

"УТВЕРЖДАЮ"

Директор ФГБУ «ГНЦ Институт  
иммунологии» ФМБА России,  
доктор медицинских наук  
профессор



М.Р.Хаитов

06 05 2015 г.

### О Т З Ы В

**о научно-практической значимости диссертации А.Ю. Регужовой  
«Исследование специфической активности полиэпитопных Т-клеточных  
ВИЧ-1 иммуногенов, полученных с использованием  
различных стратегий проектирования»  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности «03.01.03 – молекулярная биология»**

#### Актуальность темы диссертации

Сегодня, через 34 года после регистрации первых случаев СПИДа в 1981 г., несмотря на масштабные национальные и международные программы по профилактике и лечению СПИДа, эпидемия в ряде регионов не только не снижается, но имеет тенденцию к росту. По данным ВОЗ, в настоящее время в мире насчитывается около 33,4 миллионов человек, живущих с ВИЧ. В России зарегистрировано 800 тысяч ВИЧ-инфицированных, и с каждым годом число новых случаев растет. При этом большинство ВИЧ-инфицированных – люди активного трудоспособного возраста. Современная антиретровирусная терапия позволяет снижать вирусную нагрузку у ВИЧ-инфицированных, замедляет развитие инфекции и переход в стадию СПИДа, но не удаляет вирус из организма человека.

В связи с этим особенно важны профилактические меры, способные повысить эффективность контроля над распространением эпидемии СПИДа, ключевым

звеном которых могла бы стать вакцина. Однако традиционный путь разработки вакцин против ВИЧ-инфекции/СПИДа пока не дал результатов, и эффективная вакцина пока не создана. Очевидно, что для создания анти-ВИЧ/СПИД вакцин нужны новые подходы и технологии. Помимо собственно конструирования вакцин, необходимы разработка и применение адекватных методов оценки иммунного ответа на эти препараты. Одним из перспективных подходов к созданию анти-ВИЧ/СПИД вакцин является конструирование синтетических полиэпитопных иммуногенов, использующих широкий спектр протективных Т- и В-клеточных эпитопов основных вирусных антигенов, способных индуцировать широко нейтрализующие антитела и ответы цитотоксических и хелперных Т-лимфоцитов. Теоретически этот подход позволяет преодолеть антигенную изменчивость ВИЧ-1, фокусирует иммунный ответ на протективные детерминанты и позволяет исключить из состава вакцины нежелательные детерминанты, которые способны индуцировать аутоантитела или антитела, увеличивающие инфекционность вируса.

Диссертация Регузовой А.Ю. посвящена разработке вакцины против ВИЧ/СПИДа на основе Т-клеточного иммуногена. Полученные результаты могут стать основой для рационального дизайна вакцин, индуцирующих ВИЧ-специфический Т-клеточный иммунный ответ. Помимо этого, в диссертации исследуются и применяются современные информативные методы оценки иммунного ответа на анти-ВИЧ/СПИД-вакцину.

Таким образом, диссертация Регузовой А.Ю. чрезвычайно актуальна, поскольку посвящена исследованию важнейшей научной, медицинской и социальной проблемы.

#### **Связь с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства**

Результаты работы могут быть использованы для создания вакцин против ВИЧ/СПИДа, и, следовательно, содействовать улучшению медицинского обеспечения населения Российской Федерации.

#### **Основные результаты работы, их достоверность и новизна**

В диссертации Регузовой А.Ю. с помощью современных методов решаются актуальные задачи: исследуется возможность повышения иммуногенности

кандидатных анти-ВИЧ/СПИД-вакцин (а именно, Т-клеточного иммунного ответа), за счет модификации ДНК-вакцинных конструкций с учетом особенностей процессинга и презентации эпитопов молекулами МНС I и МНС II класса, и исследуется иммунный ответ, а именно формирование ВИЧ-специфических  $CD8^{+}$ -лимфоцитов, у здоровых добровольцев, вакцинированных кандидатной анти-ВИЧ/СПИД-вакциной.

