

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационного Совета Д 001.043.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А.Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации по диссертации Исаковой-Сивак Ирины Николаевны на тему «Молекулярно-генетические подходы к оптимизации живой гриппозной вакцины», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности «03.02.02 – вирусология»

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 18 декабря 2018 года о соответствии диссертационного исследования И.Н. Исаковой-Сивак положению, предъявляемому к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук

Диссертация Исаковой-Сивак Ирины Николаевны «Молекулярно-генетические подходы к оптимизации живой гриппозной вакцины» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02-вирусология принята к защите 13 сентября 2018 года, протокол № 6 диссертационным советом Д 001.043.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А.Смородинцева» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17, утвержденного Приказом № 980 н/к от 16 декабря 2013 года.

Соискатель Исакова-Сивак Ирина Николаевна, 1981 года рождения, гражданка РФ, закончила Санкт-Петербургский государственный политехнический университет в 2004 году. В 2007 году защитила кандидатскую диссертацию по специальности 03.00.06 -вирусология. Диплом кандидата биологических наук – ДКН № 032410 от 24.04.2007 г.

Диссертационное исследование Исаковой-Сивак И.Н. на соискание ученой степени доктора биологических наук выполнено в отделе вирусологии им. А.А. Смородинцева Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины», где соискатель работает с 2002 года, сначала научным сотрудником, а с 2017 года – заведующей лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций.

Научный консультант:

Руденко Лариса Георгиевна, заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук, заведующая отделом вирусологии им. А.А.Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ».

Официальные оппоненты:

Зверев Виталий Васильевич, д.б.н., профессор, академик РАН, директор ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Гамбарян Александра Сергеевна, д.б.н., заведующая лабораторией молекулярной биологии вирусов гриппа ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова».

Шестопалов Александр Михайлович, д.б.н., профессор, ВРИО директора ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

Ведущая организация:

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ. Заключение подготовлено д.м.н. Бурцевой Еленой Ивановной, руководителем лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа и утверждено директором ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ д.б.н., профессором, академиком РАН, Гинцбургом Александром

Леонидовичем.

По материалам диссертационной работы соискателем опубликовано 33 научные статьи, включая 27 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 24 – в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования. Получено 3 патента на изобретения РФ.

Избранные публикации:

1. I Isakova-Sivak. Safety, immunogenicity and infectivity of new live attenuated influenza vaccines. / I Isakova-Sivak, L Rudenko. // *Expert Review of Vaccines*.- 2015.- Vol.14.- №10.- P.1313-1329.
2. I Isakova-Sivak I. Tackling a novel lethal virus: a focus on H7N9 vaccine development. / Isakova-Sivak, L Rudenko. // *Expert Review of Vaccines*.- 2017.- Vol.16.- №7.- P.709–721.
3. Isakova-Sivak I. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) / Isakova-Sivak I., Chen LM., Matsuoka Y., Voeten JTM., Kiseleva I., Heldens JGM., van den Bosch H., Klimov AI., Rudenko LG., Cox NJ., Donis RO. // *Virology*.- 2011.- Vol.412.- №2.- P.297-305.
4. Isakova-Sivak I. Characterization of reverse genetics-derived cold-adapted master donor virus A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) and reassortants with H5N1 surface genes in a mouse model. / Isakova-Sivak I., Chen LM., M Bourgeois, Y Matsuoka, JTM Voeten, JGM Heldens, H van den Bosch, A Klimov, L Rudenko, NJ Cox, RO Donis. // *Clinical and Vaccine Immunology*.- 2014.- Vol.21.- №5.- P.722-731.
5. Isakova-Sivak I. Development and pre-clinical evaluation of two LAIV strains against potentially pandemic A(H2N2) influenza virus. / Isakova-Sivak I., de Jonge J, Smolonogina T, Rekstin A, van Amerongen G, van Dijken H, Mouthaan J, Roholl P, Kuznetsova V, Doroshenko E, Tsvetnitsky V, Rudenko L. // *PLoS ONE*.- 2014.- 9(7): e102339.
6. I Isakova-Sivak. H2N2 live attenuated influenza vaccine is safe and immunogenic for healthy adult volunteers. / I Isakova-Sivak, M Stukova, M Erofeeva, A Naykhin, S Donina, G Petukhova, V Kuznetsova, I Kiseleva, T Smolonogina, I Dubrovina, M Pisareva, A Nikiforova, M Power, J Flores, L Rudenko // *Human Vaccines and Immunotherapeutics*.-2015.- Vol.11, №4.- P.971–983.
7. Rudenko L. H7N9 live attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. / Rudenko L., Isakova-Sivak I., Naykhin A., Kiseleva I., Stukova M., Erofeeva M., Korenkov D., Matyushenko V., Sparrow E., Kieny M.P. // *Lancet Infectious Diseases*.- 2016.- Vol.16.- № 3.- P.303-310.

