

## ОТЗЫВ

доктора медицинских наук, доцента, МАЛЫШЕВА Владимира Васильевича на автореферат диссертационной работы Меженской Дарьи Андреевны на тему: «Создание прототипа универсальной живой гриппозной вакцины на основе внеклеточного домена М2 белка вируса гриппа А», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология

### **Актуальность исследования**

Вакцинация является наиболее эффективной мерой по борьбе с распространением гриппа и снижению числа госпитализаций. Одной из актуальнейших задач в области профилактики гриппа и предотвращения пандемий этой инфекции является создание вакцин, индуцирующих иммунный ответ против всех вирусов гриппа А, представляющих угрозу для человека. Несколько препаратов находятся в стадии клинических исследований. Однако, вакцинация сезонными гриппозными вакцинами приводит к формированию преимущественно штамм-специфического гуморального иммунного ответа и является неэффективной против дрейфовых вариантов вирусов гриппа. Кроме того, периодически в человеческую популяцию заносятся совершенно новые, ранее не циркулировавшие антигенные варианты вируса гриппа, и, поскольку население к ним не имеет иммунитета, вирусы имеют тенденцию к глобальному, пандемическому распространению. В последнее десятилетие отмечается активная циркуляция высокопатогенных вирусов гриппа среди животных и птиц, с потенциальной угрозой распространения в популяции населения. Указанные особенности гриппозной инфекции заставляют мировое научное сообщество, медицинские службы стран и ВОЗ серьезно отнестись к проблеме разработки универсальных гриппозных вакцин, направленных на индукцию перекрестно-реагирующих факторов иммунного ответа к наиболее консервативным участкам вирусных белков. В настоящее время некоторые разработки находятся на различных этапах клинических испытаний. Так, вакцина АСАМ-FLU-А, основанная на первоначальной идее Neirynck (Neirynck

et al., 1999), уже прошла I фазу клинических испытаний (NCT00819013, Sanofi). Внутримышечное введение АСАМ-FLU-А способствовало формированию анти-M2e антител в сыворотках крови у 90% испытуемых и не вызывала побочных действий. Однако уровень таких антител быстро снижался со временем, в результате чего дальнейшие клинические испытания АСАМ-FLU-А были приостановлены. Аналогичная идея использования вакцины на основе НВсAg (Tsybalova et al., 2015) была изучена при проведении клинических испытаний вакцины «Унифлю» (NCT03789539, VA Pharma LLC). Другая гриппозная вакцина, основанная на идее использования флагеллина для увеличения иммуногенности M2e (Huleatt et al., 2008), в I фазе клинических испытаний продемонстрировала высокую иммуногенность (NCT00921206, VaxInnate) (Turley et al., 2011). Несмотря на активную работу научных школ разных стран, вакцины на основе M2e пока не были зарегистрированы для профилактики гриппозной инфекции.

**Цель исследования** состояла в разработке универсальной живой гриппозной вакцины на основе внеклеточного домена M2 белка вируса гриппа А. Для реализации поставленной цели необходимо было решить несколько задач: - проанализировать эволюционную изменчивость эктодомена M2 белка вирусов гриппа А с целью отбора консенсусных последовательностей M2e для дальнейшего конструирования универсальной гриппозной вакцины; - сконструировать вакцинные штаммы живой гриппозной вакцины, несущие в своем составе увеличенное число эктодоменов M2 белка вируса гриппа А; - оценить иммуногенность и кросс-протективность сконструированных вакцинных прототипов на модели мышей; - определить факторы иммунного ответа, коррелирующие с усиленной кросс-протективностью рекомбинантных вакцинных штаммов; - оценить безвредность, иммуногенность и кросс-протективную активность перспективных кандидатов в универсальную живую гриппозную вакцину в доклинических исследованиях на хорьках.

