

УТВЕРЖДАЮ:

И. о. генерального директора

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

канд. мед. наук, доцент

В.Н. Михеев

2015 г.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального бюджетного учреждения науки  
«Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Диссертация «Исследование специфической активности полиэпитопных Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов, полученных с использованием различных стратегий проектирования» выполнена в отделе биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

В период подготовки диссертации соискатель Регузова Алёна Юрьевна

работала в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» в отделе биоинженерии в должности младшего научного сотрудника.

В 2008 г. окончила Новосибирский государственный педагогический университет по специальности «**Биология**» со специализацией «**Зоология**».

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов № 320 выдано 02.02.2015 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор».

Научные руководители: д-р биол. наук, **Бажан Сергей Иванович**, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», отдел теоретический, заведующий отделом; д-р биол. наук, **Карпенко Лариса Ивановна**, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», отдел биоинженерии, заведующая лабораторией рекомбинантных вакцин.

По итогам обсуждения принято следующее заключение: диссертация, выполненная Регузовой А.Ю. «Исследование специфической активности полиэпитопных Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов, полученных с использованием различных стратегий проектирования», является самостоятельной законченной работой, посвященной изучению иммунологических свойств полиэпитопных ВИЧ-1 иммуногенов, спроектированных с учетом особенностей процессинга и презентации Т-клеточных

антигенов, а также изучение формирования ВИЧ-специфических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с помощью метода пептид-МНС-пентамеров у добровольцев, вакцинированных «КомбиВИЧвак». По своей актуальности, новизне полученных результатов и ценности для науки и практики диссертация Регузовой А.Ю. соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации. Все основные эксперименты, включая наработку препаративного количества рекомбинантных плазмид, кодирующих полиэпитопные иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3, их очистку и дальнейшее изучение экспрессии целевых генов *in vitro*, а также иммунизацию лабораторных животных сконструированными ДНК-вакцинными конструкциями и анализ клеточных образцов на проточном цитофлуориметре для исследования способности CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов продуцировать IL-2 и IFN $\gamma$ , выполнены автором лично. Дизайн аминокислотной последовательности полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов был выполнен в теоретическом отделе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» канд. биол. наук Антоном Д.В. Конструирование рекомбинантных плазмид, кодирующих полиэпитопные иммуногены, было проведено совместно с канд. биол. наук Максютковым Р.А. Исследование формирования ВИЧ-1 Env- и Gag-специфических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с помощью пептид-МНС-пентамеров у HLA A\*0201-позитивных добровольцев в рамках I фазы клинических испытаний вакцины «КомбиВИЧвак», в том числе разработка протокола, проводилась автором лично. Статистический анализ данных выполнен совместно с канд. биол. наук Антоном Д.В. в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Степень достоверности результатов проведённых исследований. Результаты получены с использованием современных молекулярно-биологических, микробиологических и иммунологических методов исследования и сертифицированного оборудования. Качество проведенных экспериментов подтверждалось контрольными образцами и повторами. При теоретическом анализе достоверность полученных результатов проверялась с использованием нескольких методов. Выводы основаны на достаточном экспериментальном материале и являются логическим завершением диссертационной работы.

Научная новизна работы. В данной работе впервые в рамках одного исследования получены ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие полиэпитопные ВИЧ-1 иммуногены TCI-N, TCI-N2 и TCI-N3, спроектированные с учетом особенностей процессинга и презентации Т-клеточных антигенов по пути МНС I и МНС II классов, а также проведено сравнительное исследование их специфической активности.

Подтверждено, что добавление сигнальных последовательностей, а именно N-концевого убиквитина (в составе TCI-N3) или N-концевой сигнальной последовательности белка E3/gp19K аденовирусов и С-концевого тирозинового мотива LAMP-1 (в составе TCI-N2) к последовательности Т-клеточного иммуногена (TCI-N) повышает уровень антиген-специфического CD4+ и CD8+ Т-клеточного иммунного ответа. В данном исследовании впервые было показано, что полиэпитопная конструкция TCI-N3, содержащая N-концевой убиквитин, является наиболее эффективной, так как индуцирует наиболее высокий уровень CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-2 и IFN $\gamma$ . Впервые использована методика пептид-МНС-пентамеров для определения количества антиген-специфических Т-лимфоцитов в рамках I фазы клинических испытаний вакцины против ВИЧ. Показано, что после иммунизации вакциной «КомбиВИЧвак» у добровольцев формируются ВИЧ-1 Env- и Gag-специфические CD8+ Т-лимфоциты. Это говорит в пользу рациональности использования полиэпитопных иммуногенов в составе вакцин для индукции вирус-специфического клеточного иммунного ответа.

