УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора,
доктор биологических наук

_____А.П. Агафонов
«06» октября 2026 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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 исследования

Актуальность темы диссертации обусловлена сочетанием высокой распространённости ВПЧ-инфекции, её онкогенного потенциала и высокой потребности в эффективных средствах терапии. С точки зрения вирусологии особый интерес представляет роль вируса папилломы человека в индукции злокачественных новообразований. Экспрессия вирусных белков E6 и E7 приводит к нарушению клеточного цикла, подавлению апоптоза и трансформации клеток, что лежит в основе ВПЧ-ассоциированного онкогенеза. Поэтому именно белки E6 и E7 вируса папилломы человека 16-го типа (HPV16) рассматриваются в качестве главных мишеней для разработки вакцин, направленных на лечение ВПЧ-ассоциированного рака.

ДНК-вакцины являются перспективным направлением в разработке терапевтических вакцин для индукции клеточного иммунного ответа против опухолевых клеток. Вместе с тем на текущем этапе большинство ДНК-вакцинных кандидатов против ВПЧ не продемонстрировали достаточной эффективности в ходе клинических испытаний. Это может быть связано с рядом причин, в том числе: недостаточным учётом генетического разнообразия вируса (в частности, вариабельности иммуногенных свойств антигенных вариантов белков E6 и E7), низкой иммуногенностью ДНК-вакцин при стандартном внутримышечном введении, а также ограниченностью существующих доклинических моделей для скрининга и оценки эффективности кандидатных вакцин.

В связи с этим разработка новых стратегий создания терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированного рака, а также разработка адекватных

доклинических моделей для тестирования онковакцин приобретают особую научную и практическую значимость.

Научная новизна, обоснованность и достоверность полученных результатов

Научная новизна диссертационного исследования определяется получением ряда принципиально новых данных.

Впервые на достаточно большой выборке изолятов ВПЧ16, циркулирующих в Европе и европейской части РФ, проведён комплексный анализ изменчивости онкобелков Е6 и Е7 с детализацией региональных особенностей, что создаёт основу для рационального конструирования универсальных иммуногенов.

Подобраны условия электропорации и установлено порогового значения ионной силы буфера для эффективной доставки ДНК *in vivo*, которое является важным параметром для воспроизводимости результатов.

Получены данные о влиянии введения ДНК Е7 ВПЧ16 на продукцию ФНО-α и формирование воспалительных инфильтратов в печени, а также продемонстрирован негативный эффект совместного введения ДНК Е6 и Е7, выражающийся в подавлении иммунного ответа на антиген Е6. Впервые проведена характеристика *in vitro* модели ТС-1/luc2, широко используемой в доклинических испытаниях терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированных новообразований, и выявлены возможные механизмы, ограничивающие её способность полноценно оценивать терапевтический потенциал вакцинных кандидатов;.

Созданы и охарактеризованы производные клеточной линии 4T1luc2, стабильно экспрессирующие белки Е6 и Е7 ВПЧ16. Учитывая высокую туморогенность и способность к спонтанному метастазированию этой линии, полученные модели открывают новые возможности для адекватной оценки эффективности терапевтических вакцин.

Достоверность и обоснованность результатов диссертационного исследования обеспечиваются использованием современных методов, грамотной организацией эксперимента и достаточным объемом исследованного материала. Подтверждением надёжности выводов служат 5 публикаций автора в журналах, индексируемых в Web of Science, Scopus и RSCI, соответствующих установленным требованиям к категорированию изданий. Основные результаты также прошли апробацию на многочисленных российских и международных конференциях.

Практическая значимость заключается в следующем:

В работе получен ряд новых данных, имеющих существенное прикладное значение для разработки терапевтических вакцин против ВПЧ-ассоциированного рака.

Данные по вариабельности E6 и E7 позволяют актуализировать дизайн иммуногенов с учётом региональной циркуляции изолятов ВПЧ16. Выявленные замены в доменах связывания E6/p53 дают возможность конструировать антигены, сохраняющие функциональную целостность, но учитывающие антигенную вариабельность, характерную для европейской популяции.

Методологическая ценность работы состоит в оптимизации параметров электропорации и сонопорации для доставки ДНК *in vivo*.

