

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации Шуклиной Марины Александровны
на тему

ИММУНОГЕННОСТЬ И КРОСС-ПРОТЕКТИВНОСТЬ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ, ВКЛЮЧАЮЩИХ КОНСЕРВАТИВНЫЕ УЧАСТКИ ГЕМАГГЛЮТИНИНА, НУКЛЕОПРОТЕИНА И БЕЛКА М2 ВИРУСОВ ГРИППА А

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.10 – вирусология

Актуальность исследования. Представленная диссертационная работа посвящена изучению иммунной реакции организма на введение рекомбинантных белков – основы вакцин против гриппа А. Создание вакцин на платформе гибридных белков представляет одно из основных направлений современной вакцинологии. Такого рода вакцины, включающие, как правило, консервативные фрагменты вирусных белков, направлены на расширение диапазона защиты от вирусов гриппа разных субтипов.

Следует отметить, что в последнее десятилетие изменилась парадигма профилактики гриппа. От вакцин нового поколения наряду с защитой от вирусов гриппа разных субтипов требуется не столько полное предупреждение заболевания, сколько профилактика тяжелых форм болезни и предупреждение летальных исходов (<https://www.who.int>item>). Вакцины на основе гибридных белков гипотетически соответствуют этим требованиям и активно разрабатываются во многих научных центрах. В настоящее время на сайте CIDRAP (*Center for Infectious Disease Research and Policy*), представляющем наиболее полную картину разрабатываемых в мире вакцин, зарегистрировано 39 вакцинных препаратов на основе гибридных белков в стадии доклинических и клинических исследований (ivr.cidrap.umn.edu/universal-influenza-vaccine).

Особенности вакцин на основе рекомбинантных белков, а именно безопасность, хорошая переносимость, кросс-реактивность определяют их ценность и область применения: в качестве праймирующего препарата у неиммунных лиц, в том числе у детей раннего возраста, для усиления эффекта сезонных вакцин, для вакцинации населения в начальный период пандемии до появления штаммоспецифических вакцин. Вместе с тем, несмотря на усилия многих научных коллективов во всем мире, ни одна из вакцин с универсальным эффектом против вирусов гриппа пока не зарегистрирована.

Оптимизация вакцинных конструкций, в том числе вид адъювантов, изучение механизмов реакции на различного рода белковые конструкции, схемы иммунизации –

вопросы, имеющие первостепенное значение для создания успешных средств профилактики гриппа. Именно эти вопросы разрабатывались диссертантом, что полностью соответствует мировой тенденции и отражает актуальность задачи.

Цель работы состояла в исследовании механизмов иммуногенности, формирования иммунологической памяти и защитных свойств рекомбинантных белков, содержащих консервативные участки гемагглютинаина, белка М2 и нуклеопротеина вируса гриппа А, а также созданной на их основе кандидатной вакцины.

Задачи исследования:

- 1) Обоснование дизайна рекомбинантных белков, включающих последовательность флагеллина и консервативные участки белков вирусов гриппа А. Получение и физико-химическая характеристика рекомбинантных белков различных конструкций.
- 2) Выбор оптимального рекомбинантного белка на основе результатов исследования специфического гуморального и Т-клеточного иммунного ответа у лабораторных животных после интраназальной иммунизации.
- 3) Изучение специфической активности выбранного белка (прототипного вакцинного) при разных способах введения – интраназальном и парентеральном.
- 4) Исследование диапазона и выраженности защитного действия рекомбинантного вакцинного белка на модели летальной гриппозной инфекции.
- 5) Исследование безопасности и специфической активности кандидатной вакцины на хорьках.

Содержание диссертации, ее структура и объем. Диссертация имеет традиционную структуру, содержит литературный обзор, главу материалы и методы, три раздела, посвященные результатам собственных исследований, обсуждение и выводы. Завершает работу список сокращений и список использованной литературы – 441 источник. Имеется 4 приложения - схемы гейтирования иммунных Т-клеток и дизайн опыта на хорьках.

В литературном обзоре дано строение вируса гриппа А и его жизненный цикл. Особое внимание уделяется вирусным белкам, используемых в качестве целевых антигенов при разработке вакцин, их функциям и иммуногенности. Излагается концепция создания кросс-протективных вакцин и основные платформы для их разработки. Отдельный раздел посвящен адъювантным свойствам бактериального белка флагеллина и клиническим исследованиям препаратов его содержащих. Обзор изложен на 57 страницах, логичен, дает современную точку зрения на освещаемые вопросы. Изложен ясным грамотным языком.