Научная новизна диссертации Регузовой А.Ю. определяется новыми препаратами, кодирующими полиэпитопные Т-клеточные иммуногены для индукции ВИЧ-специфического Т-клеточного иммунного ответа, и первым в России применением современного информативного метода оценки иммунного ответа (метода пептид-МНС-пентамеров) при клинических испытаниях кандидатной анти-ВИЧ/СПИД-вакцины. Оригинальность диссертационной работы заключается в том, что для повышения иммуногенности были использованы подходы, направленные на улучшение протеасомного/иммунопротеасомного процессинга, взаимодействия высвободившихся пептидов с ТАР.

В диссертации Регузовой А.Ю. впервые в одних условиях было проведено сравнение влияния дополнительных последовательностей в структуре полиэпитопного иммуногена (N-концевого убиквитина, N-концевого сигнального пептида, представляющего собой сигнальную последовательность белка E3/gp19K аденовирусов, и С-концевого тирозинового мотива LAMP-1) на уровень ВИЧ-специфического Т-клеточного иммунного ответа. Были сконструированы, наработаны и очищены рекомбинантные плазмиды, кодирующие полиэпитопные иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3, и показана экспрессия целевых генов *in vitro*. После иммунизации лабораторных животных этими рекомбинантными плазмидами, кодирующими полиэпитопные иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3, уровни ВИЧ-специфических  $CD4^{+}$ - и  $CD8^{+}$ -Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-2 и IFN $\gamma$ , были достоверно выше, чем после иммунизации контрольной векторной плазмидой. Таким образом, было показано, что использованные в работе подходы по оптимизации структуры полиэпитопных иммуногенов способны повысить уровни ВИЧ-специфического  $CD4^{+}$ - и  $CD8^{+}$ -Т-клеточного иммунного ответа. Автором показано, что среди трех исследованных конструкций наиболее выраженный иммунный ответ в форме как  $CD8^{+}$ -, так и  $CD4^{+}$ -Т-лимфоцитов

наблюдается при использовании для иммунизации конструкции, содержащей N-концевой убиквитин. На этом основании делается важный вывод о том, что убиквитин-зависимое нацеливание полиэпитопного иммуногена на протеасому является предпочтительным, так как обеспечивает более выраженный иммунный ответ, чем при лизосомной деградации.

Другим важным направлением диссертации является апробация и использование при анализе результатов клинических испытаний кандидатной анти-ВИЧ/СПИД-вакцины современного информативного метода пептид-МНС-пентамеров, который позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью определить количество ВИЧ-специфических Т-лимфоцитов. До сих пор метод пептид-МНС-пентамеров не использовался для исследования Т-клеточного ответа в клинических испытаниях анти-ВИЧ/СПИД-вакцин, проводимых в России. Применение данного метода потребовало особого внимания и отработки протокола, а потому этот раздел явился отдельной исследовательской работой. Регужева А.Ю. исследовала иммунный ответ у добровольцев, вакцинированных кандидатной анти-ВИЧ/СПИД-вакциной «КомбиВИЧвак» в рамках I фазы клинических испытаний. Регужевой А.Ю. удалось продемонстрировать, что после иммунизации вакциной «КомбиВИЧвак» у добровольцев формируются ВИЧ-1 Env- и Gag-специфические  $CD8^+$ -Т-лимфоциты. Полученные результаты позволяют уточнить детали индуцированного вакцинацией ВИЧ-специфического иммунного ответа в форме  $CD8^+$ -CTL и важны для разработки эффективной вакцины против ВИЧ/СПИД.

Достоверность полученных результатов обеспечивается применением современной научно-методической базы, включая предсказание и выбор Т-клеточных эпитопов, дизайн нуклеотидной и аминокислотной последовательности полиэпитопных иммуногенов, клонирование ДНК, независимые методы, примененные для изучения экспрессии целевых белков (иммуноблоттинг и внутриклеточная детекция целевых белков с использованием флуоресцентно меченых цитокинов), внутриклеточное окрашивание цитокинов, определение количества ВИЧ-специфических  $CD8^+$  - Т-лимфоцитов с использованием пептид-МНС-пентамеров, проточная цитометрия). Автором был выполнен большой объем исследовательской работы с постановкой независимых экспериментов и

надлежащих контролей, данные обработаны с помощью адекватных методов математической статистики.

