

**Отзыв**  
**на автореферат диссертационной работы ИСАКОВОЙ-СИВАК Ирины**  
**Николаевны «МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К**  
**ОПТИМИЗАЦИИ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ»,**  
**представленную на соискание ученой степени доктора биологических**  
**наук по специальности 03.02.02 – вирусология**

**Актуальность темы.**

Грипп относится к острым респираторным вирусным инфекциям и представляет собой одну из наиболее значимых проблем, стоящих перед современным здравоохранением. Заболеваемость гриппом обуславливает ряд проблем социального и экономического характера: смертность в группах риска, резкое повышение нагрузки на персонал медучреждений, снижение трудовых ресурсов. 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. Большим преимуществом живой гриппозной вакцины по сравнению с инактивированной гриппозной вакциной (ИГВ) является безболезненный интраназальный способ введения, обеспечивающий формирование не только системного гуморального и Т-клеточного иммунного ответа, но и мукозального иммунитета во входных воротах инфекции. В отличие от ИГВ, живые вакцины вызывают образование коллективного иммунитета, что особенно важно в организованных коллективах. В настоящее время для подготовки реассортантных вакцинных штаммов для ЖГВ типа А в России используется хорошо охарактеризованный безвредный для людей холодадаптированный донор аттенуации – штамм А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) [Лен/17]. Для подготовки вакцинных штаммов для производства 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. Реассортантные штаммы для сезонной ИГВ, подготовленные на основе вируса PR8, являются безопасными для людей, однако при подготовке ИГВ из высокопатогенных вирусов гриппа реассортантные штаммы могут сохранять остаточную вирулентность, поэтому при производстве ИГВ (до стадии инактивации) необходимо соблюдать повышенные меры предосторожности, чтобы обезопасить персонал.

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. Все это обуславливает целесообразность разработки отечественного 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.

Вакцинные штаммы ЖГВ, подготовленные на основе холодаадаптированного донора аттенуации Лен/17, обладают признаками температурочувствительности (ts фенотип) и холодаадаптированности (са фенотип), передаваемыми в геном вакцинного штамма вместе с шестью генами негликозилированных белков Лен/17. Ранние исследования определили роль мутантных генов донора Лен/17 в проявлении ts/са, а также аттенуированного фенотипов у вакцинных штаммов ЖГВ, однако до проведения исследований Ирины Николаевны не представлялось возможным оценить роль каждой индивидуальной мутации в проявлении указанных признаков. Поскольку вакцинные штаммы ЖГВ проходят несколько циклов репликации в верхних дыхательных путях привитых, представляется важным оценить генетическую стабильность реассортантных вирусов – т.е. определить, реверсия каких мутаций, свойственных донору Лен/17, требуется для полного восстановления дикого фенотипа вируса. Эти данные позволяют на новом методическом уровне охарактеризовать безвредность живой гриппозной вакцины для людей.

Помимо ежегодных эпидемий вирусы гриппа А могут вызывать пандемии гриппа в случае, когда новый вирус антигенно отличается от ранее циркулировавших вариантов, вследствие чего человеческая популяция является иммунологически наивной. Глобальное распространение различных подтипов вирусов гриппа А в популяции птиц обеспечивает предпосылки для межвидовой передачи вирусов: в последние два десятилетия документируется все больше случаев инфицирования людей вирусами гриппа птиц H5, H7 и H9. Помимо вирусов гриппа птиц, пандемическую опасность представляют собой вирусы гриппа человека, которые не циркулировали в популяции людей продолжительное время, но при этом продолжают существовать в природном резервуаре. К таким вирусам относятся вирусы подтипа H2N2, вытесненные из циркуляции среди людей вирусами H3N2 в 1968 году, но продолжающие выделяться от птиц и свиней.

