ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

кандидата биологических наук Винокуровой Светланы Владимировны, 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 ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Актуальность темы исследования

Инфекция вирусами папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска является одной из ведущих причин развития злокачественных новообразований вирус-ассоциированной природы. Наибольшее значение имеют онкогенные типы ВПЧ, прежде всего ВПЧ-16 и ВПЧ-18, геном которых кодирует ранние белки E6 и E7. Экспрессия этих белков приводит к нарушению ключевых механизмов регуляции клеточного цикла, ингибированию супрессоров опухолевого роста, изменению процессов репарации ДНК и уклонению опухолевых клеток от иммунного надзора. В совокупности это способствует трансформации клеток и поддержанию злокачественного фенотипа. Несмотря на значительный прогресс в профилактике ВПЧ-ассоциированных заболеваний, включая вакцинацию и совершенствование методов скрининга, проблема лечения уже сформировавшихся опухолей остается актуальной. Поэтому особый интерес представляет разработка методов терапевтической вакцинации и иммунотерапии, направленных на формирование эффективного клеточного иммунного ответа против опухолевых клеток, экспрессирующих онкогенные белки ВПЧ.

Перспективным направлением является использование ДНК-вакцин (рекомбинантных плазмидных или синтетических ДНК-конструкций), кодирующих антигены ВПЧ. Такие препараты доставляются в клетки-хозяева (преимущественно в антигенпрезентирующие клетки и миоциты) с помощью физических методов (электропорация, инъекции под давлением) или химических носителей, что обеспечивает внутриклеточную экспрессию вирусных антигенов и их последующую презентацию в комплексе с MHC I и MHC II. Это приводит к активации CD8+- и CD4+-Т-лимфоцитов, способных распознавать и уничтожать опухолевые клетки, экспрессирующие онкобелки ВПЧ.

Актуальность исследования обусловлена также потребностью в адекватных экспериментальных моделях, позволяющих комплексно оценивать противоопухолевую активность и иммунологические механизмы действия новых вакцинных конструкций. В работе используются клеточные линии TC-1luc2 и 4T1luc2, экспрессирующие онкогены E6 и E7 ВПЧ-16, а также репортерный ген люциферазы. Модель TC-1luc2 представляет собой линию вирус-индуцированной опухоли, в которой опухолевый рост обусловлен экспрессией онкогенов E6 и E7 ВПЧ-16, что делает ее релевантной для изучения специфического иммунного ответа на антигены ВПЧ и оценки эффективности вакцин, нацеленных на вирус-ассоциированные новообразования. Линии 4T1luc2, модифицированные авторами для экспрессии тех же онкогенов E6 и E7 ВПЧ-16, позволяют оценивать эффективность вакцинных конструкций в условиях агрессивной опухоли с высоким метастатическим потенциалом. Люциферазная маркировка клеточных линий обеспечивает возможность прижизненной биолюминесцентной визуализации, что позволяет проводить динамическое наблюдение за кинетикой опухолевого роста, оценивать эффективность терапии в реальном времени и количественно характеризовать распространение опухолевого процесса и метастазирование *in vivo* с высокой чувствительностью и воспроизводимостью.

Актуальность работы продиктована потребностью в стандартизации методов доставки и доклинической оценки ДНК-вакцин. Эффективность препаратов зависит от

множества переменных: от способа введения и дозировки до физических методов трансфекции (электро- и сонопорация) и состава лекарственной формы. Систематизация этих параметров необходима для повышения воспроизводимости исследований, объективного сравнения различных вакцинных платформ и ускорения их перехода к клиническому применению.

Таким образом, актуальность темы определяется сочетанием нескольких факторов: высокой медико-социальной значимостью ВПЧ-ассоциированных опухолей, ограниченной эффективностью существующих методов лечения, потребностью в новых подходах к терапевтической вакцинации и иммунотерапии, а также необходимостью создания и комплексной оценки экспериментальных моделей для доклинического изучения противоопухолевых препаратов. Полученные результаты могут способствовать совершенствованию технологий разработки ВПЧ-специфических вакцинных конструкций и расширению возможностей экспериментальной оценки их противоопухолевого действия.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Авдошиной Д. В. отличается высоким методическим уровнем, убедительностью научной аргументации и обоснованностью сформулированных положений, выводов и практических рекомендаций. Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций диссертации определяется комплексным использованием современных методологических, экспериментальных и аналитических подходов. В работе последовательно реализованы молекулярно-генетическое конструирование, создание и характеристика клеточных моделей, оценка экспрессии целевых генов, иммунологический анализ и доклиническое изучение противоопухолевой активности *in vivo*. Научные положения основаны на современных представлениях о биологии вирусов папилломы человека высокого онкогенного риска, роли онкопротеинов E6 и E7 ВПЧ-16 в трансформации клеток и разработке терапевтических вакцин.

