

ОТЗЫВ

официального оппонента Ленёвой Ирины Анатольевны
на диссертацию Шуклиной Марины Александровны на тему
«Иммуногенность и кросс-протективность химерных белков, включающих
консервативные участки гемагглютинаина, нуклеопротеина и белка М2 вирусов гриппа А»
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.10 – вирусология

Несмотря на успехи медицинской вирусологии, грипп остается медико-социальной проблемой, наносящей вред здоровью людей и приводящей к громадным экономическим потерям. Постоянный антигенный дрейф вирусов гриппа обуславливает необходимость ежегодного обновления штаммового состава вакцин. Несмотря на постоянный мониторинг антигенной изменчивости вирусов, в некоторые эпидемические сезоны наблюдается несоответствие компонентов традиционных штаммоспецифичных вакцин с циркулирующими штаммами, что снижает эпидемиологическую эффективность препаратов. Тем более такие вакцины бессильны в случае неожиданного появления пандемических вирусов. Стратегический план исследований по усовершенствованию противогриппозных вакцин конечной целью ставит разработку универсальных вакцин, которые защищали бы от вирусов гриппа А обеих филогенетических групп, обеспечивая надежную защиту от тяжелых форм инфекции и от смертельных исходов.

Появление генно-инженерных технологий, развитие принципов обратной вакцинологии позволяет создавать вакцины с широким спектром защиты, свободных от недостатков традиционных вакцин. Разработка вакцин нового поколения идет по нескольким направлениям, в том числе на основе гибридных белков. За счет включения в их состав высоко консервативных участков белков вируса гриппа А обеспечивается перекрестный типоспецифический иммунный ответ. Наиболее перспективными компонентами вакцинных белков считаются эктодомен белка М2, консенсусный для вирусов различных субтипов, нуклеопротеин, пептиды нейраминидазы. Также один из подходов к увеличению иммуногенности вакцин заключается в стимулировании выработки кросс-реактивных антител, нацеленных на консервативную стеблевую область гемагглютинаина. Эти антитела демонстрируют перекрестную реактивность как внутри одного подтипа, так и между различными подтипами внутри одной группы, а в некоторых случаях — между вирусами, относящимися к филогенетическим группам I и II.

Представленная диссертация отражает исследования иммуногенности и защитных свойств именно гибридных вирусных белков как основы кросс-протективных вакцин. Подобного рода исследования проводятся многими научными коллективами.

Незначительная часть вакцин находится на стадии клинических исследований. Но несмотря на интенсивные исследования в этой области, на сегодняшний день ни одна разрабатываемая вакцина не достигла этапа регистрации.

Все вышеизложенное свидетельствует об **актуальности** проделанной соискателем работы, направленной на создание рекомбинантной гриппозной вакцины широкого спектра действия с использованием оригинальных генно-инженерных подходов.

Содержательная часть диссертации отличается целостностью, логичностью и полнотой изложения. Работа имеет классическую структуру, включающую введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, выводы, список литературы и приложения.

Во введении четко и аргументированно обоснована актуальность темы, сформулированы цель, задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту. Личный вклад автора описан конкретно и убедительно.

Обзор литературы представляет собой анализ большого количества публикаций последних 10-15 лет и охватывает ключевые аспекты биологии вируса гриппа, детально рассматривает консервативные антигены (M2e, стеблевой домен HA, NP) как мишени для универсальных вакцин, а также платформы для их конструирования. Отдельный раздел посвящен флагеллину в качестве носителя целевых антигенов и его адъювантным свойствам. Обзор демонстрирует широкую эрудицию автора и служит теоретическим фундаментом для собственных исследований. Список литературы, содержащий 441 источник, преимущественно на английском языке, репрезентативен и отражает современные мировые достижения в данной области.

Раздел «Материалы и методы» исчерпывающе описывает методики, использованные в работе, а также вирусы, животные модели, белки. Соискатель владеет широким спектром современных методов: от биоинформатического анализа и получения рекомбинантных белков до сложных иммунологических исследований (мультипараметрическая проточная цитометрия, ELISPOT, оценка врожденного иммунитета) и оценки защитных свойств рекомбинантных белков на различных модельных животных (мыши, хорьки). Описание статистической обработки данных является корректным и соответствует современным стандартам.

В разделе «Результаты» представлен большой объем собственных экспериментальных данных. Изложение ведется последовательно, от обоснования дизайна

и физико-химических характеристик препаратов к изучению их функциональной активности в эксперименте, что создает логичное и убедительное научное повествование.

