

**Отзыв официального оппонента В.В. Зверева
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**

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.

Вирусы гриппа являются опасными контагиозными респираторными патогенами, представляющими постоянную угрозу мировому сообществу. Огромный социально-экономический ущерб, наносимый ежегодными эпидемиями гриппа, как развивающимся странам, так и экономически более благоприятным регионам мира, в большой степени обусловлен высокой степенью антигенной изменчивости возбудителя. Несмотря на общепризнанное положительное влияние мер специфической вакцинопрофилактики на снижение уровня заболеваемости и предотвращение тяжелых случаев заболевания гриппом, эффективность вакцинации до сих пор сильно зависит от соответствия циркулирующих эпидемических вирусов вакцинным штаммам.

Среди большого разнообразия гриппозных вакцин, применяющихся на сегодняшний день в практике здравоохранения, живая гриппозная вакцина (ЖГВ) рассматривается как наиболее перспективная мера борьбы с гриппом. ЖГВ имеет ряд неоспоримых преимуществ по сравнению с инактивированной гриппозной вакциной (ИГВ), наиболее важным из которых является безболезненный интраназальный способ введения, обеспечивающий формирование всех звеньев адаптивного иммунного ответа во входных воротах инфекции. Как результат, живые вакцины вызывают образование коллективного иммунитета, а также способны защищать от дрейфовых вариантов вируса гриппа.

В настоящее время для подготовки реассортантных вакцинных штаммов для ЖГВ типа А в России используется хорошо охарактеризованный безвредный для людей холодоадаптированный донор аттенуации – штамм А/Ленинград/134/17/57 (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 (PR8), характеризующийся высокой репродуктивной активностью в развивающихся куриных эмбрионах. Однако целесообразно наличие единого, универсального донорского штамма, подходящего для создания реассортантных штаммов и для живых, 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. Важно также отметить, что для отечественной ЖГВ весь процесс от получения вакцинных штаммов до выпуска препарата основан полностью на российской технологии, тогда как вакцинные штаммы для производства ИГВ получают из-за рубежа, что чрезвычайно опасно в случае пандемии, т.к. существует угроза задержки начала производства вакцины.

Несмотря на то, что в настоящее время существует большое разнообразие сезонных гриппозных вакцин, их общим недостатком является узкая специфичность, необходимость ежегодного обновления штаммового состава, не всегда удовлетворительная иммуногенность и эффективность. Кроме того, сезонные гриппозные вакцины не способны обеспечить защиту от вновь возникающих пандемических вариантов вируса.

В связи с вышеизложенным, актуальность диссертационной работы И.Н. Исаковой-Сивак, посвященной разработке подходов к повышению эффективности сезонных и созданию пандемических живых гриппозных вакцин, не вызывает сомнений. Обширный спектр адаптивного иммунного ответа, формируемый живыми гриппозными вакцинами, делает эту платформу весьма перспективной основой для разработки высокоэффективной вакцины, способной защищать людей от широкого спектра вирусов гриппа.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ обусловлена применением комплексного подхода к решению поставленных автором задач, используя самые современные представления о биологической природе вирусов гриппа, их молекулярно-генетических характеристиках, а также тонкостях развития адаптивного иммунного ответа организма на иммунизацию живыми гриппозными вакцинами.

В работе впервые использовались генно-инженерные методы для целенаправленной корректировки биологических свойств разработанного ранее перспективного холодадаптированного штамма на основе вируса PR8. Внесение мутаций, отвечающих за чувствительность вируса к препаратам адамантанового ряда, обеспечило возможность его применения в качестве донора аттенуации для подготовки живых гриппозных вакцин, а также донора высокой урожайности для подготовки инактивированных гриппозных вакцин.

В исследовании И.Н. Исаковой-Сивак впервые были использованы методы обратной генетики для подготовки вакцинных штаммов ЖГВ на основе отечественного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57. Разработанная автором обратно-генетическая

система для этого штамма не только позволила получать вакцинные штаммы ЖГВ с любыми заранее заданными свойствами (в том числе против высокопатогенных вирусов гриппа птиц), но также открыла возможность детального изучения индивидуальных мутаций, свойственных донору Лен/17. Так, на новом методическом уровне показана ведущая роль мутаций в двух полимеразных генах PB2 и PB1 в формировании температурочувствительного фенотипа донора аттенуации Лен/17, а для полного восстановления дикого фенотипа вируса потребовалась одновременная реверсия четырех мутаций в вакцинном штамме ЖГВ. Данное обстоятельство с новой точки зрения подтвердило высокую степень генетической стабильности вакцинных штаммов ЖГВ.