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием валидированных методов, адекватных контролей и корректной статистической обработкой данных. Применение биолюминесцентной визуализации *in vivo*, проточной цитометрии и молекулярно-генетического анализа экспрессии онкогенов обеспечило комплексный подход к исследованию. Использование клеточных линий TC-1 и 4T1 (включая их люцифераз-меченные производные) позволило оценить эффективность вакцинных конструкций на различных опухолевых моделях и проводить динамический мониторинг роста новообразований. Согласованность данных, полученных независимыми методами в разных сериях экспериментов, подтверждает высокую воспроизводимость и надежность выводов.

Выводы диссертации последовательно раскрывают поставленные задачи и опираются на полученные результаты. В работе показано, что эффективность вакцинных конструкций зависит от их структуры, уровня экспрессии антигенов, иммуногенности трансгена и особенностей опухолевого микроокружения. Разработанные рекомендации по оптимизации вакцин и способов их введения экспериментально обоснованы и перспективны для доклинического изучения терапевтических средств против ВПЧ-ассоциированных опухолей. Научные положения диссертации внутренне непротиворечивы и подкреплены комплексом современных экспериментальных данных.

Достоверность полученных результатов и новизна исследования

Достоверность результатов диссертации обеспечена применением комплекса взаимодополняющих методов, строгим контролем качества на всех этапах работы и независимой верификацией ключевых результатов. Использованы стандартизированные методы молекулярной биологии, иммунологии и клеточной биологии, включая

секвенирование E6/E7 ВПЧ-16, оценку экспрессии мРНК и белка, коммерческие и собственные тест-системы детекции ВПЧ, а также биолюминесцентную визуализацию *in vivo* в сочетании с гистологией и молекулярной детекцией.

Стабильность экспрессии трансгенов в клеточных линиях TC-1luc2 и 4T1luc2 подтверждена в независимых экспериментах; согласованность данных BLI, гистологического анализа и молекулярных методов минимизирует риск метод-специфичных артефактов. Статистическая обработка выполнена с указанием размеров групп, значений p и использованных тестов, что обеспечивает прозрачность анализа и возможность независимой оценки надежности выводов. Воспроизводимость результатов подтверждается согласованностью данных в независимых сериях экспериментов и их соответствием литературным данным.

Научная новизна исследования заключается в установлении большей вариабельности онкопротеина E6 по сравнению с E7 в европейских изолятах ВПЧ16, выявлении наиболее распространенной замены E6 L90V и сходства генетических вариантов вируса в европейской части РФ и Северной Европе. На основании этих данных разработаны консенсусные последовательности E6 и E7 и векторы для их экспрессии в клетках млекопитающих. Проведено сравнительное изучение методов доставки плазмидной ДНК in vivo, продемонстрировано преимущество электропорации и установлено, что совместное введение иммуномодулирующего гена с сильным иммуногеном может снижать антиген-специфичный Т-клеточный ответ. Охарактеризованы иммунологические эффекты E6- и E7-конструкций: E6 индуцировал преимущественно Th1-тип ответа, тогда как E7 не вызывал выраженного специфического ответа, но сопровождался продукцией ФНО-α и усилением воспалительной инфильтрации печени. В модели TC-1/luc2 выявлены ограниченная терапевтическая активность E6-конструкции и низкая активность E7-конструкции. Создана и охарактеризована новая метастатическая модель 4T1luc2, экспрессирующая E6 и E7 ВПЧ16. Показано, что E6-ДНК-вакцина, проявлявшая активность в модели TC-1/luc2, не ограничивала рост и метастатическое распространение опухолей 4T1luc2, что подчеркивает зависимость терапевтической эффективности от особенностей опухолевой модели.

Разработанные модели и вакцинные конструкции представляют перспективный инструмент для доклинического скрининга терапевтических препаратов и оптимизации схем вакцинации против ВПЧ-ассоциированных опухолей.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов

Результаты диссертационного исследования имеют существенное значение как для развития фундаментальных представлений о биологии ВПЧ и механизмах вирус-ассоциированного канцерогенеза, так и для разработки новых подходов к терапевтической вакцинации и иммунотерапии ВПЧ-ассоциированных опухолей.

В работе получены оригинальные данные о генетической вариабельности онкогенов E6 и E7 ВПЧ16, их филогенетическом распределении и возможном влиянии на структуру, иммуногенность и функциональную активность белков. Разработанные и охарактеризованные клеточные модели TC-1luc2 и 4T1luc2 расширяют экспериментальную базу для изучения ВПЧ-ассоциированного опухолевого роста и оценки противоопухолевой активности вакцинных конструкций в различных опухолевых контекстах.