Раздел начинается с фундаментального этапа – обоснования дизайна и создания рекомбинантных белков. Созданы композиционно новые рекомбинантные белки, включающие пептиды вирусных белков HA, M2, NP и флагеллин – перспективный активатор Toll-подобных рецепторов 5 (TLR5), активирующий врожденный и усиливающий адаптивный иммунный ответ. Белки отличаются по месту инсерции целевых антигенов и последовательности их соединения: конструкции с присоединением фрагментов HA2 и tandemных повторов M2e к С-концу полноразмерного флагеллина (Flg-HA2-4M2ehs, Flg-4M2ehk-HA2), взамен гипервариабельного домена флагеллина (FlgSh-HA2-4M2ehs), а также конструкция с дополнительным включением эпитопов нуклеопротеина NP (Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs). Автор проводит анализ конструкций *in silico*: рассчитывает теоретические параметры белков, трехмерные структуры и проводит поиск потенциальных Т- и В-клеточных эпитопов в составе антигенных вставок. Для полученных рекомбинантных белков была подтверждена сохранность биологической активности флагеллина по способности активировать TLR5 рецептор.

Экспериментально показано влияние порядка присоединения антигенов на специфические функции. Так, конструкция Flg-HA2-4M2e (фрагмент HA2 расположен перед M2e) является значительно более иммуногенной и обеспечивает лучшую защиту от летального заражения, чем конструкция Flg-4M2e-HA2 (где модуль M2e расположен перед HA2). Этот результат имеет фундаментальное значение для биотехнологии, подчеркивая критическую важность пространственной организации антигенов в химерных белках. Показано, что добавление CTL-эпитопов нуклеопротеина к эффективной конструкции Flg-HA2-4M2ehs не приводило к значимому усилению защиты, а по некоторым параметрам иммуногенности даже снизило ее, что, возможно, связано со стерическими затруднениями и изменением третичной структуры белка.

Проведено также углубленное изучение механизмов иммунного ответа при иммунизации рекомбинантными белками. Показано усиление M2e-специфического ответа после инфекции у иммунизированных мышей («буст-эффект» *in vivo*). Изучена активация врожденного иммунитета и показана способность белка Flg-HA2-4M2ehs индуцировать быстрый, но контролируемый воспалительный ответ (включая транзиторное повышение С-реактивного белка), что подтверждает его адъювантные свойства.

В серии экспериментов изучен защитный эффект химерных белков при заражении животных вирусами гриппа А, относящихся к разным типам и филогенетическим группам: А/Н3Н2, А/Н5Н1, А/Н1Н1, А/Н2Н2, А/Н7Н9.

На основе одной из конструкций была разработана вакцина Грифлавак, проведены доклинические исследования на хорьках. Эта часть работы выполняет роль моста между фундаментальными исследованиями и практическим применением. Показана безопасность кандидатной вакцины при интраназальном и подкожном введении, способность индуцировать антиген-специфические антитела и Т-клеточный ответ, а также протективная эффективность, проявляющаяся в достоверном снижении репликации вируса в дыхательных путях после заражения гомологичным вирусом.

В разделе «Обсуждение» автор проводит анализ своих результатов, сравнивает их с данными других исследователей, выдвигает аргументированные гипотезы о механизмах наблюдаемых эффектов (например, о влиянии порядка присоединения антигенов на иммуногенность), намечает перспективы дальнейших исследований.

Оформление диссертации и автореферата полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Текст хорошо структурирован, написан хорошим литературным языком. Иллюстративный материал (20 таблиц и 38 рисунков) выполнен качественно, информативно и органично интегрирован в текст. Список литературы оформлен без замечаний.

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, являются обоснованными и достоверными. Достоверность результатов обеспечена репрезентативным объемом экспериментальных данных, использованием современных вирусологических, иммунологических, молекулярно-биологических и статистических методов, а также воспроизводимостью полученных результатов.

Работа имеет бесспорную **научную новизну**, в частности,

- впервые разработана и охарактеризована линейка химерных белков на основе флагеллина с различной компоновкой консервативных антигенов вируса гриппа А (фрагмента НА2, tandemных повторов М2е и эпитопов NP);
- впервые показано существенное влияние порядка присоединения антигенов (НА2 и М2е) к флагеллину на иммуногенность и протективную эффективность конструкций;
- впервые проведено комплексное сравнительное исследование иммуногенности и кросс-протективной активности сконструированных химерных белков против

широкого спектра вирусов гриппа А (H3N2, H1N1pdm09, H7N9, H5N1, H2N2), относящихся к разным филогенетическим группам.

