



Федеральное государственное
бюджетное учреждение
**«Научно-исследовательский институт
гриппа имени А.А. Смородинцева»**
Министерства здравоохранения
Российской Федерации
(ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева»
Минздрава России)

Почтовый адрес: ул. Профессора Попова,
д. 15/17, Санкт-Петербург, Россия, 197022
Тел./факс: +7 (812) 499-15-00
e-mail: office@influenza.spb.fu
http://www.influenza.spb.ru

ОКПО 01898003 ОГРН 1027806881827
ИНН/КПП 7813045650/781301001

27.04.2024 № 401

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБУ «НИИ гриппа
им. А.А. Смородинцева»
Минздрава России,
доктор медицинских наук

Дмитрий Анатольевич Лиознов



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Шарabrina Сергея Валерьевича «Разработка
экспериментальных мРНК-вакцин против гриппа и COVID-19»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология

Актуальность темы исследования

Среди всех респираторных вирусов человека наибольшей эпидемиологической и клинической значимостью, а также пандемическим потенциалом обладают вирусы гриппа и коронавирусы. Пандемия COVID-19 наглядно продемонстрировала недостаточную готовность человечества к появлению новых вирусных инфекционных агентов. Наиболее эффективным способом предотвращения распространения респираторных вирусов, в том числе в случае пандемии, является вакцинация. Однако по причине появления ускользающих от иммунного ответа вариантов SARS-CoV-2 и дрейф-вариантов вирусов гриппа А и В существующие вакцины для профилактики

COVID-19 и гриппа часто оказываются недостаточно эффективными, что требует разработки вакцин нового поколения с более широкой и долговременной защитой. Пандемия COVID-19 стимулировала во всем мире разработку целого ряда вакцин, в том числе инактивированных, рекомбинантных белковых, векторных, а также мРНК-вакцин. Среди всех вакцинных платформ мРНК-вакцины продемонстрировали свои неоспоримые преимущества с точки зрения скорости реагирования на возникающие и повторно возникающие вирусные инфекции, а также эффективности стимулирования как гуморального, так и клеточного иммунных ответов. Важным преимуществом мРНК вакцин то, что в процессе их производства не используются инфекционные частицы, а дизайн проводится исключительно на основе генетической последовательности патогена. Вместе с тем, несмотря на достигнуты результаты, сама технология мРНК вакцин является достаточно новой и требует дальнейшего изучения и совершенствования.

Таким образом, актуальность и практическая значимость темы диссертационной работы С.В. Шарабрина, связанной с разработкой мРНК вакцин, с одной стороны, и новых вакцин против гриппа и COVID-19, с другой стороны, не вызывают никаких сомнений.

Научная новизна, обоснованность и достоверность выносимых на защиту положений, научных выводов, рекомендаций и заключений, сформулированных в диссертации

В рамках проведенного исследования разработана оригинальная методика получения мРНК, включающая проходящие в одну стадию реакции *in vitro* транскрипции, ко-транскрипционного кэпирования с добавлением AG-Cap аналога и неферментативного матричного полиаденилирования. Важно отметить, что методика предполагает использование отечественных реагентов. Сравнение разработанной методики с пост-транскрипционным методом синтеза мРНК с использованием коммерческих наборов зарубежного производства показала сопоставимую эффективность трансляции белка в

тестах на клеточной культуре с использованием мРНК, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP).

Был проведен выбор нетранслируемых областей (НТО) мРНК на основе известных последовательностей высоко экспрессируемых генов α -глобина, β -глобина, альфа цепи цитохрома b-245 (CYBA) и химерной последовательности, разработанной компанией Moderna. С использованием нескольких комбинаций НТО были созданы три плазмиды, содержащие несколько вариантов последовательности НТО и позволяющие проводить клонирование различных целевых генов, для получения ДНК-матриц для *in vitro* транскрипции. Важной для снижения неспецифической иммуногенности и масштабируемости стадией получения вакцинных мРНК является очистка мРНК от примесей двунитевой РНК. С целью решения данной проблемы была разработана оригинальная методика очистки синтезированной мРНК с использованием целлюлозы, которую по мнению автора можно легко и экономически эффективно масштабировать.

Разработанная методика была использована для получения двух экспериментальных вакцинных мРНК, кодирующих гемагглютинин вируса гриппа А/Н1N1 и RBD SARS-CoV-2. Для обоих препаратов была показана способность стимулировать формирование специфического гуморального и клеточного иммунного ответа, а также протективность экспериментальных моделях инфекций на лабораторных животных.

В отличие от наиболее распространенного метода доставки мРНК на основе липидных наночастиц в работе был использован альтернативный подход – метод струйной инъекции. К сожалению, в работе этому было уделено мало внимания, хотя с точки зрения научной новизны – это один из самых интересных результатов.