Практическая значимость работы определяется возможностью использования разработанных моделей и вакцинных конструкций для доклинического скрининга терапевтических кандидатов, оценки иммуногенности, оптимизации схем вакцинации и изучения механизмов противоопухолевого иммунного ответа. Полученные данные о влиянии структурных вариантов онкогенов на иммуногенность создают основу для рационального дизайна терапевтических вакцин и в перспективе могут способствовать разработке персонализированных подходов к лечению ВПЧ-ассоциированных заболеваний.

Таким образом, результаты исследования вносят вклад в фундаментальную вирусологию, молекулярную онкологию и разработку новых средств иммунотерапии.

Соответствие диссертации паспорту специальности

Диссертационное исследование Авдошиной Д. В. полностью соответствует паспорту научной специальности 1.5.10. Вирусология.

Полнота освещения результатов диссертации в печати

Результаты диссертационного исследования полно и всесторонне представлены в научной печати. По материалам работы опубликованы статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в Web of Science, Scopus и РИНЦ, охватывающие ключевые направления исследования: генетическую вариабельность онкогенов E6 и E7 ВПЧ16, разработку и характеристику клеточных моделей TC-1luc2 и 4T1luc2, оценку иммуногенности и противоопухолевой активности вакцинных конструкций, а также методологические аспекты исследования.

Основные результаты также доложены на российских и международных научных форумах, включая конгрессы International Society for Vaccinology (ISV), Международный конгресс по вирусологии и ряд всероссийских конференций с международным участием. Публикации и доклады отражают все основные положения диссертации - от молекулярно-эпидемиологического анализа ВПЧ16 до разработки экспериментальных моделей и оценки терапевтических вакцинных кандидатов.

Таким образом, результаты диссертации достаточно полно апробированы в печати и представлены научному сообществу, что подтверждает их актуальность, научную значимость и признание в области вирусологии и онкологии.

Характеристика структуры и содержания диссертации

Диссертационная работа изложена на 192 страницах и включает все структурные элементы, предусмотренные требованиями к кандидатским диссертациям. Содержание работы представлено следующими разделами: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты исследования (8 глав), Обсуждение, Заключение (включая выводы и практические рекомендации), Перечень используемых сокращений и условных обозначений, а также Список литературы. Библиографический список включает 387 источников, значительная часть которых выполнена зарубежными авторами и опубликована в международных рецензируемых журналах. Иллюстративный материал представлен 37 рисунками и 14 таблицами.

Введение диссертационной работы содержит обоснование актуальности выбранной научной проблемы, в котором четко сформулированы цель и задачи исследования. В разделе последовательно изложены положения, отражающие научную новизну и практическую значимость выполненной работы. Автором представлены основные положения, выносимые на защиту, подтверждена достоверность и апробация полученных результатов. Также дана характеристика структуры и объема диссертации.

В главе «Обзор литературы» приводится представлен комплексный обзор современных данных о биологии вирусов папилломы человека, молекулярных механизмах вирус-ассоциированного канцерогенеза и актуальных стратегиях терапевтической вакцинации. Последовательно рассмотрены биология, классификация и жизненный цикл ВПЧ, структура его генома и механизмы персистенции инфекции. Подробно проанализированы онкогенные белки E6 и E7 ВПЧ16, их функциональные домены, взаимодействие с p53 и pRb, влияние на клеточный цикл, апоптоз, репарацию ДНК и иммунный ответ, а также основные сплайс-варианты этих онкогенов. Представлены современные данные о врожденном и адаптивном иммунитете при ВПЧ-инфекции и

механизмах иммунного уклонения вируса. Проведен критический обзор терапевтических вакцин против ВПЧ, включая пептидные и ДНК-вакцины, вирусные векторы, дендритноклеточные и комбинированные подходы, а также рассмотрены результаты их доклинических и клинических исследований. Отдельное внимание уделено клеточным и животным моделям ВПЧ-ассоциированных опухолей, применяемым для оценки канцерогенеза, иммуногенности и противоопухолевой эффективности вакцинных препаратов. Обзор литературы логично обосновывает актуальность и цели проведенного исследования.

Обзор литературы демонстрирует глубокое знание автором современного состояния проблемы, критический анализ существующих данных и четкое обоснование необходимости проведения собственных исследований.