**Научная новизна** диссертационной работы не вызывает сомнений. Представленное исследование Дарьи Андреевны Меженской является первой

попыткой создания универсальной живой гриппозной вакцины, индуцирующей усиленный гуморальный иммунный ответ к консервативному участку белка М2 вируса гриппа А. Впервые удалось сконструировать рекомбинантные штаммы живой гриппозной вакцины подтипов Н1N1, Н3N2 и Н7N9 на основе отечественного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57, кодирующие в составе молекулы гемагглютинина 4 копии М2е белка. Встроенные фрагменты 4М2е представляют собой консенсусные последовательности М2е всех генетических линий вирусов гриппа А, циркулирующих среди людей, свиней и птиц. Впервые был сконструирован рекомбинантный штамм живой гриппозной вакцины, экспрессирующий фрагмент 4М2е в рамке считывания NS1 белка донора аттенуации А/Ленинград/17/57, укороченного до 126 а.к. Было показано, что интраназальная иммунизация животных рекомбинантными штаммами ЖГВ+4М2е приводила к выработке статистически достоверно более высоких уровней анти-М2е антител по сравнению с классическими штаммами ЖГВ. При этом встраивание М2е эпитопов в молекулу гемагглютинина приводило к выработке статистически достоверно более высоких уровней М2е-специфических антител, по сравнению с внесением 4М2е кассеты в рамку считывания NS1 белка.

Впервые проведено детальное изучение различных звеньев вирусспецифического иммунитета при иммунизации новыми вакцинными прототипами, которое показало, что наиболее вероятным механизмом, обеспечивающим перекрестную защиту иммунизированных животных от заражения гетерологичным вирусом гриппа, является секреция М2е-специфических антител В-клетками, расположенными в медиастинальных лимфатических узлах животных. Кроме того, эксперименты по пассивной иммунизации мышей сыворотками иммунизированных животных показали наиболее широкий спектр защиты у образцов из групп ЖГВ+4М2е, что также указывает на вклад М2е-специфических антител в усиление защиты от заражения гетерологичными вирусами гриппа.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Диссертационная работа Меженской Д.А. имеет существенную теоретическую и практическую значимость. Структура автореферата полностью соответствует ГОСТу. Диссертантом были смоделированы последовательности вставок из целевых М2е-эпитопов для конструирования живой гриппозной вакцины с максимально широким покрытием вирусов гриппа А, циркулирующих как среди людей, так и среди свиней и птиц. Данные последовательности также могут быть использованы для дизайна универсальной гриппозной вакцины на основе других платформ, включая векторные вакцины, рекомбинантные белковые технологии, а также вакцины на основе нуклеиновых кислот. Была сконструирована панель рекомбинантных штаммов – кандидатов в универсальную ЖГВ, в экспериментах на животных продемонстрирована их способность обеспечивать защиту против широкого круга антигенно-удаленных вирусов гриппа, а наиболее перспективные варианты были изучены в доклинических испытаниях на модели хорьков. В результате был отобран кандидат ЖГВ-НА+4М2е для проведения первой фазы клинических испытаний на добровольцах.

## **Методология и методы исследования**

Диссертант использовала в работе вирусологические, серологические, иммунологические, биоинформатические и статистические методы.

## **Заключение**

Диссертационное исследование «Создание прототипа универсальной живой гриппозной вакцины на основе внеклеточного домена М2 белка вируса гриппа А», представленное к защите Меженской Дарьей Андреевной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, результаты которой имеют теоретическое и практическое значение. В диссертации решена важная народно-хозяйственная задача – сохранение здоровья населения Российской Федерации и его защита от любого вновь возникающего вируса гриппа, в том числе пандемического

варианта, что приведет к снижению уровня заболеваемости и смертности от гриппа и его осложнений. По своей актуальности, научной и практической значимости результатов, объему проведенных исследований диссертационная работа Меженской Дарьи Андреевны отвечает требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г. (в редакции Постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., №650 от 29.05.2017 г., №1024 от 28.08.2017 г., №1168 от 01.10.2018 г., №426 от 20.03.2021, с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ №751 от 26.05.2020 г.), предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Меженская Дарья Андреевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология

Заслуженный работник высшей школы

Российской Федерации

профессор кафедры микробиологии,

доктор медицинских наук

(3.2.2.- эпидемиология), доцент



Малышев

Владимир Васильевич

ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия  
имени С.М.Кирова

Министерства обороны Российской Федерации

Почтовый адрес: 194044, г. Санкт-Петербург,

ул. Академика Лебедева, 6; тел.+7(812) 291-56-47;

e-mail: [vmeda-nio@mil.ru](mailto:vmeda-nio@mil.ru))

«23» сентября 2022 г.

Подпись профессора кафедры микробиологии

Военно-медицинской академии имени С.М.Кирова

доктора медицинских наук, доцента

Малышева Владимира Васильевича

«Заверяю»

«28» сентября 2022 г.

