



Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт вакцин и
сывороток им. И. И. Мечникова»

(ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова)

Российская Федерация

Телефон/факс: (495) 917-49-00

105064, г. Москва

Телефон/факс: (495) 917-49-00

М. Казенный пер., 5а

E-mail: instmech@iitp.ru

03.10.2022 № 308/01

на № _____ от _____

Отзыв официального оппонента
доктора биологических наук Ленёвой Ирины Анатольевны
на диссертацию Меженской Дарьи Андреевны на тему «Создание прототипа
универсальной живой гриппозной вакцины на основе внеклеточного домена М2 белка
вируса гриппа А», представленную на соискание учёной степени кандидата
биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология

Актуальность темы. Грипп представляет собой широко распространённую во всем мире респираторную инфекцию. Он вызывает эпидемии, быстро распространяющиеся из страны в страну, вовлекая в тяжёлых случаях (пандемии) значительную часть человеческой популяции земного шара. Несмотря на то, что пандемия COVID-19 привела к снижению уровня циркуляции вирусов гриппа среди людей, заболеваемость гриппом остается на высоком уровне, нанося существенный социально-экономический ущерб.

Вакцинация является наиболее эффективной мерой по борьбе с распространением гриппа и снижению числа госпитализаций, однако сезонные гриппозные вакцины зачастую демонстрируют сниженную эффективность из-за несовпадения вакцинного и циркулирующего штаммов. Одним из возможных путей решения этой проблемы является создание универсальных гриппозных вакцин, которые были бы способны защищать привитых людей от различных антигенных вариантов вируса гриппа А.

Существуют различные стратегии по созданию универсальных гриппозных вакцин, направленные как на индукцию кросс-реактивных антител или на формирование Т-клеток памяти к консервативным участкам вирусов гриппа. Однако, до сих пор не представлено

коммерческого прототипа, который бы удовлетворял всем требованиям безопасности, эффективности и коммерческой целесообразности масштабного производства. В этой связи разработка новых подходов к созданию прототипов универсальной гриппозной вакцины является актуальной задачей.

В своей диссертационной работе Д.А. Меженская демонстрирует создание прототипа универсальной гриппозной вакцины на основе штамма живой гриппозной вакцины (ЖГВ), которая применяется в практике здравоохранения по всему миру. Соответственно, данное исследование является своевременным и актуальным.

Содержание диссертации. Диссертация написана по традиционной структуре и включает: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, собственные результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Диссертационное исследование изложено на 143 страницах машинописного текста, включает 5 таблиц и 45 рисунков, в списке литературы процитировано 254 источников, из них 4 отечественных и 250 иностранных авторов.

Обзор литературы. Глава 1 диссертационной работы Меженской Д.А. посвящена литературному обзору по разрабатываемой тематике. В начале главы описываются накопленные данные по молекулярной биологии вирусов гриппа, а также основные средства борьбы с распространением вирусов гриппа. В третьей части литературного обзора рассматривается возможность создания универсальных гриппозных вакцин с использованием различных технологий; также описываются достоинства и недостатки каждого из подходов. Четвёртая часть обзора литературы целиком посвящена возможности использования эктодомена белка М2 в качестве основного антигена при создании универсальных гриппозных вакцин.

Можно констатировать, что обзор полон и отвечает поставленным целям и задачам диссертационной работы. Обзор литературы завершается кратким заключением, в котором представлен анализ литературных данных с точки зрения основной тематики выполняемого исследования.

Раздел **Материалы и методы** содержит полный перечень применяемых автором методик и материалов, в том числе приведён полный список штаммов вирусов гриппа, которые были использованы как для иммунизации животных, так и для проведения экспериментального заражения.