Вторая глава «Материалы и методы» содержит детальное описание экспериментальных подходов, использованных в работе, что обеспечивает воспроизводимость результатов и соответствует современным стандартам научной отчетности. В разделе представлены полный перечень использованных реагентов, коммерческих наборов, клеточных линий, лабораторных животных и оборудования с указанием производителей и каталожных номеров. Описаны условия культивирования клеточных линий HeLa, HEK293T, 4T1luc2 и TC-1luc2, характеристики мышей линий BALB/c и C57BL/6, условия содержания животных и соблюдение этических требований.

Подробно изложены примененные молекулярно-генетические методы, включая выделение ДНК и РНК, ОТ-ПЦР, ПЦР в реальном времени, цифровую ПЦР, секвенирование, клонирование и конструирование плазмидных векторов. Описаны методы трансфекции и трансдукции клеток, получения стабильных клонов, криоконсервации, проточной цитометрии, внутриклеточного окрашивания цитокинов, иммунофенотипирования Т-лимфоцитов, создания опухолевых моделей, электропорации ДНК *in vivo*, биолюминесцентной визуализации и гистологического анализа. Также приведены использованные биоинформатические и статистические методы, включая филогенетический анализ, множественное выравнивание последовательностей, предсказание Т-клеточных эпитопов, оценку достоверности различий, расчет размера выборки и анализ выживаемости. Детализация протоколов, последовательностей праймеров и зондов, параметров реакций и условий экспериментов обеспечивает прозрачность и воспроизводимость исследования.

Результаты экспериментальных исследований представлены в главах 3.1–3.8. и представляют собой систематическое изложение полученных экспериментальных данных, структурированное по логическим блокам, соответствующим поставленным задачам.

В главе 3.1 обоснован выбор онкобелков E6 и E7 ВПЧ16 в качестве антигенов для терапевтической ДНК-вакцины. Показана высокая консервативность их аминокислотных последовательностей и отсутствие существенных различий между изолятами, циркулирующими в европейской части РФ и других регионах Европы, что позволяет использовать единый вакцинный кандидат. В конструкции применен принцип синтетического консенсуса; при проектировании E6 исключена замена L90V, ассоциированная с повышенной онкогенностью, а для снижения онкогенного потенциала E6 и E7 введены мутации, нарушающие взаимодействие с p53 и pRb. Созданы плазмиды pVaxE6 и pVaxE7, обеспечивающие экспрессию целевых антигенов, при этом выявлен существенно более высокий (примерно в 40 раз) уровень мРНК E6 по сравнению с E7, что необходимо учитывать при дальнейшей оптимизации состава и дозирования вакцины.

Глава 3.2. посвящена оптимизации способов внутрикожной доставки ДНК-иммуногенов *in vivo* для повышения их проникновения в клетки и, соответственно, уровня экспрессии антигена. Для сравнения были исследованы три подхода: внутрикожная инъекция плазмидной ДНК в буферных растворах на основе ФСБ, сонопорация и электропорация. В качестве модели использовали плазмиду pVaxLuc, кодирующую люциферазу светлячка; эффективность доставки оценивали по интенсивности биолюминесцентного сигнала *in vivo*. Наиболее эффективным способом внутрикожной

доставки ДНК-иммуногена оказалась электропорация по разработанному оптимальному протоколу. Второе место по эффективности заняла простая внутрикожная инъекция ДНК в ФСБ, тогда как сонопорация уступала этим подходам, а использование гипотонических буферных растворов не обеспечивало преимущества.

Глава 3.3. посвящена оценке того, как способ введения плазмидной ДНК влияет на выраженность гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей. В качестве модельного иммуногена использовали плазмиду pVaxRT_Ain, кодирующую обратную транскриптазу ВИЧ-1 клада А. Сравнивали введение ДНК в воде, фосфатном буфере с ионной силой 81 ммоль/л, ФСБ и ФСБ с последующей электропорацией. Наиболее сильный гуморальный ответ был получен при электропорации: титр антител к обратной транскриптазе достигал 1:200 000. Введение ДНК в ФСБ без электропорации обеспечивало титр 1:40 000, в фосфатном буфере - 1:20 000, тогда как введение ДНК в воде не вызывало иммунного ответа. Дополнительно на плазмиде, кодирующей теломеразную обратную транскриптазу крысы, подтверждено, что оптимизированный режим электропорации индуцирует также специфический Т-клеточный ответ. Таким образом, электропорация была признана наиболее эффективным способом доставки ДНК-иммуногенов и использована для последующих иммунизаций животных.

