

## УТВЕРЖДАЮ

Врио генерального директора  
Федерального бюджетного учреждения  
науки «Государственный научный центр  
вирусологии и биотехнологии «Вектор»  
Федеральной службы в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека,  
канцелярии биологических наук



Р.А. Максютов

30 марта 2017 г.

## ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о научно-практической значимости диссертации Ларионовой Натальи Валентиновны на тему «Возбудитель гриппа: изменчивость в природе и эксперименте», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

### Актуальность темы выполненной работы

По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодные эпидемии гриппа приводят к 3–5 миллионам случаев тяжелой заболеваемости и к 250–500 тысячам смертельных исходов (ВНО, 2009). Еще более серьезную угрозу здоровью человечества представляют периодически вспыхивающие пандемии гриппа.

Эффективным методом профилактики заболеваемости и развития эпидемий гриппа является вакцинация.

Исследование Н.В. Ларионовой выполнено в отделе вирусологии ФБГНУ «Института экспериментальной медицины», коллективу которого принадлежит мировой приоритет в разработке интраназальной живой гриппозной реассортантной вакцины (ЖГВ). ЖГВ многократно доказала в клинических исследованиях свою безопасность и эффективность.

Существенным осложнением в получении штаммов для современных сезонных гриппозных вакцин является непрерывная изменчивость антигенных и таких свойств

циркулирующих вирусов гриппа, как температурочувствительность, холодоустойчивость репродукции, чувствительность к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови.

Пандемия гриппа 2009 года и пандемический потенциал высокопатогенных вирусов гриппа птиц демонстрируют необходимость быстрой разработки эффективных вакцинных препаратов против подобных патогенов.

Реассортантная ЖГВ наследует аттенуирующие свойства от доноров аттенуации, полученных в лаборатории мутантных вирусов гриппа. Доноры аттенуации вместе с генами, кодирующими внутренние белки, передают штаммам ЖГВ мутации, приводящие к холодоустойчивости и температурочувствительности репродукции. Стабильность аттенуирующих свойств вакцинных реассортантов зависит от чистоты линий доноров аттенуации, которые должны иметь четкие молекулярно-генетические характеристики. В диссертации Н.В. Ларионовой представлены исследования по наследованию аттенуирующих свойств реассортантами, полученными от скрещивания доноров аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и В/СССР/60/69 и эпидемических вирусов гриппа, дана молекулярно-генетическая характеристика полученной чистой линии донора аттенуации В/СССР/60/69.

Актуальность диссертационного исследования Н.В. Ларионовой не вызывает сомнений, поскольку работа направлена на изучение эволюции биологических свойств естественно циркулирующих возбудителей гриппа во взаимосвязи с решением серьезной проблемы здравоохранения: эффективной разработки штаммов для живых гриппозных вакцин против сезонного и пандемического гриппа.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа построена по традиционному плану и содержит введение, основную часть, включающую обзор литературы из трех глав, материалы и методы исследования, три главы собственных исследований, обсуждение, заключение, выводы и приложения. Во Введении автором обоснована актуальность исследований, сформулированы цель и задачи работы, ее научная новизна и практическая значимость. Диссертация написана хорошим литературным языком. Обзор литературы из трех глав представлен на современном научном уровне и глубоко раскрывает проблему исследования. Работа изложена на 336 страницах машинописного текста, включает 89 таблиц, 23 рисунка и 3 приложения из 40 страниц. Список литературы состоит из 548 цитируемых отечественных и зарубежных источников и списка из 68 публикаций автора, ссылки на которые приводятся в разделе «Заключение».

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна**

Достоверность и объективность выносимых на защиту положений и выводов диссертации подтверждается значительным объемом исследований, большим фактическим материалом, использованием современных вирусологических и молекулярно-генетических методов исследований, статистической обработкой и глубоким осмыслением результатов.