В настоящем исследовании впервые были предложены стратегии для усиления индукции перекрестно-реагирующих факторов иммунного ответа на иммунизацию живыми гриппозными вакцинами, используя самые современные генно-инженерные и иммуногенетические подходы. Впервые была опробована перспективная стратегия усиленной индукции кросс-реактивных антител, нацеленных на консервативный участок молекулы гемагглютинина (stalk-домен), путем последовательной иммунизации вакцинными штаммами ЖГВ, несущими химерные молекулы гемагглютинина. Кроме того, в работе убедительно демонстрируется необходимость оптимизации состава Т-клеточных эпитопов молекулы нуклеопротеина вакцинных штаммов ЖГВ для усиленной индукции кросс-реактивных цитотоксических Т лимфоцитов (ЦТЛ). Автором предложен наиболее простой способ повышения кросс-реактивности ЦТЛ-иммунного ответа на вакцинацию путем конструирования вакцинных штаммов с формулой генома 5:3, т.е. включением в состав вакцинных реассортантов NP гена от современного циркулирующего вируса. Комбинация двух указанных подходов, действительно, является новой перспективной стратегией для конструирования универсальной живой гриппозной вакцины, обеспечивающей перекрестную защиту от вирусов гриппа А различных подтипов.

ЗНАЧЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЛЯ НАУКИ И ПРАКТИКИ.

Разработанный в настоящем исследовании альтернативный донор аттенуации подтипа А(H1N1) может быть использован для подготовки безопасных вакцинных штаммов для живой гриппозной вакцины, а также высокорепродуктивных 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.

В ходе выполнения диссертационного исследования были охарактеризованы роли различных мутаций в полимеразных генах вируса гриппа, влияющих на его аттенуацию, исследованы конкретные положения, влияющие на проявление *ts*-фенотипа. В работе была показана универсальность таких мутаций – внесение их в геном антигенно удаленного вирулентного вируса гриппа приводит к формированию у него *ts/att*-фенотипов, что представляет высокую значимость как для практического применения, так и для фундаментальной науки в целом.

Диссертация И.Н. Исаковой-Сивак имеет существенное практическое значение, поскольку в работе делается ряд практических замечаний о необходимости рассмотрения свойств поверхностных антигенов вируса гриппа и их модификации при создании новых, более эффективных гриппозных вакцин. Также в работе приводятся данные полных доклинических исследований вакцинных штаммов ЖГВ против потенциально пандемических вирусов гриппа подтипов H2N2, H5N1 и H7N9 – наиболее вероятных возбудителей будущих пандемий. Для ЖГВ подтипов H2N2 и H7N9 была проведена также первая фаза клинических испытаний на добровольцах, что позволило включить данные штаммы в отечественный резерв вакцин к потенциально пандемическим вирусам гриппа. Отдельно стоит выделить значимость показанной автором принципиальной возможности целенаправленной модификации генома вакцинных штаммов ЖГВ генно-инженерными методами, что открывает перспективы конструирования рекомбинантных векторных вакцин против широкого круга инфекционных заболеваний, используя платформу живых гриппозных вакцин в качестве вирусного вектора.

Новый донор аттенуации и вакцинные штаммы ЖГВ, полученные в ходе диссертационного исследования, депонированы в Государственной коллекции Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и в коллекции Института вирусологии им. Д.И. Ивановского.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ. Работа оформлена в соответствии с требованиями ГОСТ Р 7.0.11-2011 к структуре и правилам оформления диссертаций и содержит введение, основную часть, заключение, выводы, список сокращений и список литературы. Основная часть включает обзор литературы, материалы и методы исследований, шесть глав собственных исследований и их обсуждение. Диссертация изложена на 301 странице машинописного текста, иллюстрирована 50 таблицами, 82 рисунками, содержит 4 приложения. Список цитируемой литературы включает 567 отечественных и зарубежных источников.

Во введении отмечена актуальность темы, поставлена цель исследования, а для ее достижения сформулированы 8 конкретных задач. В данном разделе также отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту, а также степень достоверности и апробация результатов исследования.

