



федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и  
микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

(ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)

123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

Тел: 8 499-193-30-01

Факс: 8 499-193-61-83

№ \_\_\_\_\_

<http://www.gamaleya.org>

E-mail: [info@gamaleya.org](mailto:info@gamaleya.org)

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Директор Федерального государственного бюджетного  
учреждения «Национальный исследовательский  
центр эпидемиологии и микробиологии  
им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России  
доктор биологических наук, профессор, академик РАН  
А.Л. Гинзбург



«26» ноября 2018 г.

**ОТЗЫВ**

ведущего учреждения, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, о научно-практической значимости диссертационной работы 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 «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Актуальность темы выполненной работы.** Диссертация Исаковой-Сивак И.Н. посвящена вопросам изучения новых подходов в разработке живой гриппозной вакцины (ЖГВ) с целью повышения ее эффективности и спектра действия.

Приоритет исследований по разработке ЖГВ и рекомендаций по ее практическому применению принадлежит отечественным ученым -



Сморозинцеву А.А., Александровой Г.И., Руденко Л.Г., которые на протяжении многих десятилетий применяли методы конструирования препаратов, согласно новым достижениям науки в изучении структуры и свойств вирусов гриппа: адаптации к другому хозяину (лабораторные животные, куриные эмбрионы) и пониженной температуре, а также реассортации вируса дикого типа с хорошо охарактеризованным лабораторным штаммом (холодоадаптированным донором аттенуации). С 1987г. ЖГВ была лицензирована в России, и в настоящее время представляет собой трехвалентный препарат, в состав которого входят реассортанты вирусов гриппа эпидемически актуальных штаммов с донорами аттенуации. Доноры современных лицензированных вакцин (А/Лен/17 и В/СССР/60) приносят в вакцинные штаммы признаки температурочувствительности (ts-фенотип), холодоадаптированности (са-фенотип) и аттенуации (att фенотип), что делает их безвредными.

В 2009г. отечественная технология производства ЖГВ была передана по лицензионному договору ВОЗ для проведения мероприятий по подготовке к пандемии гриппа в развивающихся странах (Китай, Таиланд, Индия), которую в настоящее время используют для наработки сезонных вакцин.

Однако к началу проведения исследования оставался ряд нерешенных вопросов, которые могли бы быть использованы в совершенствовании применяемых вакцин и конструировании новых, в частности: возможность оценить роль мутаций донора А/Лен/17 и их генетическую стабильность, актуальность применения единого российского донора для живых и инактивированных вакцин; разработка новых подходов к созданию штаммов живой гриппозной вакцины против вирусов, имеющих пандемический потенциал (А(Н2N2), А(Н5N1), А(Н7N9)), а также в конструировании универсальной вакцины.

Таким образом, цель диссертационной работы Исаковой-Сивак И.Н. – разработка молекулярно-генетических подходов, способствующих повышению эффективности сезонных и созданию пандемических ЖГВ и четко сформулированные задачи являются своевременными и актуальными.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, их достоверность и новизна.**

В шести главах собственных исследований достаточно подробно и ясно представлены полученные результаты, каждая из которых завершается коротким заключением.

Глава 3 посвящена разработке универсального донора для подготовки реассортантных штаммов для ЖГВ и ИГВ. В ходе выполнения этой задачи был выбран и подготовлен новый донор аттенуации А/PR/8/59/M2 (Н1N1). Показана роль мутаций в генах PB2, PB1 и M, а также PA в становлении ts/са фенотипов.

В Главе 4 представлено обоснование безвредности и генетической стабильности ЖГВ на основе данных, полученных при применении ранее



разработанной системы обратной генетики; изучена роль мутаций по степени их влияния на ts-фенотип донора и минорную роль мутации в NS2 белке; показана возможность применения донора Лен/17 для конструирования генно-инженерных ЖГВ, в частности, с использованием высокопатогенных вирусов гриппа птиц.