Впервые исследованы молекулярно-генетические характеристики клонированного донора аттенуации, используемого для отечественной ЖГВ В/СССР/60/69 и вакцинных штаммов на его основе. Исследована роль взаимного влияния различного сочетания генов донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и эпидемических вирусов гриппа А. Впервые установлено, что мутации в генах PB2 и PA обеспечивают формирование *ts* фенотипа донора аттенуации В/СССР/60/69. Мутация в гене PB1 также привносит вклад в температурочувствительность донора аттенуации В/СССР/60/69. За проявление *sa* фенотипа (холодоадаптированность) ответственны мутации в гене PA.

Впервые продемонстрирована универсальность роли мутаций в генах полимеразного комплекса в аттенуации холодоадаптированных реассортантов как вирусов гриппа А, так и В.

Проведена ретроспективная оценка естественной эволюции признака температурочувствительности у циркулирующих вирусов гриппа А и В. Продемонстрирована цикличность эволюционной изменчивости вирусов гриппа по признаку чувствительности к температуре репродукции и связь этого признака с изменением эпидемических потенциалов вирусов.

Установлены различия между вирусами гриппа В двух эволюционных ветвей по признаку чувствительности к ингибиторам неиммунной сыворотки крови лошади, что является отражением различий в их рецепторной специфичности.

Получено свидетельство комплексного участия гемагглютинина и нейраминидазы вирусов гриппа в проявлении свойства чувствительности / устойчивости к сывороточным ингибиторам, что служит опосредованным указанием на взаимное участие белков HA и NA в рецепторном взаимодействии с чувствительной клеткой.

Создан новый методический подход к получению вакцинных реассортантов на основе высокопатогенных вирусов гриппа птиц А(H5N1) и донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57(H2N2).

Усовершенствованы и разработаны новые эффективные экспресс-методы оценки состава генома реассортантов.

#### **Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов**

Фундаментальным вкладом представленной работы в вирусологию гриппа являются установленные закономерности эволюции биологических свойств циркулирующих вирусов гриппа А и В, основанные на многолетних наблюдениях, молекулярно-генетическая

характеристика донора аттенуации В/СССР/60/69 для российской ЖГВ, сформулированные представления о единстве молекулярных основ проявления холодоадаптированного, температурочувствительного и аттенуированного фенотипа донорами аттенуации А и В, выявление взаимного участия белков гемагглютинина и нейраминидазы вирусов гриппа в проявлении свойства чувствительности / устойчивости к неспецифическим ингибиторам сыворотки крови.

Практическая значимость работы. Регулярно, с 1995 года по настоящее время, штаммы ЖГВ передаются в ФГУП «НПО “Микроген”» Минздрава России для промышленного производства интраназальной живой гриппозной аттенуированной вакцины для взрослых и для детей.

За 1995–2015 гг. автором подготовлено и передано в «Микроген» 19 штаммов на основе сезонных вирусов гриппа А(Н1N1), (Н3N2), В и пандемического вируса гриппа А(Н1N1)pdm. Подготовленные автором холодоадаптированные реассортантные штаммы ЖГВ депонированы в Государственных коллекциях вакцин на базе ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» Министерства здравоохранения России и Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения России.

Кроме того, разработаны штаммы ЖГВ к потенциально пандемическим высокопатогенным вирусам гриппа А(Н5N1) и А(Н3N3)v.

Доклинические испытания ЖГВ на основе пандемического А(Н1N1)pdm09 и потенциально пандемических А(Н5N1) вирусов гриппа подтвердили генетическую стабильность мутаций, обеспечивающих фенотип аттенуированных штаммов, иммуногенность и протективную активность ЖГВ. В клинических исследованиях продемонстрирована генетическая стабильность аттенуирующих мутаций, хорошая приживляемость и отсутствие трансмиссивности непривитым лицам группы плацебо.

В соответствии с договором с ВОЗ отдел вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» с 2009 года передает штаммы реассортантной ЖГВ в развивающиеся страны для производства на их основе национальных вакцин.

ЖГВ к вирусу гриппа А(Н1N1)pdm09, а затем и к сезонным вакцинам были переданы в Индию (SII), где к настоящему времени выпущено 3 миллиона доз вакцины Nasovac<sup>®</sup>, а в 2010 году было привито 2,5 миллиона человек вакциной к пандемическому гриппу А(Н1N1)pdm09, в Таиланд (GPO), где ЖГВ к вирусу А(Н1N1)pdm09 была зарегистрирована, и в Китай (BCNT), где ЖГВ на основе подготовленных в отделе вирусологии штаммов, в том числе авторских, проходят клинические испытания.