В целом, используемые в работе подходы к синтезу мРНК и дизайну вакцинных мРНК против SARS-CoV-2 и вируса гриппа А не являются принципиально новыми, однако используемая авторами в работе комбинация этих подходов, включающая различные приёмы к оптимизации процесса

получения и очистки мРНК, безусловно, является оригинальной.

Результаты получены с использованием современных методов, молекулярной биологии, генной инженерии и иммунологии. Для оценки достоверности полученных данных автором применены адекватные статистические модели. Обоснованность и достоверность выдвигаемых на защиту положений не вызывает сомнений.

Достоверность полученных результатов подтверждается 6 публикациями в отечественных и зарубежных журналах. По результатам выполнения работы получен патент на плазмиду, кодирующую вакцинную мРНК RBD SARS-CoV-2.

Структура и общая характеристика диссертационной работы

Диссертация С.В. Шарабрина построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Текст диссертации изложен на 119 страницах, включает 46 рисунков и 5 таблиц. Список литературы включает 210 источников.

В разделе «Введение» определена актуальность темы исследования, обозначены научная новизна и практическая значимость работы, а также представлены цель и задачи исследования и выносимые на защиту положения.

В главе «Обзор литературы» представлена информация о строении вирусов гриппа и SARS-CoV-2; приведены данные об истории создания вакцин против гриппа и COVID-19, применяемых в настоящее время в мире вакцинах против этих инфекций, а также существующих проблемах в области конструирования вакцин и перспективах их решения. В достаточной мере подробно описаны структура вакцинных мРНК, методы их получения, методы проведения мРНК вакцинации и сведения о мРНК вакцинах против гриппа и COVID-19. Представленные в обзоре литературы сведения необходимы и достаточны для понимания сути диссертационной работы. К сожалению, данная глава изобилует большим количеством пунктуационных ошибок,

опечаток и лексических несоответствий. Особенно это касается разделов 1.1-1.6. Сложилось впечатление, что эти разделы писались автором в последнюю очередь и не были отредактированы и внимательно вычитаны, так как последующие разделы и главы написаны значительно лучше.

В главе «Материалы и методы» описаны использованные в работе генно-инженерные методы получения плазмидных ДНК, методы получения, очистки и анализа мРНК, методы работы с клеточными культурами, а также методы оценки иммуногенности и протективности вакцин *in vivo*. Все методы, в том числе и статистические, являются современными и адекватными поставленным задачам.

В главе «Результаты и их обсуждение» детально отражены результаты, полученные в работе, и проведены их анализ и интерпретация. В разделе 3.1 описано конструирование ДНК-матриц для синтеза мРНК. В частности, обоснован выбор метода ко-транскрипционного кэпирования и получения полиаденилированных молекул мРНК и последовательностей НТО, проведен компьютерный анализ вторичной структуры РНК НТО. Полученные векторы были далее использованы для создания экспериментальных мРНК вакцин. В разделе 3.2 описан метод очистки мРНК от примесей дцРНК и продемонстрирована его эффективность *in vitro* и *in vivo*. В разделе 3.3. представлена разработка экспериментальной мРНК вакцины против вируса гриппа А (мРНК-С3-Н1) на основе последовательности гемагглютинаина штамма A/California/4/2009(H1N1_{pdm09}). Для мРНК-С3-Н1 была показана эффективная трансляция в клетках НЕК-293, а также способность индуцировать специфический антительный и Т-клеточный иммунный ответ. Защитное действие разработанной мРНК-вакцины было изучено при интраназальном заражении мышей летальной дозой вируса A/California/4/2009(H1N1_{pdm09}). В качестве препарата сравнения была выбрана зарегистрированная в России вакцина против гриппа ФЛЮ-М. В разделе 3.4. представлена разработка экспериментальной мРНК вакцины против COVID-19 на основе RBD S белка вируса Wuhan-Hu-1 (мРНК-С1-RBD). Аналогично

предыдущему разделу работы было показано формирование вирус-нейтрализующих антител и Т-клеточного ответа. На мышинной нелетальной модели было показано снижение вирусной нагрузки в тканях легких иммунизированных мышей BALB/c на 4-е сутки после инфицирования вирусом hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021.

В заключении автором кратко обобщены полученные результаты и обсуждены перспективы дальнейшего развития как самой технологии, так и полученных рекомбинантных белков. Переход к выводам логически обоснован.

Положения, выносимые на защиту, и выводы полностью соответствуют поставленным задачам и полученным данным. Автореферат соответствует содержанию и выводам диссертации, оформлен в традиционном стиле и соответствует установленным требованиям.

