

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 21.1.017.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ГРИППА ИМЕНИ А.А.СМОРОДИНЦЕВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 24 октября 2023 года № 3 о присуждении Котоминой Татьяне Сергеевне ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Холодоадаптированные вирусы гриппа как платформа для конструирования векторных вакцин на модели респираторно-синцитиального вируса» по специальности 1.5.10 – вирусология принята к защите 18.08.2023 года, протокол № 2, диссертационным советом Д. 21.1.017.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д.15/17).

Соискатель Котомина Татьяна Сергеевна, 1989 года рождения, в 2013 году закончила магистратуру Санкт-Петербургского государственного политехнического университета (ныне Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого) по специальности «Техническая физика». В 2019 году окончила аспирантуру на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по специальности 1.5.10 – «вирусология».

Диссертация выполнена в отделе вирусологии им. А.А. Смородинцева Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины».

Научный руководитель:

Исакова-Сивак Ирина Николаевна, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, заведующая лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ».

Официальные оппоненты:

Масалова Ольга Владимировна – Доктор биологических наук, заведующая лабораторией клеточной инженерии отдела молекулярной вирусологии и противовирусных препаратов подразделения института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Богословская Елена Владимировна – Доктор медицинских наук, заведующая лабораторией разработки методов генной терапии центра постгеномных технологий ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства –

дали положительные отзывы на диссертацию

Ведущая организация – **Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»** Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, в своем положительном отзыве, составленном и подписанным Зарубаевым Владимиром Викторовичем – доктором биологических наук, заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии науки отдела вирусологии указал, что диссертационная работа Котоминой Татьяны Сергеевны на тему «Холодоадаптированные вирусы гриппа как платформа для конструирования векторных вакцин на модели респираторно-синцитиального вируса», представленная на защиту на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология, представляет собой самостоятельно выполненную и законченную научно-квалификационную

работу, содержащую результаты изучения протективных свойств живой гриппозной вакцины, активной в отношении многих вирусов гриппа А. По научной новизне, актуальности, высокому методическому уровню, научной ценности и практической значимости результаты диссертационной работы отвечают требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842), в редакции постановлений Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г. и №748 от 02.08.2016 г., предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.10 – вирусология.

Соискатель имеет 8 опубликованных работ по теме диссертации, из которых 6 научных статей в журналах, входящих в международные системы цитирования и реферативные базы данных Web of Science и/или Scopus, и 8 тезисов докладов на отечественных и международных конференциях. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации.

Основные научные результаты диссертационного исследования опубликованы в рецензируемых научных изданиях:

В обзорной статье «Cold-adapted influenza viruses as a promising platform for viral-vector vaccines» (1) приведены рассуждения о возможности использования вирусов гриппа в качестве вирусных векторов. В статье особое внимание уделено рассмотрению преимуществ холодоадаптированных штаммов вируса гриппа для создания векторных вакцин. Эти данные также были представлены в главе I «Обзор литературы». В статье «Analysis of Immune Epitopes of Respiratory Syncytial Virus for Designing of Vectored Vaccines Based on Influenza Virus Platform» (2) объяснены критерии отбора полиэпитопных кассет РСВ для включения в состав экспериментальных векторных вакцин. Эти данные были изложены в главе III Результаты (раздел 3.1). В статьях «Live attenuated influenza vaccine

viral vector induces functional cytotoxic T cell immune response against foreign CD8+ T-cell epitopes inserted into NA and NS1 genes using the 2A self-cleavage site» (3), «Recombinant live attenuated influenza vaccine viruses carrying CD8 T-cell epitopes of respiratory syncytial virus protect mice against both pathogens without inflammatory disease» (4) и «Neutralizing epitope of fusion protein of respiratory syncytial virus embedded in the HA molecule of LAIV virus is not sufficient to prevent RS virus pulmonary replication but ameliorates lung pathology following RSV infection in mice» (6) представлены материалы, описывающие основные результаты диссертационного исследования. В них описаны модификации, внесенные в вектор ЖГВ для получения рекомбинантные векторных вакцин, результаты анализа свойств рекомбинантных векторных вакцин в системах *in vitro* и *in vivo*, анализ генетической стабильности, иммуногенность, защитная эффективность и безопасность. В статье «Conserved T-cell epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) delivered by recombinant live attenuated influenza vaccine viruses efficiently induce RSV-specific lung localized memory T cells and augment influenza-specific resident memory T-cell response» (5) исследован механизм защитного действия рекомбинантных векторных вакцин, несущих T-клеточные эпитопы РСВ, подчеркнута роль тканерезидентных T клеток памяти (T_{RM}).