8. de Jonge J. H7N9 Live attenuated influenza vaccine is highly immunogenic, prevents virus replication and protects against severe bronchopneumonia in ferrets. / de Jonge J., Isakova-Sivak I., van Dijken H., Spijkers S., Mouthaan J., de Jong R., Smolonogina T., Roholl P., Rudenko L. // *Molecular Therapy*.- 2016.- Vol.24.- №5.- P.991-1002.
9. Isakova-Sivak I., Comparative studies of infectivity, immunogenicity and cross-protective efficacy of live attenuated influenza vaccines containing nucleoprotein from cold-adapted or wild-type influenza virus in a mouse model. / Isakova-Sivak I, Korenkov D, Smolonogina T, Tretiak T, Donina S, Reksin A, Naykhin A, Shcherbik S, Pearce N, Chen LM, Bousse T, Rudenko L. // *Virology*.- 2017.- Vol.500.- P.209-217.
10. I Isakova-Sivak. Broadly protective anti-hemagglutinin stalk antibodies induced by live attenuated influenza vaccine expressing chimeric hemagglutinin. / I Isakova-Sivak, D Korenkov, T Smolonogina, T Kotomina, S Donina, V Matyushenko, D Mezhsenskaya, F Krammer, L Rudenko. // *Virology*.- 2018.- T.518.- C.313-323.

На автореферат диссертации поступили отзывы от:

- 1) д.б.н. Елены Александровны Муриной, руководителя отдела вирусологии и молекулярно-биологических методов исследования ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург. Отзыв положительный, замечаний нет;
- 2) д.б.н. Ларисы Валентиновны Кордюковой, ведущего научного сотрудника НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва. Отзыв положительный, замечаний нет;
- 3) к.м.н. Елены Августовны Нечаевой, заместителя генерального директора по научной и производственной работе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово Новосибирская область. Отзыв положительный, замечаний нет;
- 4) д.м.н. Владимира Васильевича Малышева, профессора кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО Военно-Медицинской Академии им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург. Отзыв положительный, замечаний нет;
- 5) д.м.н., проф., чл-корр. РАН Андрея Семеновича Симбирцева, научного руководителя ФГУП «Государственный НИИ особо чистых

биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург. Отзыв положительный, замечаний нет;

6) д.м.н., проф. Людмилы Павловны Зуевой, зав. кафедрой эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И.Мечникова». Отзыв положительный, замечаний нет;

7) д.м.н., проф. Георгия Михайловича Игнатьева, зам. руководителя производственного направления ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». Отзыв положительный, содержит вопросы:

- a. в каком регионе, в какое время года и при какой эпидемиологической ситуации по заболеваемости гриппом проводились клинические исследования?
- b. ведутся ли разработки, аналогичные проводимым в диссертации, для ЖГВ, применяемой в США? Если да, то соотносятся ли их результаты с полученными в данной работе?

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их высокой квалификацией, заинтересованностью в тематике представленного научного исследования, собственными значительными достижениями в данной отрасли науки, наличием публикаций по теме диссертации и способностью определить научную и практическую ценность выполненной научно-исследовательской работы.

Диссертационный совет отмечает, что серьезной проблемой современного здравоохранения является недостаточная эффективность доступных лицензированных гриппозных вакцин в отношении дрейфовых вариантов сезонных вирусов гриппа, а также их неспособность обеспечивать защиту от вновь возникающих пандемических штаммов. В связи с этим работа И.Н. Исаковой-Сивак, посвященная поиску подходов, способствующих повышению эффективности сезонных и пандемических

гриппозных вакцин, является своевременной и актуальной.

На основании выполненных соискателем исследований:

Разработан альтернативный холодоадаптированный донорский штамм A/PR8/59/M2 (H1N1), который может быть использован как донор аттенуации для подготовки живых гриппозных вакцин, а также как донор высокой урожайности для подготовки инактивированных гриппозных вакцин типа А.

Разработана обратно-генетическая система для холодоадаптированного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57, позволяющая целенаправленно получать вакцинные штаммы ЖГВ с любыми заранее заданными свойствами, а также изучать роль индивидуальных мутаций донора аттенуации в проявлении его биологических свойств.

Впервые, используя методы генной инженерии, **установлен** вклад индивидуальных мутаций донора Лен/17 в формирование его температурочувствительного фенотипа: по степени влияния на температурочувствительный фенотип вируса *ts* мутации расположены следующим образом: PB2(V478L) > PB1(K265N) > PB1(V591I) > NS2(M100I). Для полного восстановления дикого фенотипа вируса требуется одновременная реверсия всех четырех *ts* мутаций, что подтверждает высокую степень безопасности живых гриппозных вакцин.