Одна из наиболее важных инициатив по подготовке к пандемии гриппа сосредоточена на разработке и оценке различных вакцин против потенциально пандемических вирусов гриппа. Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) оценила преимущества живых вакцин перед инактивированными в качестве первостепенной защиты населения от пандемического вируса и включила их в Глобальный план ВОЗ по увеличению поставок гриппозных вакцин в случае наступления пандемии. Одним из главных преимуществ ЖГВ перед ИГВ явилась доступность вакцины для развивающихся стран, ущерб для которых в случае пандемии гриппа прогнозируется наиболее серьезный. До начала представленной работы не существовало охарактеризованных в доклинических и клинических исследованиях кандидатных вакцинных штаммов ЖГВ, подготовленных на основе потенциально-пандемических вирусов гриппа H2N2 и H7N9. Кроме того, до представленной работы все

вакцинные штаммы для отечественной ЖГВ готовились методами классической реассортации в развивающихся куриных эмбрионах донора аттенуации Лен/17 и эпидемического вируса гриппа. Однако такие методы не могут быть применены для конструирования вакцинных штаммов из высокопатогенных вирусов гриппа H5N1 и H7N9, поскольку в данном случае требуется удаление полиосновных аминокислот из кливедж-сайта молекулы гемагглютинина. В этой связи разработка системы получения вакцинных штаммов ЖГВ генно-инженерными методами представляется своевременной и актуальной. 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, а, следовательно, эффективность. Соответственно, поиск подходов, способствующих повышению эффективности сезонных и пандемических гриппозных вакцин, является своевременным и актуальным исследованием, имеющим важное социально-экономическое значение.

Актуальность темы, ее разработка до начала исследования определило основную цель работы Ирины Николаевны - разработку молекулярно-генетических подходов, способствующих повышению эффективности сезонных и созданию пандемических живых гриппозных вакцин. В соответствии с указанной целью автором были поставлены, и в ходе работы успешно решены, следующие задачи:

1. Разработать альтернативный универсальный донор аттенуации и высокой репродуктивности для подготовки вакцинных штаммов для живых и инактивированных гриппозных вакцин и оценить роль мутантных генов в проявлении его биологических свойств;

2. Изучить вклад уникальных мутаций донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) в проявление его различных биологических свойств, используя современные молекулярно-генетические и генно-инженерные подходы;

3. Разработать подходы к созданию реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины против потенциально пандемических вирусов гриппа А(H2N2) и оценить безвредность, иммуногенность и эффективность подготовленных вакцинных штаммов в доклинических исследованиях, а также в первой фазе клинических испытаний на добровольцах;

4. Сконструировать генно-инженерные вакцинные штаммы против высокопатогенных вирусов гриппа птиц А(H5N1), детально охарактеризовать их в системах *in vitro* и *in vivo*, а также изучить механизмы формирования иммунного ответа на живую и инактивированную вакцины, подготовленные на их основе;

5. Подготовить вакцинные штаммы для живой гриппозной вакцины против низкопатогенных и высокопатогенных потенциально пандемических вирусов гриппа А(H7N9) и оценить безвредность, иммуногенность и эффективность подготовленных вакцинных штаммов в доклинических исследованиях, а также в первой фазе клинических испытаний на добровольцах;

6. Разработать подходы к усилению Т-клеточного иммунного ответа на сезонные и пандемические живые гриппозные вакцины;

7. Разработать подходы для индукции живой гриппозной вакциной перекрестно-реагирующих антител к консервативному домену молекулы гемагглютинина;

8. Сформулировать предложения по созданию высокоэффективных живых гриппозных вакцин широкого спектра действия (универсальной живой гриппозной вакцины).

Для выполнения поставленных задач автором были использованы разные методы, включающие в себя вирусологические, иммунологические, молекулярно-генетические и биоинформационные. Совокупность всех использованных автором методов позволило ей провести сложное комплексное исследование и решить все поставленные задачи. Работа, без сомнения, имеет **научную новизну**, с которой связаны ее **теоретическая и практическая значимость**, а именно:

Разработанный в настоящем исследовании альтернативный донор аттенуации A/PR/8/59/M2 (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. Штамм A/PR/8/59/M2 (H1N1) депонирован в Государственной коллекции Роспотребнадзора возбудителей вирусных инфекций, риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» под №V-654. Вакцинные штаммы, подготовленные с использованием нового донора аттенуации – A/59/M2/Калифорния/66/2211 (H2N2) и A/59/M2/Токио/67/22111 (H2N2) – депонированы в коллекции Института вирусологии им. Д.И. Ивановского (№2652 и №2653).

