

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
**«Федеральный научный центр исследований  
и разработки иммунобиологических препаратов  
им. М.П. Чумакова РАН»  
(ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»)**

---

поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, город Москва, 108819  
Тел. (495) 841–90–02, Факс (495) 841–93–21, 549–67–60. E-mail: [sue\\_polio@chumakovs.ru](mailto:sue_polio@chumakovs.ru), [www.chumakovs.ru](http://www.chumakovs.ru)  
ОКПО 01895045, ОГРН 1167746624847, ИНН/КПП 7751023847/775101001

---

## ОТЗЫВ

Официального оппонента на диссертационную работу Исаковой-Сивак Ирины Николаевны «молекулярно-генетические подходы к оптимизации живой гриппозной вакцины», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02. – вирусология в диссертационный совет Д 001.043.01 при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева»

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

Ежегодные эпидемии гриппа вызывают от 3 до 5 миллионов случаев тяжелых респираторных заболеваний, до 650 тысяч из которых заканчиваются летальным исходом [WHO 2017]. Наиболее эффективным средством борьбы с гриппом является вакцинация, основной целью которой является снижение заболеваемости и предотвращение тяжелых случаев заболевания гриппом и его осложнений. Среди большого разнообразия гриппозных вакцин, применяющихся в практике здравоохранения, а также находящихся на различных стадиях разработки, особое место занимает живая гриппозная вакцина (ЖГВ), разработанная впервые в мире в Российской Федерации и зарегистрированная в 1987 году, тогда как аналогичная американская ЖГВ была зарегистрирована только в 2003 году. В настоящее время для подготовки реассортантных вакцинных штаммов для ЖГВ в России используется хорошо охарактеризованный безвредный для людей холодоадаптированный донора аттенуации – штамм А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) [Лен/17].

Для подготовки вакцинных штаммов для инактивированной гриппозной вакцины в качестве донора высокой урожайности во всем мире используется модельный вирус А/PR/8/34 (H1N1) [PR8], характеризующийся высокой репродуктивной активностью в развивающихся куриных эмбрионах. Это обуславливает целесообразность разработки единого, универсального донорского штамма, подходящего для создания реассортантных штаммов как для живых, так и для инактивированных гриппозных вакцин, поскольку при возникновении чрезвычайной ситуации (например, при наступлении пандемии) можно будет

один вакцинный штамм использовать как на производстве ЖГВ, так и на производстве ИГВ.

Помимо ежегодных эпидемий вирусы гриппа А могут вызывать пандемии в случае перехода в человеческую популяцию вирусов свиней или птиц (субтипы H5N1 и H7N9), либо в случае повторного заноса вирусов H2N2. В случае пандемии решающим фактором защиты становится скорость создания новых вакцинных штаммов. Превентивное конструирование вакцинных штаммов из потенциально пандемических вирусов гриппа H2N2, H5N1 и H7N9 представляется важной задачей. Надёжное понимание механизмов аттенуации вирусов – необходимая предпосылка для выполнения этой задачи. Ранние исследования определили роль мутантных генов донора Лен/17 в проявлении температурочувствительного, холодоадаптированного (ts/ca), а также аттенуированного (at) фенотипов у вакцинных штаммов ЖГВ, однако только в настоящем исследовании была определена роль каждой индивидуальной мутации в проявлении указанных признаков.

В работе И.Н.Исаковой-Сивак созданы препандемические штаммы H2N2, H5N1 и H7N9 вакцинн.

#### **Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, выносимых на защиту**

В работе на новом методическом уровне показана ведущая роль мутаций в двух полимеразных генах PB2 и PB1 в формировании температурочувствительного фенотипа донора аттенуации Лен/17. Показано, для полного восстановления дикого фенотипа вируса требуется реверсия четырех мутаций.

Разработан альтернативный холодоадаптированный донор аттенуации A/PR8/59/M2 (H1N1), обладающий чувствительностью к препаратам адамантанового ряда. Данный штамм может быть использован не только как донор аттенуации для подготовки живых гриппозных вакцин, но и как донор высокой урожайности для подготовки вакцинных штаммов для инактивированной гриппозной вакцины типа А.

Разработана обратно-генетическая система для холодоадаптированного штамма А/Ленинград/134/17/57 – отечественного донора аттенуации для живой гриппозной вакцины, позволяющая целенаправленно получать вакцинные штаммы ЖГВ любыми заранее заданными свойствами.

Впервые подготовлены реассортантные штаммы живой гриппозной вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа А(H2N2), А(H5N1) и А(H7N9), с использованием модифицированных методик реассортации и методов обратной генетики. Всесторонняя характеристика полученных вакцинных штаммов в доклинических исследованиях подтвердила их безвредность,



иммуногенность и защитную эффективность, свойственные классическим вакцинным штаммам ЖГВ.

Впервые проведены клинические исследования ЖГВ подтипов А(Н2N2) и А(Н7N9), подтвердивших безвредность, хорошую переносимость, приживляемость и высокую иммуногенность этих вакцин для взрослых здоровых добровольцев.