Глава 5 посвящена подготовке, доклиническому и клиническому изучению ЖГВ против вируса гриппа А(Н2N2). Автором подготовлен ряд реассортантных вакцинных кандидатов, которые были полностью охарактеризованы в системах *in vitro* и *in vivo*. Сравнив два разных подхода к конструированию вакцинных штаммов, выявлена более высокая репродуктивная активность штамма на основе нового модифицированного донора А/PR8/34/59/M2 (Н1N1) по сравнению с классическим донором. Обоснован выбор вакцинного штамма А/17/Калифорния/66/395 (Н2N2) для проведения клинических испытаний на добровольцах, показана его хорошая переносимость, отсутствие его передачи контактными лицами, генетическая стабильность, относительно высокая иммуногенность для непримированных лиц.

В Главе 6 представлены данные по подготовке, доклиническому и клиническому изучению ЖГВ против вируса гриппа птиц А(Н7N9). Вакцинный штамм, полученный с помощью генно-инженерных методов, уступал штамму, полученному методом классической реассортации. Изучение свойств штамма А/17/Ануи/2013/61 (Н7N9) выявило его безвредность, иммуногенную активность и защитную эффективность у хорьков. Результаты в наблюдениях на добровольцах коррелировали с данными, полученными на хорьках, а также выявили более высокие показатели адаптивного иммунного ответа по сравнению с другими штаммами вируса гриппа птиц.

Сконструирован экспериментальный вакцинный штамм ЖГВ против высокопатогенного вируса гриппа Н7N9, выделенного в 2016 году. Для этого был удален полиосновный кливидж-сайт молекулы гемагглютинина, чтобы сделать вирус апатогенным, а также внесена мутация в ген нейраминидазы, чтобы сделать вирус чувствительным к нейраминидазным ингибиторам. Вакцинный штамм обладал всеми полезными свойствами, характеризующими реассортантные штаммы ЖГВ, и результаты явились основой для подготовки досые для проведения первой фазы клинических испытаний на добровольцах.

Глава 7 посвящена вопросам подготовки и доклиническим исследованиям ЖГВ против потенциально пандемических вирусов гриппа птиц А(Н5N1). Автор впервые применила методы обратной генетики для конструирования вакцинных штаммов разных клейдов с последующим изучением их свойств в системах *in vitro* и *in vivo*, используя модели мышей, хорьков и кур. Результаты показали их безвредность (апатогенность для кур согласно классификации ВОЗ), отсутствие реверсии к вирулентной форме, высокую иммуногенность, а также защиту против гомологичного и гетерологичного штаммов вируса гриппа А(Н5N1), которая коррелирует с усиленной



индукцией перекрестно-реагирующих секреторных IgA антител. Полученные данные позволят перейти к клиническим исследованиям на добровольцах.

В Главе 8 автором предложены новые стратегии для усиления индукции перекрестно-реагирующих факторов иммунного ответа на иммунизацию ЖГВ, используя современные генно-инженерные и иммуногенетические подходы, в частности, конструирование химерной молекулы НА и получение вакцинного штамма с формулой 5:3 для усиления индукции релевантного ЦТЛ-иммунного ответа путем инкорпорирования NP-гена от эпидемически актуального вируса. Примененная стратегия может быть универсальной и использоваться при подготовке инактивированных вакцин на основе высокорепродуктивного вируса A/PR8/34 (H1N1).

Заключительная глава посвящена обсуждению полученных результатов с данными исследований, проведенных другими учеными. Необходимо отметить объем списка цитируемой литературы, который включает 567 источников.

Для выполнения поставленных задач автор использовала совокупность классических вирусологических, молекулярно-генетических, генно-инженерных, иммунологических, биоинформационных и статистических методов. Клинические испытания на добровольцах проводили согласно международным стандартам GCP. Выводы и практические рекомендации подкреплены данными, представленными 82 рисунками, 50 таблицами и 4 приложениями.

**Значимость для науки и практики данных, полученных автором диссертации.**

Настоящая исследовательская работа имеет большое научно-практическое значение. Подготовлен альтернативный донор аттенуации A/PR/8/59/M2 (H1N1), который может быть использован как единый для конструирования живых и инактивированных гриппозных вакцин. Высокая урожайность донора позволит нарабатывать большие объемы вакцины, а также способствовать снижению ее стоимости. Штамм A/PR/8/59/M2 (H1N1) депонирован в Государственную коллекцию возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Вакцинные штаммы, подготовленные с использованием этого донора, A/59/M2/Калифорния/66/2211 (H2N2) и A/59/M2/Токио/67/22111 (H2N2), депонированы в Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Разработана обратно-генетическая система для классического донора A/Ленинград/134/17/57 (H2N2), позволяющая получать вакцинные штаммы из плазмидных ДНК, несущих все гены вируса, что определяет перспективы конструирования вакцинных штаммов с заданными свойствами не только в отношении вирусных, но и бактериальных инфекций. Изучен вклад индивидуальных мутаций в генах донора в проявлении таких его свойств, как



аттенуация и температурочувствительность. Эти данные могут быть в дальнейшем использованы для рационального дизайна вакцинных штаммов на основе различных эпидемических и потенциально-пандемических вирусов гриппа А.