Значение полученных соискателем результатов исследования для развития соответствующей отрасли науки

Проведенные С.В. Шарабриным исследования и полученные научные результаты, обладают безусловной важностью для развития молекулярно-биологического направления, связанного с разработкой вакцинных и терапевтических препаратов на основе мРНК. Полученные в диссертационном исследовании результаты подтверждают принципиальную возможность использования выбранного подхода для создания мРНК вакцин против гриппа и COVID-19. Хотя следует отметить, что при дизайне экспериментальных вакцин были использованы известные «прямолинейные» подходы на основе гемагглютинаина без трансмембранного домена и RBD S белка со всеми присущими им недостатками. Впрочем, перед автором не стояло задачи оригинального дизайна антигенов. Полученные в работе научные данные имеют важное практическое значение для разработки новых вакцин на основе мРНК, а также вносят вклад в понимание фундаментальных механизмов их действия.

Рекомендации по использованию результатов и выводов, приведенных в диссертации

Разработка мРНК вакцин в настоящее время ведется во всех ведущих странах мирах, обладающих собственной иммунобиологической промышленностью. К сожалению, в нашей стране направление мРНК вакцин развивается пока не столь активно, хотя целый ряд ведущих научных организаций, в том числе на базе которой выполнялось исследование, начали их разработку. Учитывая вышесказанное, результаты работы имеют важное прикладное значение и могут быть использованы для разработки нового поколения вакцин против гриппа и COVID-19. Разработанные методы и подходы, в частности методы получения и очистки мРНК могут быть в дальнейшем применены в процессах опытно-промышленного производства мРНК вакцин на базе профильных научных организаций или биотехнологических компаний

Замечания и вопросы

1. В части работы, где проводилось сравнение различных нетранслируемых областей мРНК, эффективность трансляции зеленого флуоресцентного белка оценивалась методом проточной цитофлуориметрии по изменению процента светящихся клеток. Как вы можете объяснить их увеличение при использовании более эффективных нетранслируемых областей? Логичным кажется увеличение интенсивности флуоресценции клеток в целом при усилении экспрессии, в то время как число флуоресцентно светящихся клеток может и не изменяться (или изменяться не сильно), так как на этот параметр больше должен влиять используемый для внутриклеточной доставки мРНК носитель.
2. Несмотря на достоверное снижение уровня секреции IFN- α , на рисунках 30Б и 30В нет достоверных отличий в проценте CD4(+) и CD8(+) клеток, соответственно, между мРНК до и после очистки. С чем вы связываете

- такой результат? Считает ли вы целесообразным оценку уровня цитокинов (IL-2, IL-4, IL-12, IFN- γ) для объяснения такого результата?
3. В отличие от наиболее распространенного метода доставки мРНК на основе липидных наночастиц в работе был использован альтернативный подход – метод струйной инъекции. К сожалению, в работе этому было уделено мало внимания. Проводилось ли сравнение данных методов между собой?
 4. Как вы считаете, насколько критично, что у 2 мышей из 6 не выработалось нейтрализующих антител к вирусу гриппа после двукратной иммунизации мРНК, кодирующей гемагглютинин (рис. 36)? Может ли это повлиять в перспективе на применимость разрабатываемой мРНК-вакцины против гриппа и как?
 5. Для оценки протективности препарата мРНК-C1-RBD использовали лабораторных мышей BALB/c. Насколько известно, для моделирования коронавирусной инфекции используют специальные линии мышей или хомяков. Насколько релевантна использованная в работе модель?
 6. В завершении раздела 3.4 приведено сравнение иммуногенности экспериментальной мРНК-вакцины мРНК-C1-RBD с актуальными вакцинами на модели мышей. Данное сравнение является условным, так как провести прямое сравнение титров от разных вакцин в разных экспериментальных условиях практически невозможно. Более того, из текста непонятно даже, о каких линиях SARS-CoV-2 идет речь.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования.

Заключение

Диссертационная работа Шарабрина Сергея Валерьевича на тему «Разработка экспериментальных мРНК-вакцин против гриппа и COVID-19» по актуальности, объему проведенных исследований, методическому уровню,

научной ценности и практической значимости отвечает критериям, установленным п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (в действующей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям, поскольку является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных соискателем исследований была разработана лабораторная методика получения вакцинных мРНК, успешно примененная для получения и очистки экспериментальных вакцинных мРНК, способных оказывать протективный эффект *in vivo* в отношении гриппа и COVID-19, а ее автор, Шарабрин Сергей Валерьевич, заслуживает присуждения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Диссертация обсуждена на заседании Отдела молекулярной биологии вирусов (протокол №1 от 23 апреля 2024 г.) и отзыв на диссертацию одобрен на заседании Ученого Совета ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (протокол № 4 от 25 апреля 2024 г.).

Заведующий Отделом молекулярной биологии вирусов
ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева»
Минздрава России,
д.б.н., профессор РАН



Андрей Владимирович Васин

Подпись Васина А.В. заверяю:

Ученый Секретарь ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, к.м.н. Лобова Т.Г.



«27» апреля 2024 г.

Сведения о ведущей организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

улица Профессора Попова, 15/17, Санкт-Петербург

www.influenza.spb.ru

Тел.: 8(812)4991500

E-mail: office@influenza.spb.ru