

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук
Зарубаева Владимира Викторовича на диссертационную работу
Меженской Дарьи Андреевны
на тему: «Создание прототипа универсальной живой гриппозной
вакцины на основе внеклеточного домена М2 белка вируса гриппа А»,
представленной к защите на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности: 1.5.10 – вирусология

Актуальность темы. Грипп занимает одно из ведущих мест в этиологической структуре острых респираторных вирусных инфекций и представляет собой одну из наиболее значимых проблем, стоящих перед современным здравоохранением. Заболеваемость гриппом обуславливает ряд проблем социального и экономического характера: смертность в группах риска, резкое повышение нагрузки на персонал медучреждений, снижение трудовых ресурсов. Эпидемический процесс в последние годы определяют четыре вируса гриппа человека – А (H1N1)pdm09, А (H3N2), В/Ямагата-подобный и В/Виктория-подобный, доли которых в период сезонных подъемов различается в разных странах.

Контроль над гриппозной инфекцией в настоящее время осуществляется тремя способами. Во-первых, это применение специфических вакцин, соответствующих по антигенному профилю циркулирующим в человеческой популяции штаммам вируса. Во-вторых, это терапия уже развившейся гриппозной инфекции вирусспецифическими химиопрепаратами, что позволяет снизить тяжесть заболевания и сократить время активного вирусовыделения у пациента. Наконец, в-третьих, это использование неспецифических иммуномодуляторов и антисептиков, что приводит к повышению порога инфицирования и уничтожению внеклеточных вирионов.

Каждый из описанных способов имеет как преимущества, так и недостатки. Исходя из стоимости и эффективности, ведущим способом контроля гриппозной инфекции является вакцинация. Высокая антигенная вариабельность вируса гриппа требует постоянного мониторинга за антигенными свойствами возбудителя и обновления вакцинных штаммов. В этой связи разработка универсальной вакцины, в равной степени эффективной в отношении вирусов разных типов и подтипов, является приоритетной задачей медицинской науки и практического здравоохранения.

Все изложенное определяет безусловную актуальность представляемых исследований и позволяет сформулировать **основную цель исследования** как разработку универсальной живой гриппозной вакцины на основе внеклеточного домена M2 белка вируса гриппа А.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций. Представленная работа посвящена созданию универсальной живой гриппозной вакцины, индуцирующей иммунный ответ к консервативному участку протонного канала M2 вируса гриппа А. Впервые были сконструированы рекомбинантные штаммы живой гриппозной вакцины подтипов H1N1, H3N2 и H7N9 на основе отечественного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57, кодирующие в составе молекулы гемагглютинина 4 копии наружного домена белка M2 (M2e). Впервые был сконструирован и всесторонне охарактеризован, в том числе с точки зрения эффективности противовирусной защиты и ее механизмов, рекомбинантный штамм вируса, экспрессирующий тетрамер фрагмента M2e в рамке считывания NS1 белка донора аттенуации А/Ленинград/17/57, укороченного до 126 аминокислот.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Выносимые на защиту положения диссертации, отражающие научную новизну и практическую значимость работы, достоверно подтверждены представленными экспериментальными данными. Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, основываются на большом объеме экспериментального материала, являются достоверными и логически вытекают из результатов проведенных исследований. Результаты опытов *in vivo*, в результате которых показана высокая протективная активность вакцинного штамма, в том числе против антигенно далеких вирусов, позволяют сделать однозначное заключение об эффективности вакцины и ее широком спектре активности. В результате проведенного исследования отобран вакцинный штамм HA+4M2e, рекомендованный для проведения первой фазы клинических испытаний на добровольцах. Успешная апробация прототипа универсальной гриппозной вакцины в клинических исследованиях позволит защитить население от любого вновь возникающего вируса гриппа, в том числе пандемического его варианта, и снизить заболеваемость и смертность от гриппа и его осложнений.

Содержание диссертации и её оценка. Диссертационная работа оформлена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 143 страницах текста, оформлена в соответствии с требованиями ВАК РФ, содержит 5 таблиц и 45 рисунков. Библиографический

указатель включает 254 источника, в том числе 4 на русском и 250 - на иностранных языках.

Введение диссертации посвящено актуальности темы исследования, здесь сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы, отмечен личный вклад автора и перечислены основные положения, выносимые на защиту.

В первой главе дан исчерпывающий обзор литературных данных по теме исследования за период 1967-2022 гг. Здесь представлены данные об антигенном разнообразии вирусов гриппа, его антигенной изменчивости, реассортации и антигенном дрейфе, описаны типы используемых вакцин, суммированы описанные в литературе подходы к усилению иммуногенности и расширению спектра действия сезонных гриппозных вакцин. Здесь же подробно описан существующий задел по разработке универсальных гриппозных вакцин, в том числе генноинженерных, на основе эктодомена белка М2. Изложение материала помогает глубже познакомиться с проблемой и потому специальных комментариев не требует.

Во второй главе перечислены использованные материалы и методы исследования. Из материалов главы следует, что в работе использован комплексный подход к проводимым исследованиям, в частности, использовались вирусологические, морфологические, цитологические, иммунологические, молекулярно-биологические методы широкого спектра, включая методы обратной генетики, а также компьютерный анализ аминокислотных последовательностей. Все полученные результаты обработаны с помощью ряда адекватных статистических методов.