- впервые на модели хорьков показана безопасность и специфическая активность кандидатной вакцины «Грифлавак», созданной на основе белка Flg-HA2-4M2ehs, при разных путях введения (интраназальном и подкожном).

Теоретическая значимость работы заключается в углублении представлений о механизмах формирования перекрестного протективного иммунитета при иммунизации препаратами, содержащими консервативные вирусные пептиды в комбинации с TLR5-агонистом (флагеллином). Полученные данные вносят вклад в науку о вакцинах, раскрывая взаимосвязь между структурой химерного белка, характером индуцируемого иммунного ответа (гуморального, клеточного) и спектром защиты от инфекции.

Практическая значимость. Исследованные рекомбинантные белки демонстрируют различную иммуногенность и эффективность, формируя линейку кандидатов для создания универсальной противогриппозной вакцины. Они могут выступать как в роли самостоятельного препарата, так и в качестве ключевого компонента в более сложных композициях. Важным преимуществом платформы является возможность оперативной модификации антигенных вставок для ответа на новые эпидемические угрозы. В работе намечены перспективы дальнейших исследований, которые следует поддержать. В первую очередь рекомендуется продолжить исследования конструкций с включением эпитопов NP белка, а также исследования по усилению защитной эффективности ИГВ при сочетании ее с вакциной на основе рекомбинантного белка.

На основе полученных результатов в качестве наиболее перспективного был выбран белок Flg-HA2-4M2ehs, послуживший основой для вакцины «Грифлавак». Для данного препарата был успешно завершён полный цикл доклинических испытаний. Рекомендуется проведение 1-й фазы клинических исследований для определения дальнейших перспектив внедрения нового препарата в вакцинопрофилактику гриппа.

Основные научные положения и результаты диссертации полно отражены в опубликованных автором работах. По теме диссертации опубликовано 23 печатные работы, из них 13 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ. Публикации в авторитетных отечественных и зарубежных изданиях отражают основные этапы и выводы проведенного исследования.

Замечания и вопросы

В рецензируемой диссертационной работе не выявлены существенные недостатки. В качестве отдельных замечаний по оформлению можно отметить следующие:

1. В работе отсутствует подробное описание вирусов, используемых для заражения мышей (история их адаптации, приготовление вируса для заражения -пассирование через легкие, накопление в эмбрионах и т.д.), также не указаны абсолютные значения вирусов, используемых для заражения мышей , значения даны только в МЛД50, а должны быть указано соответствие их в ТЦИД50 или ЭИД50
2. В работе отсутствуют данные о вируснейтрализующих антителах после иммунизации препаратами, нет данных об определении возможного размножения вирусов в легких хомяков, только в назофарингальных смывах, хотя такая информация была бы интересна и полезна
3. В работе в Методах отсутствует раздел об определении титра вируса в легких мышей, она разбросана по различным разделам, было бы полезно выделить .тот метод отдельно в подпункт
4. В опытах по комбинированной вакцинации была использована ИГВ, какая именно вакцина это была, какие штаммы вирусов входили в ее состав?

Кроме того, к представленной работе имеются следующие дискуссионные вопросы

1. В чем помимо широкого спектра эффективности в отношении различных штаммов вируса гриппа преимущества предлагаемой вами вакцины (сроки конструирования, наработки необходимого объема доз в случае возникновения нового варианта с пандемическим потенциалом, стоимость и т.д.) ?
2. Вы изучали два пути введения вакцины, какой на Ваш взгляд путь введения будет более предпочтительным в случае внедрения вакцины в клиническую практику?

Возникшие вопросы и замечания ни в коей мере не снижают значимость и ценность работы, а дискуссионные вопросы скорее могут служить основой для новых идей и дальнейших исследований.

Заключение

Диссертация М.А. Шуклиной на тему «Иммуногенность и кросс-протективность химерных белков, включающих консервативные участки гемагглютинина, нуклеопротеина

проведенных исследований отвечает требованиям пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 (в ред. Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 N 723, от 21.04.2016 N 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415, от 26.10.2023 № 1786, от 25.01.2024 № 62, от 16.10.2024 N 1382), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Шуклина Марина Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии,
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»
доктор биологических наук
e-mail: wnyfd385@yandex.ru
тел: 8-916-211-88-78

Ленева Ирина Анатольевна

«10» ноября 2025 г.

Подпись Леновой И.А. заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного

бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»



А.В.Васильева