Впервые применены методы обратной генетики для конструирования вакцинных штаммов отечественной живой гриппозной вакцины против высокопатогенных вирусов гриппа А(H5N1) и А(H7N9). Всесторонняя характеристика полученных вакцинных штаммов в доклинических исследованиях подтвердила их безвредность, иммуногенность и защитную эффективность, свойственные классическим вакцинным штаммам ЖГВ.

Впервые подготовлены и изучены в доклинических и клинических исследованиях реассортантные штаммы живой гриппозной вакцины против потенциально-пандемических вирусов гриппа подтипов А(H2N2) и А(H7N9).

Клинические исследования подтвердили их безвредность, хорошую переносимость, приживляемость и высокую иммуногенность для взрослых здоровых добровольцев.

Впервые обнаружены значительные отличия в составе иммунодоминантных эпитопов для цитотоксических Т лимфоцитов (ЦТЛ), расположенных в молекулах нуклеопротеина (NP) донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 и современных циркулирующих вирусов гриппа А. В настоящем исследовании предложена перспективная 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).

Разработана стратегия усиления выработки кросс-реактивных антител, нацеленных на консервативный участок молекулы гемагглютиниона, путем включения в состав вакцинных штаммов ЖГВ химерных молекул гемагглютиниона (НА). Последовательная иммунизация животных такими модифицированными ЖГВ приводит к выработке антител, нацеленных на stalk-домен НА, что усиливает защиту от дрейфовых вариантов вируса гриппа, а также от вирусов гриппа А других подтипов.

Теоретическая значимость исследования обусловлена тем, что на новом методическом уровне оценен вклад индивидуальных мутаций в генах донора аттенуации Лен/17 в проявление таких его биологических свойств, как температурочувствительность и аттенуация для лабораторных животных. Представленные в работе данные о необходимости реверсии четырех *ts* мутаций в вакцинном штамме ЖГВ для полного восстановления дикого фенотипа вируса указывают на высокую степень безопасности живых гриппозных вакцин. В исследовании впервые доказан универсальный характер *ts* мутаций донора аттенуации Лен/17: при внесении данных мутаций в генетически удаленный вирус гриппа он приобретает 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.

В работе впервые установлены значительные отличия в составе ЦТЛ-эпитопов молекулы нуклеопротеина донора аттенуации Лен/17 и современных вирусов гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2. Экспериментально доказано, что классические живые гриппозные вакцины с формулой генома 6:2 индуцируют мощный Т-клеточный иммунный ответ на устаревшие эпитопы NP, который слабо реагирует с современными вирусами гриппа А. Предложенная в диссертационном исследовании перспективная стратегия инкорпорирования NP гена от эпидемического вируса в состав вакцинных штаммов ЖГВ для усиления Т-клеточного иммунного ответа является универсальной и может быть распространена на инактивированные гриппозные вакцины.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что в работе представлены новые подходы к конструированию живой гриппозной вакцины, обладающей более широким спектром действия, по сравнению с классической отечественной ЖГВ. Стратегия инкорпорирования NP гена эпидемических штаммов в состав вакцинных реассортантов, а также оригинальный способ индукции перекрестно-реагирующих антител, направленных на консервативный участок молекулы гемагглютинаина, открывают перспективы конструирования универсальной гриппозной вакцины, способной обеспечить защиту от различных подтипов вируса гриппа А.

И.Н. Исаковой-Сивак подготовлены и изучены в доклинических и клинических исследованиях вакцинные штаммы для живой гриппозной вакцины против вирусов гриппа Н2N2 и Н7N9, что способствовало существенному пополнению национальной коллекции вакцинных штаммов вирусов гриппа с пандемическим потенциалом.

По результатам диссертационного исследования сделан ряд практических рекомендаций. В частности, при подготовке вакцинных штаммов ЖГВ против потенциально-пандемических вирусов гриппа следует обращать пристальное внимание на такие важные свойства поверхностных антигенов вируса, как сродство молекулы гемагглютинина к рецепторам клеток млекопитающих ($\alpha 2,6$), а также активность нейраминидазы, и при необходимости оптимизировать их аминокислотный состав для индукции мощного гуморального иммунного ответа на вакцинацию.

Разработанная автором обратно-генетическая система для классического донора А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) не только позволяет создавать безопасные, иммуногенные и эффективные вакцинные штаммы против высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 и H7N9, но и открывает перспективы быстрого и 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.

Разработанные автором в диссертационном исследовании новые вакцинные штаммы живой гриппозной вакцины защищены тремя патентами РФ на изобретения.

Оценка достоверности результатов исследования. Подлинность и обоснованность результатов работы определены проведением всех экспериментальных и клинических исследований на самом высоком методическом уровне, значительным объемом выполненных исследований, большим массивом полученных данных и тщательным статистическим анализом полученных результатов.

