

"УТВЕРЖДАЮ"

Директор ФГБУ «ГНЦ Институт
иммунологии» ФМБА России,

доктор медицинских наук

профессор



М.Р.Хаитов

05 2015 г.

ОТЗЫВ

**о научно-практической значимости диссертации А.Н. Чикаева
«Пептиды-имитаторы эпитопов ВИЧ-1, узнаваемых нейтрализующими
антителами широкого спектра действия»
на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности «03.01.03 – молекулярная биология»**

Актуальность темы диссертации

Пандемия ВИЧ-инфекции/СПИДа является одной из глобальных проблем мирового здравоохранения и борьба с ней признана ООН одной из целей тысячелетия. Заболевание продолжает распространяться, несмотря на широкое применение в медицинской практике антиретровирусной терапии, и это определяет чрезвычайную важность создания вакцины против ВИЧ-инфекции. Исследования по разработке анти-ВИЧ/СПИД-вакцин стали предметом широкого научного сотрудничества, в котором участвуют ведущие мировые

научные коллективы, в том числе и российские. Трудности в создании вакцины против ВИЧ-инфекции в значительной мере связаны с высокой генетической вариабельностью вируса и недостаточными знаниями о коррелятах иммунной защиты от патогена. Важным направлением исследований по разработке анти-ВИЧ-вакцин является поиск антигенов, способных индуцировать образование антител, нейтрализующих широкий спектра изолятов ВИЧ-1 (широконейтрализующих антител). Диссертационная работа Чикаева А.Н. посвящена выявлению и получению пептидов-миметиков, узнаваемых нейтрализующими ВИЧ-1 антителами широкого спектра действия, изучению их молекулярной структуры и иммуногенных свойств. Полученные в работе пептиды, имитирующие нейтрализационные эпитопы ВИЧ-1, могут стать основой для конструирования искусственных иммуногенов при создании профилактических кандидатных вакцин против ВИЧ-инфекции. Диссертационная работа имеет высокую актуальность, посвящена исследованию крупной научной проблемы и непосредственно связана с решением важной проблемы здравоохранения.

Основные результаты работы, их достоверность и новизна

Применение технологии фагового дисплея и пептидных библиотек позволило автору провести селекцию оригинальных, ранее не описанных пептидов, имитирующих нейтрализационные эпитопы ВИЧ-1. Это изначально определило научную новизну полученных результатов. Из библиотек бактериофагов были отобраны клоны, специфически взаимодействующие с моноклональными антителами Z13e1, IgG1b12 и VRC01. Эти моноклональные антитела были предоставлены автору в рамках международного научного сотрудничества, они хорошо охарактеризованы и обладают нейтрализующей активностью в отношении широкого спектра изолятов ВИЧ-1. Была определена

первичная структура рандомизированных пептидов, экспонированных в составе поверхностных белков отобранных фагов, и проведен их сравнительный анализ. В результате идентифицированы консенсусные мотивы в аминокислотных последовательностях пептидов, связывающихся с антителами VRC01 и Z13e1. С помощью иммуноблотинга была показана специфичность взаимодействия пептидов, выявленных в составе отобранных фагов, с антителами Z13e1, IgG1b12 и VRC01. При дальнейшей оценке антигенных свойств отобранных пептидов были определены те из них, которые были способны конкурировать с ВИЧ-1 (NL4-3) за связывание с антителами IgG1b12 и VRC01 в реакции вирус-нейтрализации. Компьютерный анализ, проведенный при помощи программного обеспечения rdMap с использованием трехмерной модели комплекса gp120-VRC01-пептид, показал, что отобранные пептиды-имитаторы по крайней мере частично соответствуют фрагменту CD4-связывающей петли. При иммунизации лабораторных животных отобранными фаготопами были получены сыворотки, которые проявляли нейтрализующую активность в отношении псевдовирусов, полученных на основе ВИЧ-1 субтипов А, В и AG. Таким образом, отобранные пептиды, представленные на бактериофагах, вызывают выработку нейтрализующих ВИЧ-1 антител, тем самым проявляя свойства миметиков антигенных детерминант вируса.

Достоверность полученных результатов обеспечена применением современной научно-методической базы, использованием фаговых библиотек, хорошо охарактеризованных моноклональных антител, пептидов, плазмид. Автором был выполнен значительный объем исследовательской работы с постановкой независимых экспериментов и надлежащих контролей, применен метод пространственного компьютерного моделирования. Данные обработаны с помощью адекватных методов математической статистики.

Значимость полученных результатов для науки и практики

Создание анти-ВИЧ/СПИД-вакцины представляет собой фундаментальную научную проблему. Существенным аспектом этой проблемы является разработка иммуногенов, способных индуцировать образование нейтрализующих антител широкого спектра действия. Настоящая работа стала значимым этапом на пути к решению этой важной задачи. Автором идентифицированы новые пептиды, имитирующие нейтрализационные эпитопы белков ВИЧ-1, определены консенсусные мотивы в линейных пептидах, обеспечивающие взаимодействие нейтрализующих моноклональных антител с ВИЧ-1, выявлено соответствие консенсусной последовательности 12-мерных линейных пептидов участку gp120 в районе CD4-связывающей петли.

