

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Чикаева Антона Николаевича «Пептиды-имитаторы эпитопов ВИЧ-1, узнаваемых нейтрализующими антителами широкого спектра действия», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

Диссертационная работа А. Н. Чикаева является одним из научных направлений для решения **актуальной проблемы** создания эффективной вакцины против вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1) – инфекционного агента, вызывающего Синдром Приобретенного Иммунодефицита человека (СПИД). Из всего комплекса мероприятий по борьбе со СПИДом вакцинация представляется единственно реальным подходом для предотвращения эпидемии этого заболевания. Для преодоления главного препятствия в создании профилактической вакцины против ВИЧ инфекции – беспрецедентной генетической изменчивости вируса - автором диссертационной работы используется современный перспективный метод, а именно создание вакцины, способной индуцировать синтез нейтрализующих антител (bnAbs), способных эффективно связываться с консервативными участками вирусных белков, так называемыми сайтами уязвимости, практически не подверженными мутагенезу. Такие антитела обладают нейтрализующей активностью в отношении большого разнообразия штаммов и первичных изолятов ВИЧ-1.

Новизна и значимость исследования А. Н. Чикаева в том, что работа направлена на создание рекомбинантной конструкции, которая экспонирует эпитопы вируса в виде линейных аминокислотных последовательностей, имитирующих нативные конформационные участки поверхностных гликопротеинов ВИЧ-1. Предполагается, что при иммунизации она будет индуцировать образование одного или нескольких нейтрализующих антител, обладающих сходными с bnAbs-прототипами характеристиками.

Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста, написана по традиционной схеме, имеет все необходимые разделы : введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты и

их обсуждение, выводы, список цитируемой литературы (184 наименования). Включает 20 рисунков и 13 таблиц.

Задача исследовательской работы А. Н. Чикаева заключалась в получении с помощью техники фагового дисплея пептидов-имитаторов эпитопов, узнаваемых тремя известными моноклональными нейтрализующими антителами (bNAbs) Z13e1, IgG1b12 и VRC01, и изучении их антигенных и иммуногенных свойств *in vivo*. С каждым из этих антител проведена работа по сходной схеме - отбор из комбинаторных пептидных библиотек клонов бактериофагов, связывающиеся с каждым из антител; определение аминокислотных последовательностей пептидов, экспонируемых на поверхности отобранных бактериофагов; проведение анализа специфичности связывания отобранных фаговых клонов с моноклональными антителами с помощью иммуноблотинга; оценка способности селектированных пептидов/фаговых клонов подавлять нейтрализующую активность изучаемых антител в реакции вирус-нейтрализации с использованием модели псевдовирусов; изучение иммуногенных свойств отобранных фаговых клонов/пептидов и их способность индуцировать нейтрализующие ВИЧ-1 антитела.

В обзоре литературы автором диссертационной работы приведены данные о жизненном цикле ВИЧ1, особенностям его взаимодействия с иммунной системой хозяина и ускользания от ее эффекторных механизмов. Особое внимание уделено описанию проблем вакцинации против ВИЧ1 – трудностей и основных стратегий в создании вакцин. Главная часть **Обзора литературы** посвящена открытию у пациентов с ВИЧ инфекцией нейтрализующих ВИЧ-1 антител широкого спектра действия, связывающихся с консервативными участками вирусных белков, не подверженных мутагенезу. На основании этих данных перспективной выглядит идея создания вакцин, способных индуцировать выработку подобных антител, используя в качестве иммуногенов линейные пептиды-имитаторы конформационных гликопротеиновых сайтов связывания антител.

В главе **Материалы и методы** подробно описаны имеющиеся в распоряжении автора исследования фаговые пептидные библиотеки, метод аффинной селекции пептидов, связывающихся с тремя моноклональными антителами, нейтрализующими ВИЧ1, дальнейшие процедуры выделения и наработки индивидуальных целевых фаговых клонов, дот блот анализа и вестерн блот анализа, получения антисывороток к целевым клонам бактериофагов путем иммунизации кроликов и мышей, получение штаммов

псевдовирусов, проведение реакции вируснейтрализации, методы биоинформационного анализа. Одно лишь перечисление методов свидетельствует о том, что работа выполнена на высоком методическом уровне, отвечающем мировым стандартам.

А. Н. Чикаевым в ходе проведения исследования получены **результаты**, имеющие **фундаментальное и практическое значение**. С помощью аффинной селекции из фаговых библиотек отобраны клоны, несущие пептиды, специфично взаимодействующие с bNAbs Z13e1, IgG1b12 и VRC01. Определены аминокислотные последовательности пептидов, экспонированных в составе отобранных фагов. Обнаружены консенсусные мотивы в аминокислотных последовательностях пептидов, связывающихся с bNAbs VRC01 и Z13e1. Подтверждена специфичность взаимодействия пептидов, выявленных в составе отобранных фагов, с нейтрализующими антителами широкого спектра действия Z13e1, IgG1b12 и VRC01. Впервые установлено, что отобранные пептиды-имитаторы способны конкурировать с ВИЧ-1 (штамм NL4-3) за связывание с нейтрализующими ВИЧ-1 антителами широкого спектра действия IgG1b12 и VRC01 в реакции вируснейтрализации.

Впервые показано, что пептиды-имитаторы, отобранные по способности связываться с антителом VRC01, имитируют фрагмент петли gp120 в области связывания с CD4-рецептором. Для изучения иммуногенности пептидов в составе фаговых частиц последние были наработаны в препаративных количествах для иммунизации лабораторных животных и получения сывороток с целью изучения их вируснейтрализующей активности. Показано, что антисыворотки к фагам, содержащим идентифицированные пептиды-миметики эпитопов, узнаваемых антителами Z13e1, IgG1b12 и VRC01, проявляют нейтрализующую активность в отношении псевдовирусов, полученных на основе ВИЧ-1 субтипов А, В и AG.

Замечания:

1. В обзоре литературы при обсуждении стратегий защиты не уделено внимания роли факторов врожденного иммунитета в резистентности к ВИЧ1 и в их взаимодействии с вирусом в развитии инфекции. Между тем известно, при создании вакцины необходимо учитывать, что иммуногенность зависит от узнавания иммуногена факторами врожденного иммунитета (связывание С3 компонента комплемента и