Личный вклад соискателя. Автор провел анализ литературных данных по проблеме исследования, принял непосредственное участие в дизайне и выполнении экспериментальных работ, провел обработку полученных

результатов и представил результаты в научных публикациях и докладах на отечественных и международных конференциях.

Автором сконструирован адамантан-чувствительный альтернативный донор аттенуации и высокой репродуктивности на базе холодоадаптированного штамма аттенуации A/PR8/59/1 (H1N1), разработанного ранее в отделе вирусологии им. А.А.Сморозинцева ФГБНУ «ИЭМ» (авторы А.Ю.Егоров, Г.И.Александрова); изучен вклад мутантных генов в проявление биологических свойств модифицированного донора A/PR8/59/M2.

Автором разработана обратно-генетическая система для отечественного донора аттенуации живой гриппозной вакцины A/Ленинград/134/17/57 (H2N2), которая позволила получить изученные в исследовании генно-инженерные вакцинные штаммы ЖГВ H5N1 и H7N9, а также установить роль индивидуальных мутаций донора аттенуации в проявлении его температурочувствительного фенотипа.

Автором подготовлены вакцинные штаммы ЖГВ против потенциально пандемических вирусов гриппа H5N1, H7N9 и H2N2 (совместно с к.б.н. Т.А.Смолоногиной), а также проведены их доклинические исследования. Клинические исследования ЖГВ H2N2 и H7N9 проведены совместно с сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Сморозинцева» Минздрава РФ.

Исследования по конструированию вакцинных штаммов универсальной живой гриппозной вакцины, несущих химерные молекулы гемагглютинина, проводились совместно с профессором F.Krammer (Mount Sinai School of Medicine, Нью-Йорк, США). В этом исследовании автором сконструированы вакцинные штаммы ЖГВ H5N1 и H9N2, содержащие stalk-домен HA от вируса A/PR8/59/1 (H1N1). Вакцинный штамм ЖГВ H9N2, содержащий stalk-домен HA от вируса А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1), был получен совместно с к.б.н. Т.А.Смолоногиной. Контрольные вакцинные штаммы ЖГВ H5N1 и H8N1, несущие интактные молекулы HA, получены автором

лично.

Автором подготовлена панель вакцинных штаммов ЖГВ, несущих NP ген от современных циркулирующих вирусов гриппа (5:3 реассортанты) и проведено сравнительное изучение 6:2 и 5:3 реассортантных штаммов на модели мышей. Сравнительные иммунологические исследования 6:2 и 5:3 вакцинных штаммов подтипа H3N2 на модели хорьков, а также оценка кросс-реактивности Т-клеток человека к различным эпитопам NP *in vitro*, проведены к.б.н. Кореньковым Д.А.

Доклиническое изучение экспериментальных вакцинных штаммов, полученных в данном исследовании, на модели хорьков проводились в сотрудничестве со следующими научными центрами: The Dutch National Institute for Public Health and the Environment (RIVM, Билтховен, Голландия) – изучение ЖГВ H2N2 и ЖГВ H7N9; Centers for Disease Control and Prevention (Атланта, США) – изучение живой и инактивированной вакцин против высокопатогенных вирусов H5N1; The WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza (Мельбурн, Австралия) – сравнительное изучение ЖГВ с формулами генома 6:2 и 5:3 подтипа H3N2; и ООО «Институт доклинических исследований» (Россия) – изучение ЖГВ из высокопатогенного штамма H7N9.

На заседании 18 декабря 2018 года диссертационный совет Д 001.043.01 сделал вывод о том, что диссертационная работа «Молекулярно-генетические подходы к оптимизации живой гриппозной вакцины», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02-вирусология, является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, теоретическое значение которой можно квалифицировать как новое достижение в развитии фундаментальной и прикладной вирусологии. В исследовании разработаны новые подходы к созданию и расширению спектра действия вакцинных штаммов отечественной живой гриппозной вакцины против сезонных и потенциально

пандемических вирусов гриппа А, что имеет большое народно-хозяйственное значение.

По актуальности, объему выполненных исследований, их новизне и практической значимости представленная работа соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. в редакции Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук. На заседании 18 декабря 2018 года диссертационный совет Д 001.043.01 принял решение присудить Исаковой-Сивак Ирине Николаевне ученую степень доктора биологических наук по специальности 03.02.02-вирусология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 13 докторов наук по специальности 03.02.02-вирусология, участвовавших в заседании, из 20 человек, входящих в состав совета, проголосовали:

за присуждение ученой степени доктора биологических наук – 14 человек;

против присуждения ученой степени – нет;

недействительных бюллетеней – нет.

Председатель Диссертационного совета Д 001.043.01

Жилинская И.Н.



[Handwritten signature]

Ученый секретарь Диссертационного совета Д 001.043.01

Амосова И.В.

[Handwritten signature]