В третьей главе «Результаты» автором представлены результаты разработки и изучения протективных свойств универсальной гриппозной вакцины. Приведены данные поиска консенсусной последовательности М2е для конструирования универсальной гриппозной вакцины, конструирования вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины, кодирующих дополнительные эпитопы М2е. Полно и всесторонне изучены характеристики вакцинных прототипов в системе *in vitro*, а также их аттенуирующие свойства. Приведены результаты изучения иммуногенности и протективной активности вакцинного прототипа на основе штамма H7N9 и штамма H7N9-NA+4M2e на животных, изучен спектр кросс-протективной активности вакцинного штамма с использованием негомологичных вирусов, отличающихся по серотипам. Приведена характеристика Т- и В-клеточного ответа на вакцину, приведены результаты анализа эффективности различных

консенсусных последовательностей M2e, а также результаты доклинического изучения эффективности и безопасности вакцинного штамма на модели гриппозной инфекции у хорьков.

В четвертой главе приведено обсуждение полученных в ходе исследования данных, результаты работы сопоставлены с данными других авторов, проанализированы сходные и различные данные. Описаны также перспективы дальнейшей разработки полученной универсальной вакцины и нерешенные вопросы, поднятые в ходе исследования.

Выводы и практические рекомендации Выводы диссертации и практические рекомендации представлены четко и обосновано вытекают из материалов диссертации. Автореферат диссертации адекватно отражает её основные положения и содержание. Апробацию результатов работы, проведенной за период 2018-2021 гг., следует признать достаточной: по теме диссертации опубликовано 18 печатных работ, 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.

Из замечаний к работе следует отметить следующее. Повсеместно при описании опытов *in vivo* используются выражения «модель мышей» и «модель хорьков». Корректнее было бы говорить о модели гриппозной инфекции (или экспериментальной гриппозной инфекции) у мышей/хорьков.

При описании манипуляций в разделе «Материалы и методы» (стр.52 и далее) не всегда правомочно используются обороты с возвратными глаголами – «...планшеты покрывались... разведениями», «...проявка останавливалась...» и т.п.

Обозначения аминокислот (стр.25 и далее) следует делать одинаковыми – либо везде по-русски, либо везде по-английски.

В тексте диссертации встречаются неудачные с точки зрения стилистики обороты и несоответствие падежей. Сюда следует отнести «малое число вхождения в вирион» при описании белка M2 (стр.6), «низкий уровень предсказания штамма» (стр.15), «клеточное пространство» (стр.26), «играть значение» (стр.58), «...иммунитета входных воротах...» (стр.111), «...в отличие от классическим вариантом...» (стр.113) и ряд других.

Перечисленные замечания ни в коей мере не носят принципиального характера, а касаются лишь технических и оформительских аспектов работы. В целом работа оставляет впечатление исключительно полного и всестороннего исследования, выполненного на высоком профессиональном уровне с использованием самых современных методик.

К автору работы имеется несколько вопросов.

1. Есть ли данные о доступности M2e для антител в нативных вирионах? Не маскируется ли он от контакта с ними прилежащими поверхностными белками HA и NA?

2. Из табл.5 (стр.64) следует, что МИД₅₀ для легких в случае вирусов H7N9 составляет $\geq 6.0 \lg$ ЭИД₅₀. Тем не менее, при заражении дозой $6.0 \lg$ ЭИД₅₀ вирусы в легких размножились до титров $1,4 - 2,1 \lg$ ЭИД₅₀. Как автор это объясняет?

3. Как определяли площадь под кривыми снижения веса животных? Эта информация есть в подписях к рисункам, а в разделе «Материалы и методы» отсутствует.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы. Полученные результаты могут быть использованы при дальнейшей разработке и внедрении универсальной гриппозной вакцины в качестве средства профилактики гриппа. Внедрение результатов настоящего исследования может повысить эффективность контроля за этой инфекцией и снизить частоту неблагоприятных последствий гриппа.

Заключение.

Диссертационная работа Меженской Дарьи Андреевны на тему «Создание прототипа универсальной живой гриппозной вакцины на основе внеклеточного домена M2 белка вируса гриппа А», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология, представляет собой самостоятельно выполненную и законченную научно-квалификационную работу, содержащую результаты изучения протективных свойств живой гриппозной вакцины, активной в отношении многих вирусов гриппа А.

По научной новизне, актуальности, высокому методическому уровню, научной ценности и практической значимости результаты диссертационной работы отвечают требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842), в редакции постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г. и №748 от 02.08.2016 г., предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.10 – вирусология.

Отзыв обсужден и одобрен 28.09.2022 г. на заседании отдела вирусологии Федерального бюджетного учреждения науки Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Официальный оппонент: доктор биологических наук (1.5.10 - вирусология), ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии Федерального бюджетного учреждения науки Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

[Handwritten signature]

Зарубаев Владимир Викторович
«29» сентября 2022 г.

Почтовый адрес: 197101, Российская Федерация, г. Санкт-Петербург, ул. Мира, дом 14. Тел. +7(911)928-0495. e-mail: zarubaev@pasteurorg.ru

Подпись Зарубаев В.В. удостоверяю.
Карантинный отдел кадров:

[Handwritten signature]
[Handwritten initials]