Глава 3.4. посвящена моделированию возможной интерференции между двумя ДНК-иммуногенами при их совместном введении и выбору схемы иммунизации, позволяющей избежать подавления иммунного ответа. Поскольку белки ВПЧ Е6 и особенно Е7 обладают иммуносупрессивными свойствами, предполагалось, что совместное введение кодирующих их плазмид в один участок может снижать иммуногенность. Для проверки этой гипотезы использовали модельную пару ДНК-иммуногенов: плазмиду pVaxTERT, кодирующую теломеразную обратную транскриптазу крысы и имитирующую сильный клеточный иммуноген, аналог Е6, а также pVaxCore152opt, кодирующую усеченный коровый белок вируса гепатита С - слабый, низкоэкспрессирующийся иммуноген с иммуносупрессивными свойствами, аналог Е7. При введении pVaxTERT отдельно у мышей формировался специфический Т-клеточный ответ. Однако совместная иммунизация эквимолярной смесью pVaxTERT и pVaxCore152opt в один анатомический участок приводила к утрате как CD4+, так и CD8+ Т-клеточного ответа против сильного иммуногена: уровень цитокин-продуцирующих Т-клеток не отличался от контрольных значений. На основании полученных результатов был сделан вывод, что совместное введение в один анатомический участок сильного ДНК-иммуногена и иммуногена с иммуносупрессивным потенциалом способно подавлять развитие специфического клеточного иммунного ответа. В связи с этим при дальнейшей иммунизации плазмидные конструкции pVaxE6 и pVaxE7 вводили раздельно, в пространственно изолированные анатомические участки.

В главе 3.5 оценивали иммуногенность ДНК-вакцинных конструкций pVaxE6 и pVaxE7, кодирующих онкобелки Е6 и Е7 ВПЧ16, после оптимизации способа доставки плазмидной ДНК. Мышей иммунизировали плазмидой pVaxE6, pVaxE7 либо их комбинацией, вводимой раздельно в пространственно удаленные анатомические участки.

Иммунизация pVaxE6 индуцировала специфический полифункциональный CD4+ Т-клеточный ответ Th1-типа против нескольких эпитопов белка Е6, сопровождавшийся одновременной продукцией ИФН-γ, ИЛ-2 и ФНО-α. При этом специфический CD8+ Т-клеточный ответ не выявлялся. Введение pVaxE7 не приводило к формированию детектируемого Е7-специфического Т-клеточного ответа, хотя сопровождалось повышенной продукцией ФНО-α нестимулированными CD4+ и CD8+ Т-клетками.

Совместная иммунизация Е6/Е7 не усиливала иммунный ответ: она вызывала CD4+ Т-клеточный ответ лишь к С-концевому участку Е6 и сопровождалась тенденцией к снижению суммарной частоты Е6-специфических CD4+ Т-клеток по сравнению с иммунизацией только pVaxE6. Это может указывать на системное иммуносупрессивное влияние Е7 и/или отражать снижение дозы pVaxE6 в комбинированной схеме.

В главе 3.6 исследовали терапевтический потенциал ДНК-иммуногенов pVaxE6 и pVaxE7 на модели ВПЧ16-ассоциированной опухоли ТС-1/luc2 у мышей. После подкожной имплантации опухолевых клеток животных дважды иммунизировали плазмидами, кодирующими Е6, Е7 либо оба антигена, а затем оценивали рост опухоли и наличие отдаленного распространения опухолевых клеток с помощью биолюминесцентной визуализации *ex vivo*. Иммунизация pVaxE6 достоверно ограничивала рост опухоли, тогда как pVaxE7 и комбинация pVaxE6/pVaxE7 не оказывали выраженного противоопухолевого эффекта. Метастатическое распространение клеток ТС-1/luc2 в исследованные органы не выявлялось ни в одной из групп. Дополнительный гистохимический анализ печени показал наличие иммунных инфильтратов у всех животных. Их общее количество было выше у мышей, получавших ДНК-конструкции Е6 или Е7, по сравнению с контрольными группами; наиболее выраженная тенденция к усилению воспалительной реакции отмечалась после иммунизации pVaxE7. Таким образом, pVaxE6 продемонстрировал противоопухолевую активность, тогда как pVaxE7 не обеспечивал терапевтического эффекта и мог быть связан с более выраженной воспалительной реакцией в печени.

В главе 3.7 описано создание новой мышиной опухолевой модели для оценки противоопухолевой и антиметастатической активности терапевтических вакцин, направленных против онкобелков Е6 и Е7 ВПЧ16. Необходимость разработки модели была обусловлена отсутствием метастазирования у клеток ТС-1/luc2, что ограничивало их применение для изучения влияния вакцин на диссеминацию опухолевых клеток. В качестве основы использовали высокотуморогенную и метастатически активную клеточную линию аденокарциномы молочной железы мыши 4T1luc2, несущую ген люциферазы luc2. Путем лентивирусной трансдукции были получены четыре субклона 4T1luc2 с интегрированными последовательностями Е6 и Е7 референсного варианта ВПЧ16. Субклоны различались по уровню экспрессии вирусных транскриптов, однако во всех случаях экспрессия Е6 и Е7 была существенно выше, чем в клетках ТС-1/luc2.