Результаты исследования имеют также несомненное научно-практическое значение. Они могут быть применены для конструирования иммуногенов для вакцин против ВИЧ-инфекции. Кроме того, разработанные автором иммуногены могут найти применение для оценки иммунного ответа при проведении лабораторных и клинических испытаний кандидатных анти-ВИЧ-вакцин. Предлагаемый автором подход также может быть использован при создании средств иммунопрофилактики не только против ВИЧ-инфекции, но и против других вирусных патогенов.

Результаты и выводы работы могут быть использованы в образовательном процессе в высших учебных заведениях по специальностям «молекулярная биология», «вирусологии», «иммунологии», а также в научно-исследовательских институтах, занимающихся проблемами ВИЧ-инфекции.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Чикаева А.Н. изложена на 118 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 20 рисунками и 13 таблицами, список цитированной литературы содержит 184 ссылки (в том числе 9 – на отечественные, 175 – на зарубежные источники).

В обзоре литературы автор рассматривает современные представления о биологии ВИЧ-1 и гуморальном иммунном ответе организма против данного вируса. Описаны основные типы разрабатываемых вакцин против ВИЧ-инфекции/СПИДа, рассмотрены современные тенденции и подходы в области разработки анти-ВИЧ-вакцин. Основной акцент сделан на область исследований, посвященных поиску и характеристике антител, способных нейтрализовать широкий спектр изолятов ВИЧ-1. Описаны подходы по созданию иммуногенов, индуцирующих образование подобных антител, в том числе с использованием метода фагового дисплея. Информация представлена достаточно полно.

В разделе «Материалы и методы» представлен спектр примененных автором современных методов молекулярной вирусологии и иммунохимии. В работе использовалась технология фагового дисплея, различные виды иммуноферментного анализа, манипуляции с культурами клеток и бактерий, иммунизация лабораторных животных и получение сывороток, метод вирус-нейтрализации с использованием псевдовирюсов, метод конкурентного ингибирования, методы молекулярного докинга и построения пространственных структур полипептидных комплексов. Методы исследования описаны достаточно подробно, что говорит о высоком уровне методической квалификации, необходимом для выполнения поставленных задач.

В главе «Результаты и обсуждение» подробно описано получение пептидов-имитаторов эпитопов, узнаваемых нейтрализующими ВИЧ-1 антителами Z13e1, IgG1b12, VRC01. Далее охарактеризована аффинная селекция потенциальных пептидов-миметиков из фаговых пептидных библиотек и приведены данные изучения их антигенных свойств. Для этого использовался дот-блот анализ, а также ставилась реакция конкурентного ингибирования. В частности, было показано, что химически синтезированные пептиды, экспонированные на поверхности отобранных фагов, при постановке реакции вирус-нейтрализации конкурировали с ВИЧ-1 (NL4-3) за связывание с VRC01.

Отдельный раздел посвящен изучению иммуногенных свойств отобранных пептидов в составе белков оболочки бактериофагов, включая получение иммунных сывороток и анализ их нейтрализующей активности. Полученные в результате иммунизации сыворотки продемонстрировали нейтрализующую активность в отношении env-псевдотипированных частиц, полученных на основе ВИЧ-1 различных штаммов

Также в данной главе автор приводит результаты компьютерного анализа аминокислотных последовательностей пептидов, взаимодействующих с антителом VRC01, и построенную на основе полученных данных модель комплекса gp120-VRC01 и отобранных пептидов. Данная модель рассматривается автором как дополнительное подтверждение того, что отобранные пептиды проявляют свойства имитаторов антигенных детерминант ВИЧ-1, узнаваемых нейтрализующими антителами.

В разделе «Заключение» автор обобщает полученные результаты и делает вывод об их фундаментальной и прикладной значимости.

Выводы обоснованы данными экспериментальных исследований, логично сформулированы.

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертационной работы нет.

Основные материалы диссертации опубликованы в 18 работах, в том числе 4 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций (3 статьи в российских научных журналах, 1 статья – в зарубежном), а также 14 публикациях в материалах российских и международных конференций и конгрессов.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Чикаева Антона Николаевича «Пептиды-имитаторы эпитопов ВИЧ-1, узнаваемых нейтрализующими антителами широкого спектра действия» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.01.03 – молекулярная биология» является научно-квалификационной работой, в которой решены задачи, имеющие большую важность для молекулярной биологии, а также вакцинологии: с помощью технологии фагового дисплея произведен отбор новых пептидов, имитирующих нейтрализационные антигены ВИЧ-1; подтверждена специфичность их взаимодействия с широконейтрализующими антителами Z13e1, IgG1b12 и VRC01; выявлены пептиды, способные конкурировать с ВИЧ-1 (NL4-3) за связывание с антителами IgG1b12 и VRC01 в реакции вирус-нейтрализации; идентифицированы консенсусные мотивы пептидов; с помощью компьютерного моделирования комплекса gp120-VRC01-пептид показано соответствие трехмерной структуры исследованных пептидов фрагменту CD4-связывающей петли ВИЧ-1, а также на модели псевдовирусов показана способность отобранных пептидов индуцировать выработку ВИЧ-нейтрализующих антител, что в совокупности делает исследованные пептиды