Центральной частью работы являются полученные диссертантом **Собственные результаты исследования.** В первой части данного раздела проводится отбор наиболее консервативных фрагментов внеклеточного эпитопа белка М2 (М2е), и с использованием полученных результатов проводится конструирование вакцинных штаммов живой

гриппозной вакцины, содержащих дополнительные эпитопы М2е. Встраивание производилось с использованием двух стратегий - либо в N-конец субъединицы 1 молекулы гемагглютинаина (НА), либо в рамку считывания неструктурного белка NS1, укороченного до 126 аминокислот. Дальнейшее изучение характеристик рекомбинантных прототипов показало отсутствие влияния встраивания 4-х tandemных повторов М2е белка в НА на температурочувствительный/холодоадаптированный фенотип, свойственный всем штаммам ЖГВ. Однако, модификация гена NS привела к снижению уровня репликации вакцинного прототипа при пониженной температуре (26°C), что ранее было отмечено в литературных данных.

Также для вакцинных прототипов с модифицированными НА или NS была отмечена их способность экспрессировать М2е-фрагмент, что позволило оценить их возможную будущую иммуногенность до начала экспериментов *in vivo*.

Исследование иммуногенных свойств вакцинных прототипов на модели мышей также показало отсутствие влияния вставки 4М2е на формирование антител по отношению к цельному штамму ЖГВ, тогда как одновременно с этим была показана их способность индуцировать М2е-специфические антитела. Изучение механизма действия таких антител выявило их комплемент-зависимую цитотоксическую активность, тогда как антитело-зависимая цитотоксичность не была обнаружена.

Изучение защитной активности вакцинных прототипов с дополнительной вставкой М2е на модели мышей также выявило их преимущество перед использованием классических штаммов ЖГВ, поскольку в результате двукратной интраназальной вакцинации животные были лучше защищены от высоких доз гетерологичных вирусов в опытах по экспериментальному заражению.

Дальнейшее проведение доклинических испытаний на модели хорьков подтвердило безопасность сконструированных вакцинных прототипов. Одним из основных результатов такого исследования является демонстрация связи количества М2е-специфических антител и уровнем защиты против высокой дозы гетерологичного вируса гриппа. Так, кандидат с дополнительной вставкой 4М2е в поверхностной молекуле НА показал наилучшую иммуногенность в отношении М2е-специфических антител, и, соответственно, наилучшую защитную эффективность. В перспективе такой вакцинный кандидат может быть использован в практике здравоохранения для защиты населения от широкого спектра вирусов гриппа А.

В разделе **Обсуждение** автор обсуждает полученные данные и оценивает их с позиций мирового научного опыта, полностью отражает результаты исследования, вытекающие из них выводы, тем самым обобщая проделанную работу.

Выводы из выполненной работы соответствуют поставленным задачам, подводят итог проведенным исследованиям и достаточно полно отражают результаты, полученные автором.

Научная новизна работы Меженской Д.А. заключается в создании первых рекомбинантных штаммов живой гриппозной вакцины (H1N1, H3N2 и H7N9), способных индуцировать усиленный гуморальный иммунный ответ к консервативному участку белка M2 вируса гриппа А в результате встраивания M2e-эпитопов в молекулы HA и NS. Автором было показано, что:

- интраназальная иммунизация животных рекомбинантными штаммами ЖГВ+4M2e приводит к выработке высоких уровней анти-M2e, влияющих на усиление защитной эффективности против высоких доз гетерологичных вирусов гриппа;
- встраивание M2e эпитопов в молекулу гемагглютинина приводит к выработке статистически достоверно более высоких уровней M2e-специфических антител, по сравнению с внесением 4M2e кассеты в рамку считывания NS1 белка;
- наиболее вероятным защитным механизмом рекомбинантных вакцинных штаммов является секреция M2e-специфических антител В-клетками, расположенными в медиастиальных лимфатических узлах животных;
- сыворотки иммунизированных животных в опытах по пассивной иммунизации показали широкий спектр защиты у образцов из групп ЖГВ+4M2e, что также указывает на вклад M2e-специфических антител в усиление защиты от заражения гетерологичными вирусами гриппа.

Достоверность результатов и объективность выносимых на защиту положений и выводов диссертации подтверждается как значительным объемом исследований и фактического материала, так и использованием современных методик проведения исследований.

Апробация результатов. Основные результаты, положения и выводы диссертации отражены в 18 печатных работах, из которых 6 научных статей в журналах, входящих в международные системы цитирования и реферативные базы данных Web of Science и/или Scopus, и 12 тезисов докладов на отечественных и международных конференциях.