За разработку вакцинного штамма для производства ЖГВ для взрослых и детей к пандемическому вирусу гриппа А/Калифорния/07/2009 (Н1N1)pdm (патент РФ № 2413765)

авторы были удостоены диплома Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам в номинации «100 лучших изобретений России».

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

По материалам диссертационных исследований автором опубликовано 49 научных статей, включая 16 статей в журналах, рекомендованных ВАК, и 14 – в журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования. Получено 19 патентов на изобретения РФ. Публикации автора полностью включают диссертационные исследования, о чем наглядно свидетельствуют ссылки на собственные публикации по каждому пункту в разделе «Заключение».

#### **Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Автором предложены методические рекомендации к получению штаммов реассортантной ЖГВ на основе вирусов гриппа с различными биологическими характеристиками, в том числе не только вирусов гриппа человека, но и потенциально пандемических вирусов гриппа птиц. В оценке генетической стабильности аттенуирующих мутаций штаммов ЖГВ на основе вирусов гриппа В необходимо применение результатов молекулярно-генетического анализа донора аттенуации В/СССР/60/69.

Разработанные модификации метода получения аттенуированных реассортантных штаммов живой гриппозной вакцины на основе современных вирусов гриппа используются в отделе вирусологии ФГБНУ «ИЭМ» и в Центре по контролю и предупреждению заболеваний (CDC, Атланта, США).

#### **Замечания**

Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы нет. К сожалению, приходится отметить некоторую небрежность в использовании автором некоторых терминов и понятий. Так, на стр. 111 автор пишет «В первичной последовательности генов донора В60/525 выявлено восемь кодирующих мутаций». Выражения «первичная последовательность» и «кодирующая мутация» встречаются по тексту диссертации неоднократно. На стр. 56: «Высокопатогенные вирусы H1N1pdm1918 и H5N1 объединяет способность вызывать аномальные врожденные иммунные реакции у мышей и нечеловеческих приматов». На стр. 35 неверно процитирована работа N. Marshall и соавторов: автор диссертации пишет о появлении большого количества реассортантов при дозе заражения  $10^6$  БОЕ на клетку, в то время как в статье речь идет о реассортантах после заражения морских свинок дозой вируса  $10^6$  БОЕ.

**Соответствие диссертации критериям пункта 9 Положения о присуждении ученых степеней (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842)**

На основании представленных материалов можно сделать вывод о том, что диссертация Н.В. Ларионовой является законченным научно-исследовательским трудом, имеющим существенное значение для фундаментальной науки и практического здравоохранения. Полученные автором результаты достоверны, выводы и заключения обоснованы. Работа базируется на значительном числе исходных данных.

Содержание автореферата в достаточной мере отражает содержание диссертации.

Диссертационная работа Н.В. Ларионовой «Возбудитель гриппа: изменчивость в природе и эксперименте» по актуальности, объему проведенных исследований, методическому уровню, научной новизне и практической значимости полученных результатов полностью отвечает требованиям пункта 9 Положения о присуждении ученых степеней (утв. Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842), предъявляемым ВАК Российской Федерации к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.02 – «Вирусология», а ее автор может представить работу к защите по специальности 03.02.02 – «Вирусология».

**Отзыв на диссертацию и автореферат Ларионовой Натальи Валентиновны рассмотрен и утвержден на заседании Ученого Совета Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 10 марта 2017 года.**

Доктор биологических наук, доцент,  
заведующая лабораторией серодиагностики гриппа  
отдела зоонозных инфекций и гриппа  
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора,  
630559 Новосибирская область, р.п. Кольцово,  
+7(383) 336-60-10  
[ilicheva\\_tn@vector.nsc.ru](mailto:ilicheva_tn@vector.nsc.ru)

 Т.Н. Ильичева

Подпись Т.Н. Ильичевой заверяю:  
Ученый секретарь ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора,  
кандидат биологических наук, доцент



 О.А. Плясунова

10.03.2017 г.