Глава «Материалы и методы» представляет исчерпывающее описание вирусов, систем для культивирования вирусов, лабораторных животных, используемых в работе, представлен также дизайн рекомбинантных белков и методы их физико-химической характеристики. Для решения поставленных задач был привлечен широкий арсенал современных методов исследования, включая биоинформационные, вирусологические, иммунологические (проточная цитометрия, иммуноферментный анализ, выделение мононуклеаров из цельной крови, ELISPOT) и другие. Грамотный методический подход и адекватная математическая обработка результатов убеждает в достоверности последующих выводов.

Глава «Результаты» состоит из трех разделов. Первый раздел посвящен разработке дизайна 5 вариантов рекомбинантных белков, включающих консервативные участки вирусного белка M2, второй субъединицы гемагглютинаина - HA2 и белка NP (нуклеопротеина). В качестве носителя выбран флагеллин - жгутиковый белок *S. typhimurium*, лиганд Toll-like 5 рецептора (TLR5), обладающий адъювантными свойствами. Представлены 3D модели белков, рассчитаны молекулярные массы, степень гидрофильности. Белки получены в бактериальной экспрессионной системе (*E. Coli*). Методами электрофореза, Вестерн-блота, LAL-теста подтверждена чистота и подлинность белков. Показана их стабильность.

Самый обширный раздел главы отражает исследование иммуногенности и защитных свойств созданных рекомбинантных белков. Исследования выполнялись на линейных мышах Balb/c и C57BL/6. Иммуногенные свойства белков изучались как при интраназальном, так и при парентеральном способах введения. Автором убедительно продемонстрирована активная продукция специфических антител в сыворотках крови к M2e, флагеллину, а также образование противовирусных антител (к вирусам A/H7N9, A/H5N1, A/H1N1pdm и др) у иммунизированных животных. При интраназальном введении препаратов регистрировался как системный, так и местный иммунный ответ. Существенным преимуществом интраназальной аппликации было сокращения сроков репродукции вирусов гриппа в легких.

Раздел содержит хороший сравнительный анализ особенностей гуморального и клеточного иммунного ответа на гибридные белки, содержащие и не содержащие эпитопы вирусного NP белка. Показано, что включение CD8+ эпитопов белка NP в конструкцию Flg-HA2-4M2ehs несколько снижает гуморальный иммунный ответ к антигенам M2e и HA2, что может быть связано с изменением третичной структуры белка. При этом включение фрагментов нуклеопротеина усиливало цитотоксический потенциал гибридного белка.

Вирус-специфический ответ был сходным для обоих белков и характеризовался образованием клеток памяти - CD4⁺ и CD8⁺ Тем-клеток, продуцентов IFN- γ . Сопоставимым был и защитный потенциал этих белков – 90 и 100%, соответственно для белков Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs и Flg-HA2-4M2ehs.

В последнем разделе главы «Результаты» представлены итоги исследования иммуногенности и протективности, созданной на основе белка Flg-HA2-4M2ehs, кандидатной вакцины на хорьках. Исследования подтвердили ранее полученные результаты о безвредности вакцины, ослаблении клинических проявлений гриппа у привитых животных и выраженной иммунной реакции на вакцину.

В «Обсуждении» автор сопоставляет свои результаты с научными данными других исследователей и оценивает свой вклад в проблему разработки вакцин с универсальным спектром защиты.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, их достоверность и новизна. Большой объем и разноплановость выполненных исследований, выбор адекватных животных моделей, лабораторных методов анализа. логическая последовательность проводимых экспериментов, их воспроизводимость, а также тщательная статистическая обработка дает уверенность в достоверности полученных результатов и вытекающих из них выводов.

Научная новизна работы заключается в оригинальности сконструированных гибридных белков. Впервые получены химерные белки на основе флагеллина с включением в разной последовательности одних и тех же целевых антигенов, как в область гипервариабельного домена, так и к С-концу молекулы. Продемонстрирована связь типа конструкций – третичной структуры - и специфических свойств белков.

Теоретически определены Т- и В- клеточные эпитопы в вирусных компонентах гибридных белков и в экспериментах на животных изучены иммуногенные свойства. Получены новые данные по клеточно-опосредованному иммунитету при разных способах введения. Показано, что сконструированные белки индуцируют образование Т-клеток памяти CD4⁺ и CD8⁺ Тем, что крайне важно для длительного сохранения поствакцинального иммунитета.