Значение полученных результатов для науки и практики. Наиболее значимым теоретическим результатом явился анализ вариативности M2e-эпитопов, в результате которого были смоделированы последовательности вставок из целевых M2e-эпитопов для

конструирования живой гриппозной вакцины с максимально широким покрытием вирусов гриппа А, циркулирующих как среди людей, так и среди свиней и птиц. Полученные результаты могут быть в дальнейшем использованы при создании универсальных гриппозных вакцин на основе различных платформ.

Также в работе были получены рекомбинантные штаммы – кандидаты в универсальную ЖГВ, которые способны обеспечивать защиту против широкого круга патогенных вирусов гриппа А. Было проведено доклиническое изучение таких кандидатов, в результате чего был отобран наиболее перспективный кандидат, имеющий вставку М2е эпитопов в молекуле НА. Дальнейшее изучение такого вакцинного кандидата и успешная апробация позволят в дальнейшем рассчитывать на его применение в практике здравоохранения.

Замечания и вопросы.

В рецензируемой диссертационной работе не выявлены существенные недостатки. В качестве дискуссионных вопросов и уточнений можно отметить следующие:

1. Векторные вакцинные штаммы H3N2-НА+4М2е и H3N2-NS+4М2е имеют различный механизм аттенуации. В частности, в отличие от H3N2-НА+4М2е, вектор H3N2-NS+4М2е экспрессирует укороченный до 126 аминокислотных остатков белок NS1, что должно являться существенным фактором аттенуации вируса в интерферон-компетентных клетках МДСК и организме хорьков и мышей. Вопрос: является ли вектор H3N2-NS+4М2е более аттенуированным по сравнению с H3N2-НА+4М2е? Как соотносятся их уровни репродукции в респираторных органах?
2. Если модификацию НА взять как перспективное направление, означает ли это, что при регулярной замене антигенного профиля вакцины, в соответствии с рекомендациями ВОЗ, придется вновь и вновь конструировать химерный НА? Есть ли убежденность автора, что сконструированный вектор H3N2-НА+4М2е можно будет использовать в течение многих лет в качестве универсальной вакцины, не отслеживая антигенный дрейф вирусов гриппа?
3. Является ли строго необходимым использование различных консенсусных последовательностей М2е во встраиваемой кассете? Или же может быть достаточным использование одного-двух наиболее встречаемых вариантов?
4. Цитата “универсальные вакцины призваны обеспечить защиту против любого серотипа вируса гриппа А, в результате чего отпадает необходимость в ежегодной вакцинации” (автореферат стр.3). Как, по Вашему мнению, долго поддерживается иммунитет, индуцированный универсальной вакциной, есть ли у вас какие-то данные по длительности

иммунитета, индуцированного Вашими конструкциями? Имеются ли такие данные в исследованиях других групп?

Возникшие вопросы и замечания носят частный и дискуссионный характер, ни в коей мере не снижают значимость, ценность и положительную оценку работы, и не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту.

Заключение. Работа Меженской Д.А. представляет собой самостоятельный законченный труд с аргументированными положениями и выводами. Она обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты и положения, выносимые на защиту. Практическая значимость диссертации логически вытекает из полученных автором данных.

Считаю, что диссертационная работа Меженской Дарьи Андреевны отвечает требованиям, изложенным в постановлении правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации № 355 от 21.04.2016, № 748 от 02.08.2016, № 650 от 29.05.2018, № 1024 от 28.08.2017, № 1168 от 01.10.2018, № 751 от 26.05.2020, № 426 от 20.03.2021, № 1539 от 11.09.2021 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней»), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а её автор, Меженская Дарья Андреевна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология.

Официальный оппонент

Заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»,
доктор биологических наук

Ленёва И.А.

Россия, 105064, Москва, Малый Казённый переулок, д. 5а

Тел.: +7(495)674-7691

Wnyfd385@yandex.ru

Дарья Ленёва и др. заверю.

Носальник Ольга *Ев* *Е.В. Букина*