Наиболее значимые работы:

1. Isakova-Sivak I. Cold-adapted influenza viruses as a promising platform for viral-vector vaccines / Isakova-Sivak I, **Tretiak T**, Rudenko L. // Expert Review of Vaccines.- 2016.- Vol.15.- №10.- P.1241-1243.

2. Isakova-Sivak IN. Analysis of Immune Epitopes of Respiratory Syncytial Virus for Designing of Vectored Vaccines Based on Influenza Virus Platform / Isakova-Sivak IN, Korenkov DA, Fedorova EA, **Tretiak TS**, Matyushenko VA, Smolonogina TA, Rudenko LG // Bulletin of Experimental Biology and Medicine.- 2016.- Vol.161.- №4.- P.533-537.

3. **Kotomina T**. Live attenuated influenza vaccine viral vector induces functional cytotoxic T cell immune response against foreign CD8+ T-cell epitopes

inserted into NA and NS1 genes using the 2A self-cleavage site / Kotomina T, Korenkov D, Matyushenko V, Prokopenko P, Rudenko L, Isakova-Sivak I // Human Vaccines and Immunotherapeutics.- 2018.- Vol.14.- №12.- P.2964- 2970.

4. **Kotomina T.** Recombinant live attenuated influenza vaccine viruses carrying CD8 T-cell epitopes of respiratory syncytial virus protect mice against both pathogens without inflammatory disease / Kotomina T, Isakova-Sivak I, Matyushenko V, Kim KH, Lee Y, Jung YJ, Kang SM, Rudenko L // Antiviral Research.- 2019.- Vol.168. P.9-17.

5. Matyushenko V. Conserved T-cell epitopes of respiratory syncytial virus (RSV) delivered by recombinant live attenuated influenza vaccine viruses efficiently induce RSV-specific lung localized memory T cells and augment influenza-specific resident memory T-cell responses / Matyushenko V, **Kotomina T**, Kudryavtsev I, Mezhenskaya D, Prokopenko P, Matushkina A, Sivak K, Muzhikyan A, Rudenko L, Isakova-Sivak I // Antiviral Research.- 2020.- Vol.182.- P.104864/

6. **Kotomina T.** Neutralizing epitope of fusion protein of respiratory syncytial virus embedded in the HA molecule of LAIV virus is not sufficient to prevent RS virus pulmonary replication but ameliorates lung pathology following RSV infection in mice / Kotomina T., Isakova-Sivak I., Stepanova E., Mezhenskaya D., Matyushenko V., Prokopenko P., Sivak K., Kiseleva I., Rudenko L // The Open Microbiology Journal.- 2020.- Vol.14.- №1.- P.147-156.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

- 1) Доктора медицинских наук, руководителя группы генно-клеточной инженерии Института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России Головкина Алексея Сергеевича. Отзыв положительный, замечаний нет.
- 2) Доктора биологических наук, доцента Высшей школы биомедицинских систем и технологий Института биомедицинских систем и биотехнологий Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет

- Петра Великого» Карпенко Марины Николаевны. Отзыв положительный, замечаний нет.
- 3) Доктора биологических наук, заведующей лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Министерства образования и науки Российской Федерации Ленёвой Ирины Анатольевны. Отзыв положительный, замечаний нет.
 - 4) Доктора медицинских наук, заслуженного работника высшей школы Российской Федерации, профессора кафедры микробиологии, доцента ФГБВОУ ВО Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова Малышева Владимира Васильевича. Отзыв положительный, замечаний нет.
 - 5) Доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника отдела профилактики и лечения особо опасных инфекций ФГБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Мазурковой Натальи Алексеевны. Отзыв положительный, замечаний нет.
 - 6) Доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника отдела опасных вирусных инфекций ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России Логиновой Светланы Яковлевны. Отзыв положительный, но имеются замечания и вопросы. Автор отзыва отмечает, что в автореферате полученные результаты представлены только в виде диаграмм и графиков, таблицы с данными средних величин с доверительным интервалом или ошибкой репрезентативности отсутствуют. Не видно, из какой подборки рассчитаны средние величины. На диаграммах рисунков 2В, 3Б, 8В титр вируса составляет $1 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, а по тексту – полная защита. Также с точки зрения автора отзыва, положение 2, выносимое на защиту, сформулировано не корректно. Положение должно быть сформулировано в утвердительной форме, не в виде предположения. Встречаются сленговые выражения: «ростовые свойства вируса» (уровень накопления, уровень репродукции, инфекционный титр, концентрация вируса).
 - 7) Доктора медицинских наук, начальника научно-исследовательского управления ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России Петрова Александра

Анатольевича и доктора биологических наук, профессора, ведущего научного сотрудника отдела ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России Лебедева Виталия Николаевича. При общей положительной оценке представленной работы в качестве недостатка следует указать на отсутствие подтверждения её новизны патентами на изобретение.