Доказанная нецелесообразность применения иммуногена E7 в составе ДНК-вакцинных конструкций (в том числе в комбинации с E6) позволяет оптимизировать состав вакцинных композиций и избежать включения компонентов, способных снижать эффективность иммунизации или вызывать нежелательные эффекты. Эти результаты имеют прямое практическое значение для выбора стратегии иммунизации и обосновывают необходимость раздельного применения антигенов.

Важным методическим достижением является создание производных линии 4T1luc2, экспрессирующих E6 и E7 ВПЧ16. Такая модель может быть рекомендована для отбора наиболее перспективных кандидатных вакцин, поскольку она более точно отражает агрессивное поведение ВПЧ-ассоциированных опухолей (рост, метастазирование) по сравнению с моделью TC-1/luc2.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа построена традиционно, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений и списка цитируемой литературы. Работа содержит раздел практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений и список литературы, содержащий 387 источников. Диссертация изложена на 192 страницах, включает 37 рисунков и 14 таблиц.

Во введении обосновывается актуальность темы диссертации, которая связана с высокой распространённостью ВПЧ-инфекции, её онкогенным потенциалом и отсутствием эффективных терапевтических вакцин. В нём сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту.

В первой главе (Обзор литературы) представлена информация о современных представлениях о вирусе папилломы человека 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 E6 и E7 HPV16, 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 (электропорация, сонопорация и др.). Описываются существующие доклинические модели для тестирования противоопухолевых вакцин.

Вторая глава (Материалы и методы) содержит подробное описание экспериментальной части: использованных реагентов, клеточных линий, лабораторных животных, плазмидных и лентивирусных векторов. Представлены методики конструирования ДНК-иммуногенов, получения лентивирусного вектора pLJM1_pGK_E6E7, работы с прокариотическими и эукариотическими системами. Особое внимание уделено протоколам оптимизации доставки ДНК (в том числе подбору ионной силы буфера, параметров сонопорации и электропорации), а также комплексам иммунологических и молекулярно-биологических методов (ПЦР, ИФА, проточная цитометрия, биолюминесцентный мониторинг, гистология) и статистической обработке данных. Раздел демонстрирует воспроизводимость и методическую строгость исследования.

Третья глава (Результаты) посвящена изложению полученных результатов. Описывается разработка ДНК-вакцин, сконструированных на основе актуализированных последовательностей E6/E7 HPV16, и оценка их способности обеспечивать синтез целевых мРНК в трансфицированных клетках. Приведены данные по оптимизации и сравнению методов доставки ДНК-конструктов (буферные условия, сонопорация, электропорация). Приведены результаты оценки гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей, иммунизированных полученными ДНК-вакцинными конструкциями. Описывается создание и характеристика новой мышиной модели опухолевых клеток 4T1luc2, стабильно экспрессирующих E6 и E7 HPV16 (в том числе анализ экспрессии мРНК, сплайсинговых изоформ, туморогенности и миграции клеток). Приведены данные по проверке терапевтического потенциала ДНК-вакцин на модели TC-1/luc2 и в новой модели на основе 4T1luc2.

Четвертая глава (Обсуждение) посвящена интерпретации полученных данные в контексте современных научных представлений, объясняются возможные причины наблюдаемых эффектов и ограничений.

Несмотря на то, что полученные конструкции не обеспечили ожидаемого терапевтического эффекта, работа имеет высокую научную и методическую ценность.

Заключение, выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы резюмируют результаты, формулируют основные научные выводы, указывают возможные направления использования результатов в практике и обозначают перспективные направления дальнейших исследований.

Научная специальность, которой соответствует диссертация

По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.10. Вирусология (биологические науки) и направлениям исследования: пункту 4 - Молекулярная биология вирусов, структурно-функциональная биология вирусных белков. Структура и экспрессия вирусных геномов. Эволюция вирусов и их разнообразие. Генетика и геномика вирусов. Популяционная генетика; пункту 7 - изучение противовирусного иммунитета, иммунохимические исследования вирусных антигенов, изучение гуморального, клеточного иммунитета и иммунопатологических реакций; пункту 10 – разработка мер предупреждения, диагностики и лечения вирусных заболеваний, совершенствование лабораторной диагностики, терапии, и иммунопрофилактики вирусных инфекций, проблемы санитарной вирусологии; пункту 11 - противовирусные препараты. Интерфероны и индукторы интерферона: изучение механизма действия, получение и применение. Вирусные вакцины, в том числе живые (аттенуированные), инактивированные, субъединичные, рекомбинантные (реплицирующиеся и нереплицирующиеся), векторные и вакцины на основе вирусоподобных частиц.

