

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Регузовой Алёны Юрьевны «Исследование специфической активности
полиэпитопных Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов, полученных с
использованием различных стратегий проектирования», представленную на
соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.03 – молекулярная биология

Разработка эффективной вакцины против ВИЧ-1 имеет глобальный научный приоритет, так как именно вакцинация окажет наибольшее сдерживающее воздействие на распространение вируса ВИЧ-1. Попытки создания успешной вакцины многочисленны, но максимальный уровень эффективности, которого удалось достичь, составляет 31,2 %. Таким образом, проблема разработки ВИЧ-1 иммуногенов, способных вызывать защитный иммунитет, остается нерешенной. Кроме того, накопленные результаты испытаний полиэпитопных вакцин против ВИЧ-1 позволяют задуматься относительно новых стратегий повышения их иммуногенности.

Диссертационная работа А.Ю. Регузовой посвящена решению этой крайне актуальной задачи, базируясь на современном понимании особенностей внутриклеточного процессинга и презентации антигенов, которое создало предпосылки для рационального конструирования высоко иммуногенных Т-клеточных вакцин. Исследование влияния оптимизации структуры иммуногенов и роли дополнительных сигнальных последовательностей, обеспечивающих представление антигенов по пути МНС I и МНС II рестрикции, на величину индуцируемого ВИЧ-специфического CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточного ответа, является важным и необходимым этапом в направлении решения актуальной проблемы создания эффективной вакцины против ВИЧ-1.

Перед автором стояло три основные задачи. Во-первых, получить ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие полиэпитопные Т-клеточные ВИЧ-1

иммуногены, разработанные с учетом особенностей процессинга и презентации Т-клеточных антигенов по пути МНС I и МНС II класса, и подтвердить экспрессию продуктов целевых генов *in vitro*. Во-вторых, исследовать способность полученных конструкций стимулировать ВИЧ-специфические ответы CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у мышей линии BALB/c. В-третьих, сравнить в одних условиях возможные стратегии повышения иммуногенности ДНК-вакцинных конструкций, включая оптимизацию структуры Т-клеточного иммуногена и использование дополнительных сигнальных последовательностей (N-концевого убиквитина, N-концевой сигнальной последовательности белка E3/gp19K аденовирусов в комбинации с С-концевым тирозиновым мотивом LAMP-1), и выбрать наиболее эффективный вариант.

Широкий круг как классических, так и самых современных методов, привлеченных А.Ю. Регузовой для решения поставленных задач, позволили ей получить важную информацию для дальнейшего дизайна полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов в рамках создания вакцины против ВИЧ-1. Так, диссертантом было показано, что оптимизации структуры искусственной полиэпитопной конструкции недостаточно, чтобы обеспечить высокий уровень ответа CD8⁺ Т-лимфоцитов. Чтобы повысить ее иммуногенность, необходимо направить полиэпитопный белок для деградации либо в лизосому, либо в протеасому. При сравнении этих двух подходов автор утверждает, что убиквитин-зависимое нацеливание полиэпитопного белка на протеасому, является более предпочтительным, так как оно обеспечивает более выраженный ответ как CD8⁺, так и CD4⁺ Т-лимфоцитов.

Большого внимания заслуживает научно-практическая значимость представленной диссертации, поскольку полученные А.Ю. Регузовой результаты по исследованию различных стратегий проектирования полиэпитопных иммуногенов, обеспечивающих эффектный Т-клеточный ответ, вносят большой вклад как для создания вакцин против ВИЧ-1, так и для других возбудителей инфекций человека и животных.

Вторая часть работы включает уникальные данные, полученные в рамках I фазы клинических испытаний вакцины против ВИЧ-1. Впервые в России автором применен метод пептид-МНС-пентамеров для исследования формирования ВИЧ-специфических CD8⁺ Т-лимфоцитов у вакцинированных «КомбиВИЧвак» добровольцев. Полученные результаты позволили с уверенностью говорить о том, что выбранные эпитопы в составе полиэпитопного иммуногена TCI проходят правильный процессинг и представление Т-лимфоцитам *in vivo*, в результате чего формируются ВИЧ-специфические CD8⁺ ЦТЛ. Эти данные являются важным свидетельством в пользу рациональности использования полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов в составе ДНК-вакцин. В диссертации наглядно представлен большой потенциал метода пептид-МНС-мультимеров для исследований различных аспектов иммуногенности полиэпитопных вакцин.