Важным свойством новой модели была экспрессия не только полноразмерного транскрипта Е6, но и биологически значимых изоформ Е6*I и Е6*II, характерных для естественной ВПЧ-инфекции. После имплантации животным все субклоны демонстрировали 100% приживаемость, формировали опухоли сопоставимого с исходной линией 4T1luc2 размера и метастазировали преимущественно в легкие. Метастазы подтверждали методами биолюминесцентной визуализации, Е6/Е7-специфической ПЦР и гистологического исследования. Таким образом, разработанные субклоны 4T1luc2-E6/E7 представляют собой более физиологичную, чем ТС-1/luc2, модель ВПЧ16-ассоциированной опухоли: они сочетают устойчивую экспрессию Е6/Е7, наличие релевантных изоформ Е6 и выраженный метастатический потенциал.

В главе 3.8 оценивали терапевтическую эффективность ДНК-иммунизации pVaxE6 на новой метастазирующей модели 4T1luc2-E6/E7. Для эксперимента выбрали два охарактеризованных субклона - B2 и H6, различающихся уровнем экспрессии Е6 и Е7, а также соотношением изоформ Е6. Вакцину pVaxE7 не исследовали вследствие отсутствия противоопухолевой эффективности и признаков нежелательной воспалительной реакции в предшествующих экспериментах. Иммунизация pVaxE6 оказывала лишь кратковременное тормозящее действие на рост опухолей, сформированных клетками B2: снижение биолюминесцентного сигнала наблюдалось на 8-е сутки после имплантации, но исчезало к 11-м суткам. Также отмечалась тенденция к уменьшению массы опухолей и суммарного биолюминесцентного сигнала от легких, печени и селезенки, однако подавления инфильтрации легких опухолевыми клетками не выявлено. Для субклона H6 pVaxE6 не влияла ни на рост первичной опухоли, ни на распространение клеток в органы. ПЦР-анализ ДНК Е6 в легких и селезенке подтвердил отсутствие убедимого антиметастатического эффекта. У мышей с опухолями B2 частота выявления опухолевой ДНК не отличалась от контроля; при опухолях H6 наблюдалась лишь статистически недостоверная тенденция к ее снижению.

Таким образом, несмотря на эффективность pVaxE6 на модели TC-1/luc2, на более агрессивной и метастазирующей модели 4T1luc2-E6/E7 вакцина продемонстрировала минимальную и транзиторную противоопухолевую активность без подтвержденного влияния на метастатический процесс.

В четвертой главе «Обсуждение» был проведен анализ полученных данных, их возможная интерпретация и сопоставление с современными литературными данными, свидетельствующее о глубоком понимании автором современного состояния проблемы исследования и прекрасном владении литературными источниками.

Раздел Заключение содержит обобщение ключевых результатов диссертационного исследования, подтверждающих достижение поставленной цели. На основании полученных данных сформулированы семь выводов, отражающих все основные результаты исследования и полностью соответствующие сформулированным задачам. Также сформулированы практические рекомендации (5 пунктов), имеющие важное значение для разработки, доклинической оценки и оптимизации терапевтических ДНК-вакцин, в том числе вакцинных конструкций на основе антигенов E6 и E7 ВПЧ.

Соответствие содержания автореферата основным положениям и выводам диссертации

Автореферат оформлен в соответствии с требованиями, отражает логику и последовательность решения задач исследования, раскрывает основные положения, выносимые на защиту.

Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации

Диссертационная работа Авдошиной Дарьи Валерьевны посвящена актуальной проблеме разработки терапевтических ДНК-вакцин против ВПЧ-ассоциированных опухолей. Исследование отличается **многоплановостью и широтой**: охватывает молекулярно-генетический анализ вариабельности онкогенов E6 и E7 ВПЧ16, конструирование ДНК-иммуногенов, оптимизацию способов их доставки, изучение индуцируемого клеточного иммунного ответа, оценку противоопухолевой и антиметастатической активности, а также создание и валидацию новых экспериментальных опухолевых моделей.