Несмотря на высокий в целом научный и методический уровень работы хотелось бы отметить ряд положений, нуждающихся в уточнении:

1) Поскольку в белки Е6 и Е7 были введены аминокислотные замены, важно оценить, могли ли эти изменения повлиять на конформацию, стабильность и особенности фолдинга белков, а также на их внутриклеточный процессинг. Проводился ли такой анализ?

2) В разделе, посвященном описанию условий оптимизации электропорации не приведены данные гистологического анализа тканей в месте введения вакцинных конструкций. Проводился ли такой анализ с целью оценки локальной воспалительной реакции, степени повреждения тканей или других эффектов, которые могли бы потенциально повлиять на доставку и эффективность ДНК-вакцин.

3) В описании протокола внутриклеточного окрашивания (ICS) не указаны два критических параметра: использование ингибитора секреции брефельдина А (поскольку его отсутствие может привести к недооценке продукции цитокинов); и не указано время инкубации с пептидными стимуляторами (этот параметр напрямую влияет на чувствительность детекции антиген специфичных Т клеток). Нужно уточнить эти условия.

4) Оценка Т клеточного ответа ограничена тремя цитокинами ИФН-γ/ ИЛ-2/ ФНО-α. Учитывая, что основной механизм действия терапевтической вакцины — это цитотоксическая активность CD8+ Т лимфоцитов, целесообразно ли было включить в анализ маркеры цитотоксичности (перфорин, гранзимы)? Следует прокомментировать выбор панели маркеров.

5) Вопрос о влиянии криоконсервации на функциональность спленоцитов. В работе иммунный ответ оценивали на клетках, которые были предварительно заморожены. Проводились ли контрольные эксперименты на свежих спленоцитах для исключения артефактов, связанных с процедурой заморозки оттаивания (например, потери субпопуляций или изменения функциональной активности клеток)?

6) В тексте диссертации выявлены отдельные опечатки и стилистически не вполне удачные формулировки.

Указанные замечания носят преимущественно редакционно-методический характер и не затрагивают существа выполненного исследования, его научной новизны и практической значимости.

Заключение

Диссертационная работа Авдошиной Дарьи Валерьевны на тему: «Экспериментальные подходы к созданию и оценке эффективности терапевтических ДНК-вакцин против ВПЧ-ассоциированного рака», является завершенным научно-квалификационным исследованием, полученные диссертантом результаты имеют значение для дальнейшего развития представлений о взаимодействии вирусных антигенов с иммунной системой и о факторах, определяющих эффективность терапевтических вакцин. Практическая значимость диссертационной работы определяется тем, что сформулированные в ней подходы могут быть использованы при разработке новых вакцинных и иммунотерапевтических препаратов для профилактики и лечения ВПЧ-ассоциированных новообразований. Материалы исследования могут быть применены в дальнейшем при выполнении доклинических исследований, а также в образовательном процессе при подготовке специалистов в области вирусологии, иммунологии и молекулярной биологии.

Автореферат и опубликованные по теме диссертации работы отражают основное содержание исследования. Материалы диссертации в достаточной степени апробированы в научной печати.

Таким образом, диссертация Авдошиной Дарьи Валерьевны на тему: «Экспериментальные подходы к созданию и оценке эффективности терапевтических ДНК-вакцин против ВПЧ-ассоциированного рака», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология является квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований осуществлено решение важной научной проблемы, имеющей народнохозяйственное значение, диссертация отвечает требованиям установленным в 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 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 кандидата наук, а ее автор, Авдошина Дарья Валерьевна, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Отзыв на диссертационную работу Авдошиной Д.В. был заслушан и обсужден в отделе биоинженерии, одобрен на расширенном заседании Ученого совета Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. (Протокол № 18 от 6 октября 2026 г.).

Отзыв составил:

Ведущий научный сотрудник отдела биоинженерии
Федерального бюджетного учреждения науки
«Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека»
доктор биологически наук, доцент
e-mail: karpenko@vector.nsc.ru
тел. +7(383)363-47-00

Карпенко Лариса Ивановна

Подпись д.б.н. Карпенко Л.И. заверяю.
Врио ученого секретаря
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
кандидат биологических наук

«06» октября 2026 г. Прыткова Ольга Владимировна

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, +7(383)363-47-00, vector@vector.nsc.ru