Впервые доказана более выраженная защита, обеспечиваемая живой гриппозной вакциной, перед инактивированной, при заражении иммунизированных хорьков гетерологичным высокопатогенным вирусом гриппа А(Н5N1). Показана безвредность полученных штаммов для кур.

Впервые представлены убедительные свидетельства значительных отличий в составе иммунодоминантных эпитопов для цитотоксических Т лимфоцитов (ЦТЛ), расположенных в молекулах нуклеопротеина донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 и современных 9 циркулирующих вирусов гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2. Показано, что живые вакцины с формулой генома 6:2 индуцируют мощный Т-клеточный иммунный ответ на устаревшие эпитопы NP, который слабо реагирует с современными вирусами гриппа А. Предложена стратегия усиления ЦТЛ-иммунного ответа на вакцинацию живыми гриппозными вакцинами путем внесения в геном вакцинных реассортантов NP гена от современного циркулирующего вируса (т.е. подготовка ЖГВ с формулой генома 5:3). Детальные сравнительные эксперименты вакцинных штаммов ЖГВ с формулами генома 6:2 и 5:3 на различных моделях животных показали перспективность данной стратегии для усиления перекрестно-реагирующего Т-клеточного иммунного ответа на ЖГВ.

Впервые апробирована стратегия усиления выработки кросс-реактивных антител, нацеленных на консервативный участок молекулы гемагглютинаина, путем конструирования вакцинных штаммов ЖГВ, несущих химерные молекулы HA (содержат идентичный stalk-домен от вируса Н1N1, а глобулярные части – от различных антигенно-неродственных вирусов гриппа подтипов Н5N1, Н8N4, Н9N2).

### **Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов и рекомендаций.**

Достоверность проведенных исследований основана на большом материале исследования и подтверждена адекватным статистическим анализом данных. В работе применены современные методы вирусологии, молекулярной биологии и обратной генетики. Роль мутаций в полимеразных генах PB2 и PB1 в формировании температурочувствительного фенотипа донора аттенуации исследована в четырёх системах с совпадающим результатом. Положения, выно-

симые на защиту, а также выводы и практические рекомендации подкреплены большим массивом фактического материала, представленного в 84 рисунках, 52 таблицах и Приложении. Все полученные в ходе исследования экспериментальные данные подвергались тщательному статистическому анализу с использованием различных критериев описательной и аналитической статистики.

### **Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации**

В результате выполнения данного исследования был решен ряд задач фундаментального характера. В частности, оценен вклад индивидуальных мутаций в генах донора аттенуации Лен/17 в проявление таких его биологических свойств, как температурочувствительность и аттенуация для лабораторных животных.

Важным результатом диссертационной работы является разработка обратно-генетической системы для холодоадаптированного штамма А/Ленинград/134/17/57 – отечественного донора аттенуации для живой гриппозной вакцины, позволяющей получать вакцинные штаммы ЖГВ целиком из плазмидных ДНК, несущих все гены вируса. Успешная апробация данной системы на примере создания безопасных, иммуногенных и эффективных вакцинных штаммов против высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 и H7N9 открыла перспективы целенаправленного конструирования вакцинных штаммов ЖГВ с любыми заранее заданными свойствами. Кроме того, такая система позволит конструировать рекомбинантные векторные вакцины на платформе живых гриппозных вакцин для защиты от различных вирусных и бактериальных инфекций.

Разработанный в настоящем исследовании альтернативный донор аттенуации А/PR/8/59/M2 (H1N1) может быть использован для подготовки безопасных вакцинных штаммов для живой гриппозной вакцины, а также высокоурожайных штаммов для инактивированной гриппозной вакцины. Использование единого вакцинного штамма для производства и ЖГВ, и ИГВ особенно важно в случае наступления пандемии, поскольку позволит избежать задержки начала производства в чрезвычайной ситуации. Высокая урожайность вакцинных вирусов позволит нарабатывать большие объемы вакцины в более короткие сроки.

Большую практическую ценность представляет создание и проведение полного цикла доклинических и клинических исследований кандидатных вакцинных штаммов против потенциально-пандемических вирусов гриппа подтипов H2N2 и H7N9, которые пополнили Национальную коллекцию вакцинных штаммов для производства пандемических вакцин.



Представленный в диссертационном исследовании оригинальный способ индукции перекрестно-реагирующих антител, направленных на консервативный участок молекулы гемагглютинина вирусов гриппа, открывает перспективы конструирования универсальной гриппозной вакцины, способной обеспечить защиту от различных подтипов вируса гриппа А.