Обзор литературы состоит из четырех глав, грамотно структурированных для введения читателя в суть проблемы: представлены последние данные о структуре и эволюционной изменчивости вирусов гриппа А, обобщены сведения о современных вакцинах для профилактики сезонного гриппа, а также о разработках вакцин против потенциально пандемических вирусов гриппа. В обзоре приводится тщательный анализ перспективных разработок в области дизайна универсальных гриппозных вакцин. Свободное владение соответствующим материалом, представленным в литературе, подтверждается наличием цикла обзорных публикаций автора в авторитетном периодическом издании *Expert Review of Vaccines*.

В главе Материалы и методы исследования подробно излагаются как классические вирусологические и иммунологические методы работы, так и самые передовые методы биоинформатики и геномной инженерии. Кроме того, представлены методы работы с лабораторными животными, а также методы анализа данных, полученных в ходе проведения клинических испытаний новых пандемических вакцин на добровольцах. Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием ряда различных критериев, выбор которых полностью обоснован автором.

Результаты исследований включают шесть глав.

Первая глава собственных исследований посвящена разработке универсального донорского штамма, который можно использовать для подготовки как живых, так и инактивированных гриппозных вакцин. В качестве основы автор взял высокорепродуктивный холодоадаптированный штамм, разработанный ранее в Отделе вирусологии ИЭМ – А/PR8/59/1 (H1N1). Препятствием для его внедрения в практику для подготовки сезонных ЖГВ являлась устойчивость к химиопрепаратам адамантанового ряда (ремантадин, амантадин), ввиду наличия аминокислотных замен Val-27-Thr и Ser-31-Asn в М2 белке вируса. Для получения адамантан-чувствительного варианта методами геномной инженерии были внесены соответствующие мутации в данные позиции (Thr-27-Val и Asn-31-Ser), и, используя методы обратной генетики, был получен штамм, удовлетворяющий всем требованиям, предъявляемым к донорам аттенуации для живых гриппозных вакцин. Автором убедительно продемонстрировано, что модифицированный

штамм обладал не только признаками температурочувствительности, холодоадаптированности и аттенуации для лабораторных животных, но и высокорепродуктивным фенотипом. В ходе выполнения данной части работы также была установлена роль отдельных мутантных генов донора А/PR8/59/M2 (H1N1) в проявлении *ts/ca* фенотипов вирусов, что является важным заделом для планируемого в дальнейшем изучения роли индивидуальных мутаций в становлении данных признаков.

Вторая глава собственных исследований посвящена обоснованию безвредности и генетической стабильности отечественной ЖГВ, подготовленной на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57. Для этого автором была разработана обратного-генетическая система для этого вируса, позволяющая получать вакцинные штаммы ЖГВ целиком из плазмидных ДНК. Данная система позволила определить степень влияния каждой мутации донора Лен/17 в формировании его признака температурочувствительности и, как следствие – аттенуации. Впервые на новом методическом уровне удалось точно охарактеризовать панель мутантных вирусов, содержащих различные наборы замен в генах внутренних белков вирусов. В данной главе представлены убедительные данные о необходимости реверсии четырех *ts* мутаций в вакцинном штамме ЖГВ для полного восстановления дикого фенотипа вируса, что указывает на высокую степень безопасности живых гриппозных вакцин, поскольку одновременная реверсия этих четырех мутаций представляется крайне маловероятной. Кроме того, используя методы генной инженерии, автором продемонстрирован универсальный характер *ts* мутаций донора аттенуации Лен/17: при внесении данных мутаций в генетически удаленный вирус гриппа он приобретал температурочувствительный и аттенуированный фенотипы. Эти данные могут быть в дальнейшем использованы для рационального дизайна вакцинных штаммов на основе различных эпидемических и потенциально-пандемических вирусов гриппа А.