Подводя итог анализу результатов, полученных А.Ю. Регузовой, можно сделать следующее заключение. Диссертационная работа «Исследование специфической активности полиэпитопных Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов, полученных с использованием различных стратегий проектирования» является завершенным исследованием, которое проведено автором самостоятельно на высоком методическом уровне. Поставленные в диссертационной работе задачи выполнены в полном объеме. Достоверность экспериментальных данных обеспечивается использованием современных средств и методик проведения исследования. В целом, результаты, полученные автором, вносят существенный вклад в разработку новых стратегий конструирования эффективной Т-клеточной вакцины против ВИЧ-1 и совершенствование методов для оценки Т-клеточного ответа. Полученные диссертантом результаты являются оригинальными, достоверными и прошли апробацию в виде опубликованных 4-х статей, две из которых - в зарубежных журналах, индексируемых в PubMed, Web of Science и Scopus, а также в процессе их представления и обсуждения на

множестве отечественных и зарубежных конференций. Выводы соответствуют задачам и результатам исследования.

Диссертация А.Ю. Регузовой имеет традиционную структуру, изложена на 150 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы «Результаты и обсуждения», заключения и выводов. Работа содержит 8 таблиц 20 рисунков. Список цитируемой литературы включает 310 ссылок на работы отечественных и зарубежных авторов. Обзор литературы состоит из систематизированной информации относительно истории создания вакцины против ВИЧ-1, в том числе автор делает акцент на разработку полиэпитопных вакцин против ВИЧ-1 для индукции Т-клеточного ответа и стратегиям их конструирования. Кроме этого, детально рассматриваются методы исследования Т-клеточного иммунного ответа. Видно, что диссертант внимательно изучил и осмыслил обширную литературу по исследуемому вопросу. В главе «Материалы и методы» приводятся подробные протоколы многих современных молекулярно-биологических и иммунологических методов, примененных в исследованиях, что добавляет ценность диссертационной работе. Основным раздел работы «Результаты и обсуждения» представляет собой детальное и последовательное изложение результатов, полученных в ходе выполнения поставленных задач, а также вполне конкретное их обсуждение. Материал изложен логично и ясно, без каких-либо серьезных неточностей, хорошо проиллюстрирован. Выводы, сделанные А.Ю. Регузовой, согласуются с результатами, полученными в работе и отражают ее суть.

Аннотация полностью соответствует содержанию диссертации.

В качестве общего впечатления по диссертационной работе следует отметить, что серьезных недостатков в представленной работе нет, хотя имеется ряд замечаний по содержанию и оформлению диссертации:

1. В работе не обсуждается, для каких групп населения может быть применена «КомбиВИЧвак». Нужно ли применять вакцину для

определенных групп риска, и есть ли необходимость стратифицировать группы риска по МНС I и МНС II фенотипу для получения максимального эффекта.

2. В Таблице 2 представлены эпитопы белков Env, Gag Pol, Nef и Tat, выбранные для дизайна целевых иммуногенов CD8⁺ Т лимфоцитов. В тексте диссертации не обсуждается почему (аффинитет) выбранных эпитопов (пептидов) с другими молекулами МНС не указан. Являются ли предсказанные взаимодействия пептидов с другими МНС аллелями меньше чем 6,3 ($pIC_{50} < 6,3$ – низко аффинные пептиды) или это не проверялось.
3. Отрицательный контроль на Рис. 10Б не выглядит убедительным. Практически отсутствует популяция НЕК-293Т клеток не окрашенная с 29F2 антителами. Это снижает впечатление от результатов внутриклеточного определения полиэпитопных белков TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3 с помощью 29F2 антител.
4. На Рисунках 13-16 не показан отрицательный контроль (иммунизация с pcDNA 3.1) продукции цитокинов на 35 и 72 день эксперимента. Не понятно, почему было принято решение не тестировать продукцию цитокинов *in vitro* у контрольной группы мышей в эти сроки.

Необходимо заметить, что отмеченные недостатки никак не снижают общего очень хорошего впечатления от диссертационной работы А.Ю. Регузовой, поскольку они не влияют на главные теоретические и практические результаты диссертации.

Все выше изложенное позволяет сделать заключение, что диссертационная работа соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ, утвержденных Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г. предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Регузова Алёна

Юрьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

«14» мая 2015 г.

Шаповал Андрей Иванович

Директор Российско-Американского
противоракового центра АлтГУ, к.б.н.

andreichapoval@gmail.com, 8-(3852)-298-142
656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, каб. 114

Шаповал А.И.

ПОДПИСЬ ЗАВЕРЯЮ
НАЧ ОТДЕЛА ПО РСОП
УК МОКЕРОВА ЕВ