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

Материалы работы были представлены в 23 докладах научных конференциях и симпозиумах: «Universal influenza vaccines» (Lausanne, Switzerland, 2018); «2nd International Meetings on Respiratory Pathogens» (Singapore, 2018); «The Sixth European Influenza Conference. ESWI» (Riga, Latvia, 2017); «International Conference on Cancer and Infectious Diseases» (Madrid, Spain, 2017); «Options for the Control of Influenza IX» (Chicago, USA, 2016); «7th Orthomyxovirus Research Conference» (Toulouse, France, 2015); «2015 Keystone Symposia Conference» (Breckenridge, USA, 2015); «The Fourth European Influenza Conference. ESWI» (Riga, Latvia, 2014); «Options for the Control of Influenza VIII» (Cape Town, South Africa, 2013); Совещании специалистов Всемирной Организации Здравоохранения «The First WHO integrated meeting on development and clinical trials of influenza vaccines that induce broadly protective and long-lasting immune responses» (Hong Kong SAR, China, 2013); «Influenza Vaccines for the World» (Valencia, Spain, 2012); «The Fourth European Influenza Conference. ESWI» (Malta, 2011); «Options for the Control of Influenza VII» (Hong Kong SAR, China, 2010); Всероссийской научной конференции с международным участием «Неделя науки СПбПУ» (Санкт-Петербург, 2017); Международной конференции «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2013); цикле научных конференций молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего

По теме диссертации опубликовано 55 научных работ, из них 33 научные статьи (27 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 24 – в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования) и 22 тезиса международных и отечественных научных конференций. Получено 3 патента на изобретения РФ.

### **Объем и структура диссертации.**

Диссертационная работа содержит введение, основную часть, включающую обзор литературы, материалы и методы исследования, шесть глав собственных исследований, обсуждение, заключение, выводы, приложения и список литературы. Работа изложена на 301 странице машинописного текста.

Включает 50 таблиц, 82 рисунка и приложение. Список цитируемой литературы включает 567 источников, из них 32 отечественных.

### **Рекомендации по использованию результатов диссертации**

Штаммы A/17/Калифорния/66/4412 (H2N2), A/17/Токио/67/912 (H2N2) и A/17/Ануи/2013/61 (H7N9), депонированные в коллекции Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, в случае возникновения соответствующей пандемии, могут немедленно быть использованы для производства вакцин.

Штаммы, сконструированные на основе высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 и H7N9 методами геной инженерии, детально охарактеризованы в доклинических исследованиях, что является основанием для проведения первой фазы клинических испытаний на волонтерах экспериментальных серий ЖГВ из данных штаммов.

Обобщая все вышесказанное, полученные в ходе диссертационного исследования научные данные могут быть использованы в практике здравоохранения для производства более эффективных гриппозных вакцин, что будет способствовать сохранению здоровья населения, снижению заболеваемости и смертности от гриппа и его осложнений.

### **Замечания**

При чтении работы Исаковой-Сивак Ирины Николаевны иногда возникает желание подискутировать. В особенности это касается обзора литературы. Ирина Николаевна цитирует работы и приводит выводы, сделанные авторами этих работ, как установленный научный факт, даже в тех случаях, когда есть данные, противоречащие этим выводам.

Так, на стр. 23 цитируются работы [89, 115, 552], утверждающие, что «белок PB1-F2, является фактором патогенности вируса гриппа». Однако это утверждение явно неверно в общем виде, так как PB1-F2 транслируется у всех непатогенных вирусов диких птиц, а введение рамки считывания этого белка в пандемический вирус H1N1 не повышало его патогенности.

При цитировании работы [541], говорится о вирусе A/goose/Guangdong/1/1996 (H5N1), как о «циркулирующем среди диких водоплавающих птиц». Однако данный вирус был выделен от домашнего гуся.

На стр. 56 цитируется работа [454], где утверждается, что «удаление полиосновного сайта из молекулы HA, переводит вирус в апатогенную форму». Однако некоторые реассортанты PR8/34 x H5N1 с удалённым полиосновным сайтом HA по патогенности для мышей близки к нативным H5N1 вирусам.

Приведенные выше замечания носят частный характер и не влияют на общую положительную оценку работы.



### Заключение

В работе Исаковой-Сивак Ирины Николаевны «молекулярно-генетические подходы к оптимизации живой гриппозной вакцины» была продемонстрирована принципиальная возможность целенаправленной модификации генома вакцинных штаммов ЖГВ с целью усиления кросспротективных свойств. Были предложены оригинальные способы индукции перекрестно-реагирующего гуморального и Т-клеточного иммунного ответа, которые открывают перспективы конструирования универсальной гриппозной вакцины, способной обеспечить защиту от различных подтипов вируса гриппа А. Разработанная система для целенаправленного получения вакцинных штаммов ЖГВ с любыми заранее заданными свойствами позволит конструировать рекомбинантные векторные вакцины на платформе живых гриппозных вакцин для защиты населения от различных вирусных и бактериальных инфекций.

Таким образом, диссертация Исаковой-Сивак Ирины Николаевны является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение, а так же решена научная проблема, имеющая важное практическое значение, что соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» утверждённых Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02. – вирусология.

Официальный оппонент

Д.б.н., заведующая лабораторией молекулярной биологии вирусов гриппа ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»



/А.С.Гамбарян/

Подпись А.С. Гамбарян удостоверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»

А.В.Белякова