Третья глава собственных исследований посвящена подготовке и всесторонней характеристике ЖГВ против потенциально пандемических вирусов гриппа H2N2, вызвавших пандемию 1957 г., но не циркулировавших в человеческой популяции с 1968 г. Автором обоснован выбор двух антигенно отличных друг от друга эпидемических вирусов H2N2 для подготовки вакцинных кандидатов. Поскольку вирусы H2N2 имеют тот же подтип, что и донор аттенуации Лен/17, методика классической реассортации двух штаммов оказалась неэффективной при получении вакцинных кандидатов. Автором было предложено два альтернативных способа получения штаммов ЖГВ H2N2: применение разработанного в диссертационном исследовании модифицированного донора аттенуации А/PR8/59/M2 (H1N1), а также использование реассортантного вакцинного штамма

подтипа H1N1, подготовленного ранее на основе донора аттенуации Лен/17. Поскольку в обоих способах эпидемические штаммы H2N2 скрещивались с вирусами подтипа H1N1, методических трудностей при получении 6:2 реассортантных вакцинных штаммов удалось избежать. Сконструированные в данной главе четыре кандидатных штамма ЖГВ H2N2 были детально охарактеризованы *in vitro* и изучены на модели мышей. Одна пара штаммов – на основе донора Лен/17 – была также исследована на хорьках, где было показана более высокая иммуногенность и кросс-протективность ЖГВ из вируса А/Калифорния/1/66, в сравнении с ЖГВ из изолята А/Токио/3/67. Автор провел дополнительные эксперименты и установил взаимосвязь иммуногенности вакцинного вируса с ферментативной активностью его нейраминидазы. Эти данные важны не только с фундаментальной точки зрения, но и с практической, поскольку предоставляют достаточно простой инструмент для прогнозирования иммуногенности новых создаваемых штаммов ЖГВ. ЖГВ из реассортантного штамма А/17/Калифорния/66/395 (H2N2) успешно прошла первую фазу клинических испытаний на добровольцах и входит в настоящее время в отечественный резерв вакцин к потенциально пандемическим вирусам гриппа.

В четвертой главе собственных исследований описывается подготовка и всесторонняя характеристика ЖГВ против потенциально пандемических вирусов гриппа H7N9, впервые появившихся в циркуляции в 2013 году. Один из первых изолятов, штамм А/Ануи/1/2013 (H7N9) был гетерогенен по некоторым позициям молекулы гемагглютинина, и в работе тщательно проанализировано, какие именно аминокислоты в данных положениях являются предпочтительными в составе вакцинного штамма ЖГВ H7N9. Такой штамм был получен и всесторонне изучен в доклинических и клинических исследованиях. Положительные результаты этих исследований также позволили включить данный штамм в отечественный резерв вакцин к потенциально пандемическим вирусам гриппа.

Также в данной главе приводятся результаты конструирования экспериментального вакцинного штамма ЖГВ против высокопатогенного вируса гриппа H7N9, впервые обнаруженного в циркуляции в 2016 году. При этом в процессе конструирования был удален полиосновный кливедж-сайт молекулы гемагглютинина, чтобы сделать вирус апатогенным, а также была внесена мутация в ген нейраминидазы, чтобы сделать вирус чувствительным к ингибиторам нейраминидазы. Вакцинный штамм обладал всеми полезными свойствами, характеризующими реассортантные штаммы живой гриппозной вакцины, и результаты данных исследований явились основой для подготовки досье для

проведения первой фазы клинических испытаний на добровольцах нового штамма ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа H7N9.

Пятая глава собственных исследований посвящена конструированию вакцинных штаммов ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа птиц подтипа H5N1 с использованием разработанной автором обратно-генетической системы для донора аттенуации Лен/17. Детальное изучение полученных штаммов показало, что они обладают необходимым набором полезных признаков, свойственных классическим реассортантным штаммам для ЖГВ. Полученные штаммы были детально изучены как на модели мышей, так и в экспериментах на хорьках. Важным результатом данного раздела работы является доказательство более выраженной защиты, обеспечиваемой живой гриппозной вакциной, перед инактивированной, при заражении иммунизированных хорьков гетерологичным высокопатогенным вирусом гриппа H5N1. Полученные в данной главе результаты явились основой для составления досье для проведения первой фазы клинических испытаний безвредности и иммуногенности ЖГВ против высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 на добровольцах.