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

Результаты работы могут быть использованы как в фундаментальных исследованиях, так и в прикладных областях.

Создание анти-ВИЧ/СПИД-вакцины представляет собой фундаментальную научную проблему. Существенной частью этой проблемы является разработка иммуногенов, способных индуцировать Т-клеточный иммунный ответ. Настоящая работа стала важным этапом на пути к решению этой задачи. Автором выявлены возможные способы повышения иммуногенности полиэпитопных конструкций путем оптимизации структуры ВИЧ-1 иммуногенов, а также с помощью введения дополнительных N- и C-концевых сигнальных последовательностей, увеличивающих уровень процессинга и презентации выбранных эпитопов CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>- Т-лимфоцитам. Получены ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие искусственные полиэпитопные Т-клеточные ВИЧ-1-иммуногены, проведено их сравнение и показано, что присоединение N-концевого убиквитина индуцирует наиболее высокие уровни ВИЧ-специфических CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>- Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-2 и IFN $\gamma$ .

Полученные автором данные позволяют усовершенствовать дизайн искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов для индукции ВИЧ-специфического Т-клеточного иммунного ответа и могут быть использованы для повышения иммуногенности ДНК-вакцин против других патогенов.

Результаты исследования имеют также несомненное научно-практическое значение. В рамках I фазы клинических испытаний кандидатной анти-ВИЧ/СПИД-вакцины «КомбиВИЧвак», основу которой составляют полиэпитопные иммуногены, автором апробирован метод пептид-МНС-пентамеров для определения количества антиген-специфических Т-лимфоцитов у иммунизированных добровольцев.

Ожидается, что метод пептид-МНС-пентамеров в последующем будет применяться при проведении клинических испытаний вакцин в России для



изучения репертуара Т-клеток, специфичных к закодированным в составе ДНК-вакцин антигенным детерминантам.

Сфера применения результатов, полученных Регузовой А.Ю., может быть расширена, и они могут быть положены в основу конструирования вакцинных препаратов нового поколения для профилактики не только ВИЧ-инфекции, но и других заболеваний.

Результаты и выводы работы могут быть использованы в образовательном процессе в высших учебных заведениях по специальностям «молекулярная биология», «вирусология» и «иммунология», а также в научно-исследовательских организациях, занимающихся проблемами ВИЧ-инфекции, в том числе, разработки и испытаний анти-ВИЧ/СПИД-вакцин.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор».

Диссертационная работа Регузовой А.Ю. имеет традиционную структуру, изложена на 150 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов собственных исследований и обсуждения, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 20 рисунками и 8 таблицами. Список цитированной литературы содержит 310 ссылок (в том числе, 11 – на отечественные и 299 – на зарубежные источники).

Во введении обоснована актуальность темы, представлены цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы и положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы, который свидетельствует о компетентности автора и понимании изучаемой проблемы, автор рассматривает мировой опыт по созданию вакцины против ВИЧ-инфекции/СПИДа. Особое внимание уделяется разрабатываемым полиэпитопным вакцинам против ВИЧ/СПИДа, предназначенным для индукции Т-клеточного иммунного ответа, и стратегиям их конструирования. Подробно рассматриваются методы исследования Т-клеточного иммунного ответа.

В разделе «Материалы и методы» представлен широкий спектр примененных автором современных методов молекулярной биологии и иммунологии. В работе использованы методы клонирования ДНК, конструирования рекомбинантных плазмид, их наработки в системе *E. coli* и очистки от примесей, оценка экспрессии генов *in vitro* с использованием эукариотических клеток, вестерн-блот (иммуноблот), внутриклеточная детекция белков с использованием флуоресцентно-меченых моноклональных антител, иммунизация лабораторных животных, выделение, культивирование и стимуляция спленоцитов, периферических мононуклеарных клеток крови человека, иммунофлуоресцентное окрашивание клеток, внутриклеточное окрашивание цитокинов, окрашивание пептид-МНС-пентамерами. Методы исследования представлены достаточно подробно, что свидетельствует о хорошем методическом уровне, необходимом для выполнения задач исследования.