Проведены полные циклы доклинических и клинических исследований вакцинных штаммов к вирусам гриппа А(Н2N2) и А(Н7N9), доклинические исследования вакцинных штаммов вируса гриппа А(Н5N1), что представляет важное значения для создания коллекции вакцинных штаммов вирусов гриппа с пандемическим потенциалом. Стратегия инкорпорирования NP гена эпидемических штаммов в состав вакцинных (формула 5:3), а также способ перекрестно-реагирующих антител, направленных на консервативный участок гемагглютинаина, могут быть использованы для конструирования универсальной вакцины.

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

По материалам диссертационной работы автором опубликовано 55 научных работ, из них 33 научные статьи (27 - в журналах, рекомендованных ВАК, 24 – в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования), 22 тезиса - в материалах российских и зарубежных конференций. Получено 3 патента на изобретения РФ. Опубликованные данные полностью соответствуют представленным в диссертационной работе результатам. Очевиден личный вклад автора, как в экспериментальной части исследований, так и на аналитическом этапе.

**Рекомендации по использованию результатов диссертации.** Научные положения, выводы и практические рекомендации, сформулированные в диссертации Исаковой-Сивак И.Н., могут быть использованы в производстве сезонных гриппозных вакцин, а также созданию коллекции вакцинных штаммов к вирусам гриппа с пандемическим потенциалом. Ряд предложенных методик конструирования вакцинных штаммов может быть применен для создания универсальной вакцины.

### **Вопросы.**

1. К вопросу о генетической стабильности штаммов ЖГВ. В работе указано, что необходима одновременная реверсия четырех ts мутаций для восстановления дикого фенотипа вируса. Однако известно, что при адаптации вакцинных вирусов к репродукции при повышенной температуре в других участках генома могут возникать компенсаторные мутации, которые нивелируют действие ts мутаций (т.е. вирус становится температуроустойчивым даже без реверсии описанных ts мутаций). Можно ли с уверенностью утверждать, что при репликации в верхних дыхательных путях привитых у вакцинных штаммов не будут возникать такие компенсаторные мутации?



2. В работе говорится о том, что разработанная автором обратнo-генетическая система для отечественного донора аттенуации открывает перспективы использования живых вакцин в качестве вирусного вектора для создания различных векторных вакцин. Является ли такая система конкурентоспособной по сравнению с такими распространенными вирусными векторами, как поксвирусы, аденовирусы, альфавирусы и др.?

**Заключение.** Диссертационная работа Исаковой-Сивак Ирины Николаевны на тему «Молекулярно-генетические подходы к оптимизации живой гриппозной вакцины», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология, является научно-квалификационным исследованием, результатом которого явилось решение актуальной народно-хозяйственной проблемы – повышение эффективности сезонных и конструирование пандемических ЖГВ.

По своей актуальности, научной новизне и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа отвечает требованиям, п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук. Автор представленной диссертационной работы, Исакова-Сивак И.Н., заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.02.02 – вирусология.

Отзыв обсужден и одобрен на научной конференции Отдела экологии вирусов с научно-практическим центром по экологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», подразделение Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России 23.11.2018г. (Протокол № 4).

Заведующая лабораторией этиологии и эпидемиологии гриппа  
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

д.м.н. Бурцева Елена Ивановна  
Москва 123098 ул. Гамалеи д.18  
тел.8 499 190 30 46  
e-mail: [elena-burtseva@yandex.ru](mailto:elena-burtseva@yandex.ru)

Подпись Бурцовой Е.И. заверяю.

Ученый секретарь ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России  
(123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18 Тел. 193-71-71, e-mail: [info@riem.ru](mailto:info@riem.ru))

к.б.н. Кожевникова Л.К.