В отзывах подчеркивается актуальность темы проведенного исследования, отмечается значимость полученных теоретических и практических результатов.

Выбор официальных оппонентов обосновывается их компетентностью в данной области науки, достижениями, большим опытом и наличием публикаций в сфере диссертационного исследования, их согласием на оппонирование и рецензирование настоящей работы и способностью определить теоретическую и практическую ценность выполненной научно-исследовательской работы и произведен в соответствии с требованиями пункта 22 «Положения о порядке присуждении ученых степеней» № 842 от 24.09.2013 г.

Выбор ведущей организации обусловлен тем, что Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека является одним из передовых учреждений, в котором работают признанные специалисты в сфере экспериментальной медицины, молекулярной биологии, вирусологии и иммунологии.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана концепция конструирования векторных вакцин на основе вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины (ЖГВ), используя в качестве модельного патогена респираторно-синцитиальный вирус (РСВ);

предложены три стратегии по генно-инженерной модификации генов гемагглютини́на (НА), нейраминидазы (НА) или неструктурного белка 1 (NS1) вакцинного штамма ЖГВ;

сформулированы критерии отбора полиэпитопных кассет РСВ для встраивания в геном вакцинного штамма ЖГВ: первая кассета была разработана для активации преимущественно В-клеточного иммунного ответа, а вторая – для активации Т-клеточного иммунитета к РСВ;

получены четыре вакцинных штамма ЖГВ подтипа H7N9 на основе донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57, кодирующие полиэпитопные кассеты РСВ. Два вакцинных кандидата экспрессировали фрагмент белка F₂₄₃₋₂₉₄ РСВ с N-конца субъединицы НА1 молекулы НА либо через линкер AAAPGAA (рекомбинантный вакцинный штамм ЖГВ-НА+А-РСВ), либо через линкер (GGGGS)₂ (рекомбинантный вакцинный штамм ЖГВ-НА+G-РСВ). Два других вакцинных кандидата кодировали полиэпитопную Т-клеточную кассету РСВ M2-1 (70-101+114-146) либо в гене НА (рекомбинантный вакцинный штамм ЖГВ+НА/РСВ), либо в гене усеченного до 126 а.к. белка (рекомбинантный вакцинный штамм ЖГВ+NS1/РСВ);

установлено, что полученные рекомбинантные вакцинные штаммы ЖГВ-РСВ являются генетически стабильными и сохраняют чужеродную генетическую информацию в своем геноме в течении 10 пассажей в системе развивающихся куриных эмбрионов;

не **обнаружено** негативное влияние встроенных чужеродных эпитопов РСВ на иммуногенные и протективные свойства рекомбинантных вакцинных штаммов ЖГВ-РСВ в отношении вируса гриппа;

выявлено, что интраназальная иммунизация мышей рекомбинантными вакцинными штаммами ЖГВ, несущими фрагмент белка F₂₄₃₋₂₉₄ РСВ в составе молекулы НА, не приводит к выработке защитных уровней РСВ-специфических антител у мышей, однако препятствует развитию РСВ-индуцированной легочной патологии, что может быть обусловлено формированием РСВ-специфического Т-клеточного ответа;

показано, что интраназальная иммунизация мышей рекомбинантными вакцинными штаммами ЖГВ+NA/PCV и ЖГВ+NS1/PCV приводит к образованию устойчивого, полностью функционального PCV-специфического системного и локального CD8⁺ Т-клеточного иммунного ответа, при этом последующее заражение иммунизированных мышей РС вирусом не приводит к развитию РС-индуцированной легочной патологии.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

предложена новая стратегия конструирования рекомбинантных вакцинных штаммов против респираторных вирусов человека, используя в качестве вирусного вектора штамм отечественной живой гриппозной вакцины;

на модели PCV **сформулированы** принципы отбора иммуногенных участков целевых респираторных вирусов для их последующего инкорпорирования в геном вакцинного штамма ЖГВ;

сконструированы вакцинные прототипы, несущие иммунодоминантные Т клеточные эпитопы, презентруемые на молекулах МНС мышей гаплотипа H-2(d). Изучены механизмы иммунного ответа при иммунизации векторными вакцинами в экспериментальной (мышинной) модели;