При этом работа не ограничивается широким кругом рассматриваемых вопросов, а характеризуется высокой степенью детализации каждого экспериментального этапа. Автором исследованы параметры доставки плазмидной ДНК, включая условия электропорации и схемы введения иммуногенов; проанализированы генетические варианты E6 и E7, их филогенетическое распределение и предполагаемое функциональное значение; подробно охарактеризованы созданные субклоны 4T1luc2-E6/E7 по уровням экспрессии вирусных генов, спектру изоформ E6, туморогенности и метастатическому потенциалу. Иммуногенность вакцинных конструкций оценивали с анализом продукции цитокинов, полифункциональности CD4+ и CD8+ Т-клеток, а также специфичности ответа к различным эпитопам белков E6 и E7.

Сопоставление результатов на моделях TC-1/luc2 и 4T1luc2-E6/E7, различающихся биологическими свойствами и метастатическим потенциалом, позволило комплексно оценить терапевтический потенциал pVaxE6. Наряду с демонстрацией противоопухолевой активности на модели TC-1/luc2, в работе объективно выявлены ограничения эффективности ДНК-иммунизации на более агрессивной метастазирующей модели. Такой дизайн исследования свидетельствует о тщательной проработке экспериментальных подходов, критической интерпретации результатов и обоснованности сделанных выводов.

К замечаниям по диссертационной работе можно отнести отсутствие достаточного обоснования выбора отдельных методических подходов, а также ряд формулировок,

требующих уточнения или более осторожной интерпретации. Эти замечания не снижают общей научной значимости выполненного исследования, однако их учет способствовал бы повышению обоснованности выводов и практической ценности работы.

1. **Выбор внутрикожного пути введения ДНК-вакцинной конструкции требует дополнительного обоснования**. Следовало бы обсудить преимущества данного подхода, связанные с высокой плотностью антигенпрезентирующих клеток в коже и потенциальной возможностью индукции выраженного Т-клеточного ответа при сниженной дозе ДНК, а также сопоставить его с внутримышечным введением, в том числе в сочетании с электропорацией. Такое сравнение должно учитывать эффективность трансфекции и экспрессии антигена, интенсивность и продолжительность CD4+ и CD8+ Т-клеточного ответа, противоопухолевую активность, воспроизводимость, переносимость процедуры и перспективы клинического применения.

2. **Заключение о недостаточной эффективности E6-иммуногена представляется чрезмерно категоричным**. Отрицательный результат ДНК-иммунизации E6, полученный на одной агрессивной опухолевой модели 4T1 и при конкретной схеме введения, не позволяет сделать вывод о принципиальной неэффективности E6 как антигена. Ограниченный терапевтический эффект мог быть обусловлен особенностями модели, включая ее высокую агрессивность и иммуносупрессивное микроокружение, недостаточной презентацией E6-эпитопов, однократной иммунизацией, выбранным способом доставки или недостаточной индукцией функционально активных E6-специфических Т-клеток. Поэтому результаты следует интерпретировать как свидетельство недостаточной эффективности исследуемой E6-содержащей ДНК-конструкции в данных экспериментальных условиях.

Экстраполяция этих данных на клинические перспективы E6/E7-вакцин также требует осторожности. Полученные результаты указывают прежде всего на необходимость дальнейшей оптимизации ДНК-конструкции и схемы иммунизации, а не на неэффективность E6-иммуногенов в целом.

3. **Сопоставление результатов** оценки терапевтической активности разработанных конструкций **с данными литературы представлено недостаточно полно**. В частности, низкая терапевтическая активность конструкции, кодирующей E7 ВПЧ16, требует более детального обсуждения в контексте исследований E7- и E6/E7-содержащих ДНК-вакцин, поскольку E7 нередко рассматривается как один из ключевых иммуногенных антигенов.

4. **Вывод о возможном подавлении E6-специфического иммунного ответа при совместном введении плазмид E6 и E7 нуждается в более развернутом обсуждении**. Эта гипотеза не подкреплена развернутым сопоставлением с литературными данными и примерами комбинированных ДНК-вакцинных платформ. В частности, целесообразно обсудить результаты исследований VGX-3100 и MEDI0457, чтобы разграничить возможный ингибирующий эффект конкретной конструкции E7 и потенциальное влияние совместного применения антигенных либо иммуномодулирующих компонентов в целом.

5. К недостаткам можно отнести **отсутствие отдельного обсуждения ограничений исследования**, связанных с однократной схемой иммунизации и отсутствием бустерных введений. Такой дизайн не позволяет полноценно оценить терапевтическую эффективность разработанных ДНК-конструкций и корректно сопоставить полученные результаты с данными опубликованных исследований, в большинстве которых применялись повторные схемы иммунизации.

