



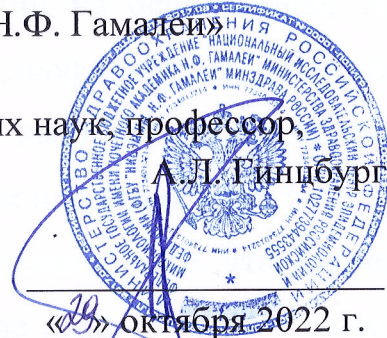
федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный исследовательский центр  
эпидемиологии и микробиологии  
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
(ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России)

123098, Москва, ул. Гамалеи, 18  
от \_\_\_\_\_ № \_\_\_\_\_

Тел: 8 499-193-30-01  
Факс: 8 499-193-61-83  
<http://www.gamaleya.org>  
E-mail: [info@gamaleya.org](mailto:info@gamaleya.org)

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Директор  
федерального государственного бюджетного  
учреждения «Национальный  
исследовательский центр эпидемиологии и  
микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи»  
Минздрава России,  
доктор биологических наук, профессор,  
академик РАН



«29» октября 2022 г.

**ОТЗЫВ**

ведущего учреждения, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, о научно-практической значимости 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» в Диссертационный совет Д 21.1.017.01 при ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

### **Актуальность темы выполненной работы.**

Диссертация Меженской Д.А. посвящена актуальной проблеме вирусологии – разработке универсальной гриппозной вакцины, направленной на индукцию перекрестно-реагирующих факторов иммунного ответа к наиболее консервативным участкам вирусных белков и обеспечивающих защиту против разных подтипов вируса гриппа А.

Эктодомен белка М2 (М2е) вируса гриппа А является наиболее широко используемой мишенью для создания универсальной гриппозной вакцины, поскольку он консервативен у различных подтипов вируса гриппа А. Однако он обладает слабой иммуногенностью, что требует поиска новых носителей для М2е с целью повышения его иммуногенности. Несмотря на наличие большого количества работ по разработке вакцин на основе М2е, такие вакцины пока не были зарегистрированы для профилактики гриппозной инфекции в практическом здравоохранении как у нас в стране, так и других странах мира; исследования в данном направлении продолжаются.

Актуальность работы Меженской Д.А. обусловлена тем, что, несмотря на определённые успехи, достигнутые в последние годы в области создания универсальной гриппозной вакцины, до сих пор не представлены конструкции, полностью удовлетворяющие всем требованиям безопасности, иммуногенности, генетической стабильности, возможности крупномасштабного производства и экономической целесообразности. В этой связи разработка новых подходов к созданию универсальных гриппозных вакцин является своевременной и актуальной.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна.**

Диссертационная работа Меженской Д.А. явилась первой попыткой создания универсальной живой гриппозной вакцины (ЖГВ), индуцирующей усиленный гуморальный иммунный ответ к консервативному участку белка М2 вируса гриппа А. Автором впервые были сконструированы рекомбинантные штаммы подтипов А(Н1N1), А(Н3N2) и А(Н7N9) на основе отечественного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57, кодирующие в составе молекулы гемагглютинина 4 копии М2е белка. 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.

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. Это было также подтверждено экспериментами по пассивной иммунизации мышей сыворотками иммунизированных животных, показавшими наиболее широкий спектр защиты у образцов из групп ЖГВ+4М2е.

Достоверность полученных в диссертации результатов, обоснованность научных положений, выводов и заключений не вызывает сомнений и основывается на продуманном дизайне исследования и использованной методической базы. Четко сформулированные задачи определили последовательность выполнения исследования и достижения поставленной цели: отбор консенсусных последовательностей М2е белка вируса гриппа А, конструирование вакцинных штаммов с увеличенным числом эктодоменов М2 белка, оценка их безопасности, иммуногенности и кросс-протективности на животных моделях. Работа проведена с использованием современных генно-инженерных, вирусологических, молекулярно-биологических и

иммунологических методов. Используются корректные методы экспериментальной работы с использованием адекватных контролей.

Выводы диссертации хорошо обоснованы и подтверждены обширным экспериментальным материалом. Результаты работы представлены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях: 7th и 8th ESWI Influenza Conference (2020, 2021), XII Ежегодный всероссийский конгресс по инфекционным заболеваниям (2020), «Options for the Control of Influenza X» (2019), XXI Международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (2018), 22-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА» (2018), 2nd International Meeting on Respiratory Pathogens (2018), Неделя Науки СПбПУ (2018).

**Оценка содержания диссертации, её завершенность в целом, замечания по оформлению.**

Предъявленная диссертация носит целостный и завершённый характер, изложена на 143 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, заключения и выводов, списка сокращений и списка литературы. Диссертация содержит 5 таблиц и 45 рисунков. Список литературы включает 254 источника, в том числе 250 публикаций в зарубежных источниках.