установлено, что иммунизация мышей рекомбинантными вакцинными штаммами ЖГВ+NA/PCV и ЖГВ+NS1/PCV обеспечивает защиту от PCV за счет индукции тканерезидентных Т-клеток памяти (T_{RM}) в легочной ткани, которые представляют собой ключевое звено в системе приобретённого иммунитета.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработан комплексный подход к выбору иммуногенных эпитопов респираторных вирусов на модели PCV и их инкорпорированию в геном вакцинного штамма ЖГВ. Используя этот подход можно в дальнейшем создавать векторные вакцины против любых циркулирующих или вновь возникающих респираторных вирусов человека;

определена перспективность создания рекомбинантных **вакцинных** штаммов ЖГВ, кодирующих полиэпитопную Т-клеточную кассету РСВ М2-1 (70-101+114-146) и **установлен механизм** действия таких **вакцин** - иммунизация мышей индуцирует развитие устойчивого, **полностью функционального** РСВ-специфического системного и локального CD8⁺ Т-клеточного иммунного ответа, который обеспечивает защиту иммунизированных животных от размножения РСВ в легких. Также обнаружено, что иммунизация мышей такими рекомбинантными вакцинными штаммами ЖГВ не вызывает вакцин-индуцированную иммунопатологию после заражения РСВ;

установлено, что встраивание фрагмента белка F₂₄₃₋₂₉₄ РСВ в молекулу НА вируса гриппа является недостаточным для индукции защитных уровней РСВ-специфических антител у мышей, однако иммунизация таким химерным вирусом препятствует развитию РС-индуцированной легочной патологии;

представлены рекомендации по дальнейшему развитию данного направления и проведению дизайна Т-клеточных кассет на основании степени иммуногенности целевых эпитопов и данных о частоте встречаемости HLA-аллелей в российской популяции для конструирования векторных вакцин.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что представленные результаты экспериментальных работ были получены на сертифицированном оборудовании с соблюдением известных и распространенных методик обработки данных и оценки их достоверности;

теория диссертационного исследования **построена** на основе сравнительного анализа мирового опыта к подходам разработки рекомбинантных векторных вакцин. Преимущества холодоадаптированных штаммов живой гриппозной вакцины определили их выбор в качестве перспективных вирусных векторов;

идея диссертационного исследования **учитывает** результаты отечественных и зарубежных исследований по разработке векторных вакцин против РСВ;

обоснованность сформулированных **выводов** основана на оценке воспроизводимых результатов, полученных при проведении повторяемых экспериментов по оценке степени репродукции вакцинных кандидатов в системах *in vitro* и *in vivo*, уровня иммуногенности в экспериментах на мышах, оценки состояния легочной ткани после заражения иммунизированных мышей вирулентной дозой РСВ;

использованы современные биоинформационные, молекулярно-генетические, генно-инженерные, вирусологические и иммунологические методы исследования.

Личный вклад соискателя состоит в самостоятельном проведении исследования, включая анализ литературных данных по теме исследования, отбор эпитопов РСВ в полиэпитопные кассеты, получение методами обратной генетики рекомбинантных вакцинных штаммов ЖГВ-РСВ, изучение их фенотипических свойств в системе развивающихся куриных эмбрионов и на клетках млекопитающих, генетической стабильности, иммуногенности, защитной эффективности и безопасности в отношении вируса гриппа и РСВ в экспериментах на мышах. Также автором проведена оценка цитотоксической активности Т-лимфоцитов и популяции тканерезидентных Т-клеток памяти в легочной ткани мышей для вакцинных штаммов ЖГВ и рекомбинантных штаммов ЖГВ-РСВ, статистическая обработка данных, интерпретация и анализ полученных результатов.

Диссертационный совет пришел к выводу о том, что диссертация Котоминой Т.С. «Холодоадаптированные вирусы гриппа как платформа для конструирования векторных вакцин на модели респираторно-синцитиального вируса» представляет собой научно-квалификационную работу и соответствует требованиям, предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук п.9-11 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), и принял решение ПРИСУДИТЬ Котоминой Татьяне Сергеевне ученую

степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.10 – вирусология.

При проведении тайного голосования, диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 16 докторов наук по специальности 1.5.10 – вирусология, участвовавших в заседании, из 20 человек, входящих в состав совета, проголосовали:

За присуждение ученой степени – 17

Против – нет

Недействительных бюллетеней – нет

Председатель

диссертационного совета Д 21.1.017.01,
доктор биологических наук



Жилинская И.Н.

Жилинская И.Н.

Ученый секретарь Д 21.1.017.01,
кандидат биологических наук

Амосова И.В.

Амосова И.В.

26 октября 2023 г.