В качестве дискуссионного вопроса можно указать следующий моменты:

1. При разработке вакцин против ВПЧ16 снижение онкогенного потенциала антигенов E6 и E7 путем внесения точечных замен E6 C70G/I135T и E7 C24G/E26G является обоснованным и широко применяемым подходом, направленным на повышение безопасности при сохранении иммуногенности. Вместе с тем такие модификации **не обеспечивают полной функциональной инактивации онкобелков**. В частности, мутации E7 C24G/E26G нарушают связывание с pRb, но могут не устранять другие функции E7,

включая взаимодействия с p107/p130 и CBP/p300, а также возможное влияние на регуляцию центросомного цикла. Следовательно, мутантный E7 не следует рассматривать как полностью биологически инертный белок.

В этой связи возникает вопрос: возможно ли дополнительно снизить онкогенный потенциал используемых трансгенов, например, путем внесения дополнительных функционально значимых замен, делеции отдельных доменов E6/E7 или модификации дизайна экспрессируемого антигена при сохранении иммунодоминантных Т-клеточных эпитопов — и тем самым повысить долгосрочную безопасность вакцинной конструкции?

2. Отсутствие бустерной иммунизации существенно ограничивает возможность корректного сравнения полученных результатов с данными других исследований. В большинстве опубликованных работ эффективность ДНК-вакцин против ВПЧ16 оценивали после двух- или трехкратного введения, тогда как в настоящей работе использована однократная иммунизация. Вследствие этого нельзя однозначно установить, обусловлено ли отсутствие или недостаточная выраженность терапевтического эффекта свойствами самой конструкции, выбранным способом введения либо недостаточной кратностью иммунизации. Для объективной оценки терапевтического потенциала разработанных конструкций целесообразно провести сравнительный анализ схем с бустерными введениями.

3. Может ли последующая **кодонная оптимизация последовательностей E6/E7** повысить уровень и длительность экспрессии антигенов, усилить антиген-специфический Т-клеточный ответ и улучшить терапевтическую активность ДНК-вакцины? В этой связи отрицательный терапевтический результат, полученный для E6-содержащей конструкции, не следует однозначно интерпретировать как свидетельство низкой иммуногенности самого антигена, поскольку он может быть обусловлен недостаточным уровнем его экспрессии.

Высказанные замечания и дискуссионные вопросы касаются главным образом дополнительного обоснования выбора способа доставки ДНК-вакцин, кратности иммунизации, интерпретации результатов на агрессивной модели 4T1luc2-E6/E7, перспектив кодонной оптимизации антигенных последовательностей, а также сопоставления полученных данных с результатами исследований других ДНК-вакцинных платформ. Они не носят принципиального характера, не снижают научной ценности, достоверности основных результатов и практической значимости выполненной работы.

Заключение

Диссертационная работа Авдошиной Дарьи Валерьевны представляет собой самостоятельное, завершенное и комплексное научно-квалификационное исследование, посвященное актуальной задачи разработки терапевтических ДНК-вакцин против ВПЧ16-ассоциированных опухолей.

Работа отличается научной новизной, широтой и логической завершенностью экспериментального подхода. В ней проведен анализ вариабельности онкогенов E6 и E7 ВПЧ16, разработаны и исследованы ДНК-вакцинные конструкции, изучены особенности индуцируемого ими клеточного иммунного ответа и терапевтической активности. Существенным результатом является создание и подробная характеристика клеточных субклонов 4T1luc2, экспрессирующих E6 и E7 ВПЧ16, обладающих высоким туморогенным и метастатическим потенциалом и пригодных для оценки противоопухолевых и антиметастатических подходов в более физиологически релевантной экспериментальной системе.

Таким образом, диссертационная работа Авдошиной Дарьи Валерьевны «Экспериментальные подходы к созданию и оценке эффективности терапевтических ДНК-вакцин против ВПЧ-ассоциированного рака» отвечает требованиям пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденным 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 N426, 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 N 1382, от 18.07.2026 N 905), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук., а ее автор заслуживает присуждения искомой 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 молекулярной биологии вирусов
научно-исследовательского института Экспериментальной онкологии
и канцерогенеза Федерального государственного бюджетного
учреждения «Национальный медицинский
исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России,
кандидат биологических наук,
e-mail: s.vinokurova@ronc.ru
тел: +7 (499) 324-57-33

Винокурова Светлана Владимировна

Подпись Винокуровой Светланы Владимировны заверяю.
Ученый секретарь
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
кандидат медицинских наук

Кубасова Ирина Юрьевна

«06» октября 2026г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России
Адрес: 115522, г. Москва, Каширское шоссе 24
Телефон: +7 (499) 612-89-19
e-mail: info@ronc.ru, сайт: https://www.ronc.ru/