Важным результатом диссертационной работы является разработка обратно-генетической системы для холодоадаптированного штамма A/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 дает возможность целенаправленного конструирования вакцинных штаммов ЖГВ с любыми заранее заданными свойствами.

В результате проведенного исследования был решен ряд задач фундаментального характера, так 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 10 указывают на высокую степень безопасности живых гриппозных вакцин, поскольку одновременная реверсия четырех мутаций, ответственных за ts фенотип вакцинного вируса, представляется крайне маловероятной.

Автором 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.

Большую практическую ценность, и это необходимо отдельно подчеркнуть, 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 (вакцинные штаммы A/17/Калифорния/66/4412 (H2N2), A/17/Токио/67/912 (H2N2) и A/17/Ануи/2013/61 (H7N9)).

Вакцинные 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. В случае возникновения пандемии подготовленные в ходе проведенного исследования штаммы будут в кратчайшие сроки поставлены на производство, что позволит наработать необходимые объемы вакцины и привить наиболее уязвимые контингенты уже в первые месяцы пандемии.

Предложенная в диссертационном исследовании 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. Вакцинные штаммы для ИГВ в настоящее время готовят на основе высокорепродуктивного вируса PR8, выделенного более 80 лет назад, и ЦТЛ-эпитопы которого также существенно устарели. Такой подход хоть и не позволяет сконструировать один универсальный вакцинный штамм, способный защитить привитых от различных подтипов вируса гриппа А, однако он очень прост в исполнении и может применяться уже в настоящее время для подготовки более кросс-реактивных живых и инактивированных гриппозных вакцин. Представленный в диссертационном исследовании оригинальный способ индукции перекрестно-реагирующих антител, направленных на консервативный участок молекулы гемагглютинаина вирусов гриппа, открывает перспективы конструирования универсальной гриппозной вакцины, способной обеспечить защиту от различных подтипов вируса гриппа А.

Обобщая все вышесказанное, полученные в ходе исследования научные данные могут быть использованы уже сейчас в практике здравоохранения для производства более эффективных гриппозных вакцин.

**Степень достоверности и апробация результатов** этой комплексной работы не вызывает сомнений. Еще раз необходимо отметить проведение клинических исследований, которые были проведены в соответствии с международным стандартом GCP (Good Clinical Practice, Надлежащая

клиническая практика) под соответствующим контролем аккредитованных аудиторов. Все полученные в ходе исследования экспериментальные данные подвергались тщательному статистическому анализу с использованием различных критериев описательной и аналитической статистики. Основные положения диссертации были представлены в 23 докладах на 18 отечественных и международных научных конференциях и симпозиумах в течение последних 8 лет. По материалам диссертационного исследования 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.

При ознакомлении с авторефератом появилось несколько вопросов к соискателю, которые никак не отражаются на качестве работы, а именно:

– в каком регионе, в какое время года и при какой эпидемиологической ситуации по заболеваемости гриппом проводились клинические исследования?

- ведутся ли разработки, аналогичные проводимым в диссертации, для ЖГВ, применяемой в США? Если да, то соотносятся ли их результаты с полученными в данной работе?

Вероятно, что в тексте самой диссертации запрашиваемая информация есть.

Выполненная работа по своей теоретической и практической значимости, новизне и актуальности 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 Исакова – Сивак Ирина Николаевна заслуживает присвоения учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Заместитель руководителя производственного направления  
ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»

д.м.н., профессор

19.11.2018

Г.М. Игнатьев

Почтовый адрес: 108819 поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1, город Москва  
тел: +7 495 841-90-02

e-mail: marburgman@mail.ru ; ignatjev\_gm@chumakovs.su



И.В. Чумакова

Начальник  
Управления персоналом  
МАТЮШИНА О.В.