работа оформлена в соответствии с традиционными требованиями к оформлению диссертаций и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Результаты работы иллюстрированы 37 рисунками и 14 таблицами.

Несомненным достоинством работы является качество изложенного материала, представленного последовательно и аргументировано. Диссертация написана грамотным языком с соблюдением требований научного стиля. Во введении раскрыта актуальность темы исследования, определены цель и задачи диссертационной работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость полученных результатов, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, показаны степень достоверности результатов и их апробация.

В главе «Обзор литературы» дано подробное описание вируса папилломы человека (ВПЧ) и подходах к созданию терапевтических вакцин. В ней рассмотрены молекулярно-биологические особенности ВПЧ (геном, классификация, жизненный цикл, патогенез, механизмы уклонения от иммунного ответа); структура и онкогенные свойства белков Е6 и Е7 ВПЧ16, их иммуногенные характеристики и роль в канцерогенезе. Проведен анализ

текущего состояния разработок терапевтических вакцин, включая ДНК-вакцины, способы повышения их иммуногенности. Рассматриваются методы доставки ДНК-вакцин. Описываются существующие доклинические модели для тестирования противоопухолевых вакцин.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны методы молекулярной биологии: работа с культурами эукариотических клеток, работа с бактериальными клетками, трансфекция, трансформация, получение лентивирусных частиц, трансдукция, конвенциональная полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ), цифровая капельная ПЦР (цкПЦР), получение моноклональных производных эукариотических клеток. Представлены методики конструирования ДНК-иммуногенов. Подробно описаны методы работы с экспериментальными животными: введение ДНК методом электропорации и сонопорации *in vivo*, подбор параметров электропорации и сонопорации, в том числе подбору ионной силы буфера, описана имплантация мышам клеток, экспрессирующих люциферазу, с последующей детекцией биолюминесценции *in vivo* и *ex vivo*. Особое внимание уделено описанию особенностей сбора данных с разных приборов для детекции биолюминесценции. Уделено внимание комплексам иммунологических и гистологических методов, а также статистической обработке данных. Раздел демонстрирует воспроизводимость и методическую строгость.

В главе «Результаты» материал изложен последовательно в соответствии с поставленными задачами. Каждый раздел главы сопровождается поясняющей вводной частью, содержит таблицы и рисунки. Изложен материал по разработке ДНК-вакцин, сконструированных на основе актуализированных последовательностей E6/E7 ВПЧ16, и оценка их способности обеспечивать синтез целевых мРНК в трансфицированных клетках. Приведены данные по оптимизации и сравнению методов доставки ДНК-конструктов. Приведены результаты оценки гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей, иммунизированных различными ДНК-

вакцинными конструкциями. Представлено описание создания и характеристика новой мышиной модели опухолевых клеток 4T1luc2, стабильно экспрессирующих E6 и E7 ВПЧ16. Приведены данные по проверке терапевтического потенциала ДНК-вакцин на модели TC-1/luc2 и в новой модели на основе 4T1luc2.

Глава «Обсуждение» посвящена интерпретации полученных данные в контексте современных научных представлений, объясняются возможные причины наблюдаемых эффектов и ограничений.

В конце диссертации представлено заключение, содержащее основные выводы по теме исследования, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы. Выводы и рекомендации обоснованы и соответствуют полученным данным и поставленным задачам.

Автореферат диссертации на 24 листах в полной мере отражает содержание диссертации.

Замечания и вопросы

В рецензируемой диссертационной работе не выявлены существенные недостатки. В качестве отдельных замечаний по оформлению и дискуссионных вопросов можно отметить следующие:

1. В работе использовались мыши двух различных линии, однако нет четкого объяснения почему это необходимо. Кроме того, в разделе «Материалы и методы» указано, что мыши этих двух линий BALB/c и C57Bl/6 получались из трёх разных источников: питомник Envigo (Нидерланды), Charles River Laboratories (Германия) и НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Пущино, Россия). В работе не указано, какие именно мыши из какого питомника использовались в каждом конкретном эксперименте. Это важно, поскольку микробиом, генетический дрейф и условия содержания животных в разных питомниках могут существенно влиять на иммунные ответы, а автором не обсуждается каким образом это могло сказаться на полученные результатах.

2. В разделе по оценке эффективности терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированного рака на основе опухолевой клеточной линии мышей 4T1luc2, было бы хорошо более четко обозначить конечные точки (критерии), определяющие эффективность вакцин в этой модели.

3. На разработанной модели 4T1luc2 Вами тестировалась только ДНК-вакцина. Можно ли ожидать в этой модели эффект вакцин, разработанных на принципиально других платформах (белковых или пептидных вакцинных кандидатов) или отсутствие эффекта является специфичным для ДНК-платформы или же это общая проблема иммуногенности Е6?

4. Несмотря на то, что работа тщательно проверена в ней все-таки встречаются опечатки, в тексте автореферата и диссертации: «Еб» вместо «Е6» (в нескольких местах), «в сравнеии» (опечатка), «Нидерданды» (опечатка), в диссертации мышиные опухолевые клетки сокращаются по-разному ОМК -МОК, мыши С57Bl/6 вместо С57BL/6 и т.д.

Возникшие вопросы и замечания ни в коей мере не снижают значимость и ценность работы, а скорее могут служить основой для новых идей и дальнейших исследований.

Заключение.

Диссертация Авдошиной Дарьи Валерьевны на тему: «Экспериментальные подходы к созданию и оценке эффективности терапевтических ДНК-вакцин против ВПЧ-ассоциированного рака», соответствует паспорту научной специальности 1.5.10. Вирусология, является законченной научно-квалификационной работой, по актуальности, объему проведенных исследований, их новизне и научно-практической значимости соответствует требованиям, установленным в пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (в ред. Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 N 723, от 21.04.2016 N 335, от 02.08.2016 N 748, от 29.05.2017 N 650, от 28.08.2017 N 1024, от 01.10.2018

N 1168, от 20.03.2021 N 426, от 11.09.2021 N 1539, от 26.09.2022 N 1690, от 26.01.2023 N 101, от 18.03.2023 N 415, от 26.10.2023 N 1786, от 25.01.2024 N 62, от 16.10.2024 №1382, от 18.07.2026 №905 ред. от 18.07.2026 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, ученой степени кандидата наук, а ее автор Авдошина Дарья Валерьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Согласна на сбор, обработку, хранение и размещение в сети «Интернет» моих персональных данных (в соответствии с требованиями Приказа Минобрнауки России №1 от 09.01.2020 г. (ред. от 01.03.2024 г.), необходимых для работы диссертационного совета 24.1.255.01.

Официальный оппонент:
Заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток
им. И.И. Мечникова» Министерства науки и высшего
образования Российской Федерации
доктор биологических наук
e-mail: wnyfd385@yandex.ru,
тел: +7 (916) 211-88-78

Ленёва Ирина Анатольевна

Подпись д.б.н. Ленёвой И.А. заверяю.
Ученый секретарь ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова

А.В. Васильева

«7» октября 2026 г.