Впервые показан выраженный защитный эффект сконструированных белков в отношении большого ряда вирусов гриппа А разных субтипов (H3N2, H1N1pdm09, H7N9, H5N1, H2N2). В условиях проводимых экспериментов аргументировано продемонстрированы преимущества конструкции Flg-HA2-4M2ehs, которая в дальнейшем была использована для кандидатной вакцины «Грифлавак». Впервые изучены уровень и

характер иммунного ответа на разработанную кандидатную вакцину и ее протективная эффективность на хорьках.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования расширяют современные представления о формировании иммунитета на консервативные пептиды вируса гриппа. Дополнены представления о вкладе в иммунный ответ как врожденного, так и специфического компонентов иммунитета. Однозначно научный интерес представляют данные по реакции врожденного иммунного ответа, в частности, изменение клеточного ландшафта в легких после иммунизации.

Получены и охарактеризованы реально работающие гибридные белки, которые могут быть использованы при создании вакцин с широким диапазоном действия (универсальных)

Перспективны для дальнейшего изучения эксперименты по усилению защитного эффекта сезонной вакцины при сочетании ее с вакциной на основе рекомбинантного белка. Такое сочетание полностью защищало иммунизированных животных даже при высокодозном заражении. Потенциально это может иметь хорошее практическое применение.

Безусловно, выполненные исследования имеют научные и практические перспективы. Поэтому приветствовалось бы продолжение этих работ. В первую очередь рекомендуется провести 1-ую фазу клинических исследований, которая определит дальнейшую судьбу разработанной вакцины. Рекомендуется также продолжить исследования на релевантных моделях гибридных белков, содержащих фрагменты вирусного NP белка.

Материалы исследования широко представлены в научных публикациях: по теме диссертации опубликовано 13 статей в престижных зарубежных журналах, также в журналах, рекомендуемых ВАК. Публикации полностью отражают результаты исследований по теме диссертации. Материалы многократно докладывались и обсуждались на российских и международных конференциях.

Соответствие специальности

Диссертационная работа Шуклиной М.А. по тематике, методам исследования, научным положениям и выводам соответствует паспорту специальности 1.5.10 – вирусология.

В процессе ознакомления с диссертационной работой возник следующий вопрос:

- в работе были исследованы подкожный и интраназальный способы введения вакцины животным. Какой способ планируется исследовать в клинических исследованиях?

К работе Шуклиной М.А. имеются следующие замечания:

1. Надписи на рисунках, представленных в литературном обзоре, не переведены на русский язык.
2. Не совсем корректно была сформулирована цель исследования, так как «механизм иммуногенности» в настоящей работе не исследовался.
3. В некоторых выводах отсутствует конкретика. Например, в выводе 4 не указано какой процент защиты обеспечивают интраназальный и парентеральный способы введения рекомбинантных белков.

Также можно рекомендовать в дальнейших исследованиях изучить механизмы, которые обеспечивают защиту против вируса гриппа ненейтрализующих антител, которые вырабатываются на вводимые рекомбинантные белки.

Указанные замечания не носят принципиального характера и не снижают общую положительную оценку диссертационной работы Шуклиной М.А.

Заключение

Диссертационная работа Шуклиной Марины Александровны на тему «Иммуногенность и кросс-протективность химерных белков, включающих консервативные участки гемагглютинаина, нуклеопротеина и белка М2 вирусов гриппа А», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. - вирусология, является законченным научным трудом, в котором, на основании выполненных автором исследований в определенной автором области дизайна рекомбинантных белков, несущих консервативные участки антигенов вируса гриппа, и изучения их иммуногенности и протективной активности была разработана кандидатная рекомбинантная противогриппозная вакцина. По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Шуклиной Марины Александровны полностью отвечает требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в соответствии с Постановлениями Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 26.05.2020 № 751, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539, от 26.09.2022 г. № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 №415, 26.10.2023 №1786, от 25.01.2024 №62, от 16.10.2024 № 1382), установленным для диссертаций 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 (биологические науки).

Официальный оппонент:

заведующий лаборатории молекулярной биотехнологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.18

Телефон: +7 (495) 193-61-35,

e-mail: mshmarov@gamaleya.org

доктор биологических наук

«14» ноября 2025 года

Максим Михайлович Шмаров

Подпись Максима Михайловича Шмарова заверяю:

Ученый секретарь федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства Здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.18

Телефон: +7 (499) 193-71-71,

e-mail: sysoliatina@gamaleya.org

кандидат биологических наук

«14» ноября 2025 года



Елена Владимировна Сысолятина