Шестая глава собственных исследований посвящена разработке подходов к расширению спектра действия современных живых гриппозных вакцин, используя самые современные генно-инженерные и иммуногенетические подходы. В частности, автором сконструирована панель вакцинных штаммов ЖГВ, несущих химерные молекулы НА. Такие химерные НА содержат идентичный stalk-домен от вируса H1N1, а глобулярные части – от различных антигенно-неродственных вирусов гриппа (H5N1, H8N4, H9N2). Последовательная иммунизация животных такими модифицированными ЖГВ приводила к активной выработке антител, нацеленных на stalk-домен молекулы гемагглютинина, что, в свою очередь, усиливало защиту иммунизированных животных от дрейфовых вариантов вируса гриппа, а также от вирусов гриппа А других подтипов. Другим подходом к оптимизации современных живых гриппозных вакцин является повышение кросс-реактивности ЦТЛ-иммунного ответа на вакцинацию. На большом экспериментальном материале автор убедительно демонстрирует перспективность конструирования вакцинных штаммов с формулой генома 5:3 (с включением в состав вакцинных реассортантов NP гена от современного циркулирующего вируса) для усиления ЦТЛ-иммунного ответа. Как справедливо отмечает автор, комбинация двух указанных подходов является перспективной стратегией для конструирования универсальной гриппозной вакцины.

В разделе Обсуждение автор анализирует полученные в работе результаты и оценивает их с позиций мирового научного опыта. Обсуждение выстроено логически, полностью отражает результаты исследования, обобщает проделанную экспериментальную работу и намечает пути дальнейшей разработки темы.

Выводы полностью соответствуют поставленным задачам, подводят итог проведенным исследованиям и достаточно полно отражают результаты, полученные автором.

Полученные результаты и сделанные на их основании выводы базируются на анализе большого массива экспериментальных данных. Достоверность результатов работы подтверждается проведением всех экспериментальных и клинических исследований на самом высоком методическом уровне.

Основные результаты и положения диссертации, выводы и заключение полностью отражены в 55 научных работах, 27 из которых опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК, и 24 – в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования. Научные достижения автора были представлены в 23 докладах на 18 отечественных и международных научных конференциях и симпозиумах.

Автореферат соответствует основному содержанию диссертации.

ВОПРОСЫ И ЗАМЕЧАНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИИ

В анализируемой диссертации существенных недостатков выявлено не было, а присутствующие немногочисленные опечатки и неточности не умаляют общего благоприятного впечатления от проделанной автором работы.

В качестве дискуссии хотелось бы задать автору следующие вопросы:

- Существуют ли экспериментальные данные, свидетельствующие о целесообразности включения каких-нибудь других генов (кроме HA, NA и NP) от эпидемического родительского вируса в состав вакцинного штамма ЖГВ для усиления индукции перекрестно-реагирующего Т-клеточного иммунного ответа?
- На протяжении нескольких последних десятилетий во всем мире ведутся активные исследования по созданию вакцин и других иммуногенов для направленной индукции антител к консервативному участку M2 белка вируса гриппа. Возможно ли использование разработанной Вами системы для создания живой универсальной вакцины, вызывающей образование высоких уровней M2-специфичных антител?

- В диссертационной работе речь идет исключительно о разработке вакцин широкого спектра действия в отношении разнообразных подтипов вируса гриппа А. Ведутся ли аналогичные работы для вирусов гриппа типа В?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, можно констатировать, что представленная И.Н. Исаковой-Сивак диссертация является законченной научно-исследовательской работой, содержащей решение актуальных научных задач. Диссертация полностью соответствует паспорту заявленной научной специальности «03.02.02 – вирусология».

И.Н. Исакова-Сивак выполнила большой объем экспериментальной работы с использованием самых современных вирусологических, иммунологических, биоинформационных и генно-инженерных методов. В диссертации представлены обоснованные научные положения и выводы, логично вытекающие из большого массива экспериментальных данных.

Диссертация И.Н. Исаковой-Сивак «Молекулярно-генетические подходы к оптимизации живой гриппозной вакцины» является законченным исследованием, которое по актуальности, решению поставленных задач, теоретической и практической значимости полученных результатов полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г., в редакции постановления Правительства Российской Федерации № 335 от 21 апреля 2016 г.», а автор представленной диссертации И.Н. Исакова-Сивак заслуживает присвоения учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02 – «вирусология».

Академик РАН,
профессор, д.б.н.

ЗВЕРЕВ В.В.

Подпись В.В. Зверева заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ НИИ ВС
им. И.И. Мечникова
к.м.н.



АНДРОНОВА Н.И.