Во введении изложена актуальность темы и степень её разработанности, сформулированы цели и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы, а также основные положения, выносимые на защиту, апробация работы и личное участие автора. В обзоре литературы приведены последние данные о вирусе гриппа, представлен обзор существующих вакцин для профилактики сезонного гриппа, описаны подходы к усилению иммуногенности и расширению спектра действия гриппозных вакцин, представлены данные о существующих работах по

созданию универсальных гриппозных вакцин на основе эктодомена белка М2.

В главе «Материалы и методы исследований» приводится характеристика примененных автором материалов и методов исследования. В работе использовались эволюционный анализ последовательностей М2е, методы обратной генетики, вирусологические методы, в том числе работа с экспериментальными животными, иммунологические методы. Методы исследования описаны достаточно подробно, что свидетельствует о высоком уровне методической квалификации, необходимом для выполнения поставленных задач. В главе «Результаты» описывается поиск оптимальной последовательности М2е для конструирования универсальной гриппозной вакцины; конструирование вакцинных штаммов, кодирующих дополнительные эпитопы М2е; изучение ростовых характеристик вакцинных прототипов в системах *in vitro* и *in vivo*; оценка экспрессии М2е фрагментов рекомбинантными вирусами гриппа; изучение иммуногенности и защитной эффективности экспериментальных вакцинных штаммов на мышинной модели, доклиническое изучение перспективных кандидатных штаммов на модели хорьков. В заключении главы обобщены результаты проведенных исследований и делается вывод об их фундаментальной и прикладной значимости. Выводы обоснованы данными экспериментальных исследований, логично сформулированы. Принципиальных замечаний по оформлению работы нет.

### **Значимость результатов работы для науки и практики.**

Практическая значимость результатов обусловлена возможностью использования смоделированных в ходе работы последовательностей вставок из целевых М2е-эпитопов для дизайна универсальной гриппозной вакцины, включая векторные вакцины, рекомбинантные белковые технологии и вакцины на основе нуклеиновых кислот. Проведенные автором эксперименты на животных продемонстрировали способность сконструированных рекомбинантных штаммов-кандидатов обеспечивать

защиту против широкого круга антигенно удаленных вирусов гриппа, что позволило отобрать кандидата ЖГВ-НА+4М2е 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 А, в том числе пандемического варианта, и снизить заболеваемость и смертность от гриппа и его осложнений.

### **Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах.**

По теме диссертации опубликовано 6 статей в журналах списка, рекомендованного ВАК Минобрнауки РФ (в том числе в журналах, входящих в международные системы цитирования и реферативные базы данных Web of Science и/или Scopus). Материалы были также представлены на всероссийских и международных конференциях, по итогам которых опубликовано 12 тезисов. Публикации автора полностью отражают основные результаты проведённых исследований.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы.**

Научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертации Меженской Д.А., могут быть использованы для конструирования прототипов универсальной гриппозной вакцины, используя в качестве основы различные вирусные векторы, нуклеиновые кислоты, а также технологии белковой инженерии.

### **Вопросы.**

1. В ходе выполнения работы проводили ли изучение мукозального иммунного ответа на сконструированные вакцинные кандидаты в экспериментах на животных? Как известно, основным механизмом

протективного действия живых вакцин, вводимых интраназально, является формирование вирусспецифического иммунитета, главным образом IgA антител, на слизистых верхних дыхательных путей.

2. Есть ли основания предполагать, что иммунный ответ к М2е эпитопам, выработанный при иммунизации сконструированными вакцинными прототипами, будет сохраняться длительное время?
3. Существует ли возможность комбинировать подходы, описанные в данном диссертационном исследовании, с ранее описанными стратегиями усиления кросс-протективных свойств традиционных противогриппозных вакцин?

**Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней.**

Диссертационная работа Меженской Дарьи Андреевны «Создание прототипа универсальной живой гриппозной вакцины на основе внеклеточного домена М2 белка вируса гриппа А», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология, является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задач по разработке универсальной живой гриппозной вакцины на основе внеклеточного домена М2 белка вируса гриппа А и исследованию безвредности, иммуногенности и кросс-протективной активности перспективных кандидатных штаммов. По актуальности, научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов, работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология.

Отзыв обсужден и одобрен на научной конференции Отдела экологии вирусов с научно-практическим центром по экологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», подразделение Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России 28 октября 2022г. (Протокол № 2).

Заведующая лабораторией  
этиологии и эпидемиологии гриппа  
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»  
Минздрава России, д.м.н.  
Адрес: улица Гамалеи дом 18,  
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»  
Минздрава России, 123098, Москва, РФ,  
Тел.: +74991903046  
e-mail: elena-burtseva@yandex.ru

Бурцева Елена Ивановна

Подпись Бурцевой Е.И. заверяю.  
И.о. Ученого секретаря ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»  
Минздрава России, к.б.н. Сысолятина Е.В.

ПОДПИСАНО  
Ученый секретарь  
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»  
Минздрава России