В главе «Результаты и обсуждение» подробно описывается стратегия проектирования полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов, схема конструирования рекомбинантных плазмид, кодирующих полиэпитопные Т-клеточные иммуногены. Большое внимание уделено изучению экспрессии целевых генов в культуре эукариотических клеток. Автор обосновывается выбор параметров и протокола для исследования ВИЧ-специфического иммунного ответа, индуцированного иммунизацией. Наиболее значимую часть диссертационной работы представляет изучение способности полученных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов стимулировать ВИЧ-специфический иммунный ответ в форме CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>- Т-лимфоцитов, а также исследование влияния на иммуногенность полиэпитопных конструкций дополнительных N- и C-концевых последовательностей – убиквитина и ER-сигнального пептида (ER-signal) совместно с C-концевым тирозиновым мотивом белка LAMP-1.

Автором определена наиболее эффективная конструкция и предпочтительная стратегия проектирования искусственных полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов для формирования ВИЧ-специфического CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеточного иммунного ответа, связанная с введением N-концевого убиквитина.

Отдельный раздел посвящен части клинических испытаний вакцины «КомбиВИЧвак», в которой с помощью МНС пентамеров I класса с пептидами

ВИЧ-1 показано присутствие ВИЧ-1-Env- и Gag-специфических CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов в крови иммунизированных добровольцев на разных сроках исследования.

Результаты работы подробно обсуждены, проведено их сравнение с литературными данными.

В разделе «Заключение» автор обобщает полученные результаты, делает вывод об их фундаментальной и прикладной значимости и предлагает стратегии оптимизации полиэпитопных иммуногенов для повышения ВИЧ-специфического Т-клеточного иммунного ответа.

Выводы диссертации следуют из результатов проведенного исследования, сформулированы четко и логично.

Принципиальных замечаний по содержанию и оформлению диссертационной работы нет.

Основные материалы диссертации опубликованы в 16 работах, в том числе 4 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных для публикации материалов докторских и кандидатских диссертаций (2 статьи в российских научных журналах, 2 статьи в зарубежных), а также 12 публикациях в материалах российских и международных конференций.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертация Регузовой Алёны Юрьевны «Исследование специфической активности полиэпитопных Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов, полученных с использованием различных стратегий проектирования» 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: показано, что ДНК-вакцинные конструкции на основе Т-клеточных иммуногенов обеспечивают экспрессию генов, кодирующих полиэпитопные белки, и способны индуцировать у лабораторных животных иммунный ответ в виде ВИЧ-специфических CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup> - Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN $\gamma$ - и IL-2; установлено, что использование N-концевого убиквитина или N-концевой



сигнальной последовательности белка E3/gp19K аденовирусов и С-концевого тирозинового мотива LAMP-1, способствующих процессингу и презентации эпитопов молекулами МНС I и МНС II класса, приводит к повышению иммуногенности ДНК-вакцинных конструкций; показано, что убиквитин-зависимая деградация полиэпитопной конструкции в протеасоме является более перспективной стратегией повышения ее иммуногенности по сравнению с деградацией в лизосоме; с помощью пептид-МНС-пентамеров в ходе I фазы клинических испытаний продемонстрировано, что кандидатная анти-ВИЧ/СПИД-вакцина «КомбиВИЧвак» индуцирует формирование Env- и Gag-специфических CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов у добровольцев.

Диссертационная работа полностью отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.01.03 – молекулярная биология».

Отзыв обсужден и утвержден на заседании секции №1 Ученого совета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России « 05 » мая 2015 г., протокол № 2 .

Ведущий научный сотрудник

лаборатории биотехнологии

отдела иммунобиологии СПИДа

ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России,

доктор биологических наук



И.А. Николаева