Практическая значимость работы. На основе новейших литературных данных предложены различные стратегии дизайна полиэпитопных Т-клеточных иммуногенов – прототипов для использования в качестве ДНК-вакцин против ВИЧ-1. Выявлены возможные способы повышения иммуногенности полиэпитопных конструкций путем оптимизации структуры ВИЧ-1 иммуногенов, а также с помощью дополнительных N- и С-концевых сигнальных последовательностей, увеличивающих уровень процессинга и презентации выбранных эпитопов CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитам. Полученные данные позволят усовершенствовать методы дизайна искусственных полиэпитопных иммуногенов для индукции ВИЧ-специфического Т-клеточного ответа, а также могут быть использованы в качестве стратегий повышения иммуногенности ДНК-вакцин против ряда патогенов человека и животных.

Специальность: 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертационная работа соответствует специальности молекулярная биология, п. 7 «Генная, белковая и клеточная инженерия», п. 8 «Биоинформатика».

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем. По результатам работы опубликованы 4 статьи в журналах из списка ВАК, рекомендованных для защиты диссертаций, при этом 3 из них индексируются в Scopus. Также материалы работы были представлены на всероссийских и международных конференциях, по итогам которых опубликовано 12 тезисов.

1. **Регузова А.Ю.**, Антонец Д.В., Максютов Р.А., Бажан С.И., Карпенко Л.И.  
Конструирование и биологическое тестирование ДНК-вакцинных конструкций,

- кодирующих структурные варианты искусственного поли-CTL-эпитопного иммуногена ВИЧ-1. Материалы Третьей Конференции по вопросам ВИЧ/СПИДа в Восточной Европе и Центральной Азии ЕЕСААС 2009, 28 – 30 октября 2009, Москва, Россия. – С. 125.
2. Бажан С.И., Карпенко Л.И., Антонец Д.В., **Регузова А.Ю.**, Максютлов Р.А., Ильичев А.А. Рациональный дизайн новых полиэпитопных ДНК-вакцин для индукции ответа CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов против ВИЧ-1. Материалы рабочего совещания по рассмотрению итогов выполнения распоряжения правительства РФ от 25.12.2007 г. № 1905-р., 17 – 19 ноября 2010, Новосибирск, Россия. – С. 160 – 168.
  3. **Регузова А.Ю.**, Антонец Д.В., Максютлов Р.А., Бажан С.И., Карпенко Л.И. Конструирование и биологическое тестирование ДНК-вакцины, кодирующей оптимизированные поли-CTL-эпитопные ВИЧ-1 иммуногены. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Дни иммунологии в Сибири», 1 – 3 марта 2010, Красноярск, Россия. – С. 197 – 198.
  4. Карпенко Л.И., Мечетина Л.В., **Регузова А.Ю.** МНС-мультимеры и их применение в изучении противовирусного иммунного ответа // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 2. – С. 112 – 119.
  5. Карпенко Л.И., Исаков И.В., Шакина Н.А., **Регузова А.Ю.**, Ильичев А.А. Разработка метода оценки специфической активности кандидатной вакцины против ВИЧ-1 с помощью техники МНС-тетрамеров. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Дни иммунологии в Сибири», 27 – 29 апреля 2011, Абакан, Россия. – С. 172 – 173.
  6. **Регузова А.Ю.**, Антонец Д.В., Максютлов А.З., Бажан С.И., Карпенко Л.И. Изучение биологических и иммунологических свойств оптимизированных искусственных Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов. III Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням, 28 – 30 марта 2011, Москва, Россия. – С. 309.
  7. **Регузова А.Ю.**, Антонец Д.В., Максютлов Р.А., Волкова О.Ю., Карпенко Л.И., Ильичев А.А., Бажан С.И. Дизайн, конструирование и оценка экспрессии генов, кодирующих полиэпитопные Т-клеточные иммуногены ВИЧ-1 в составе ДНК-вакцинных конструкций // Вестник НГУ. – 2013. – № 2. – С. 5 – 12.
  8. Karpenko L.I., **Reguzova A.Yu.**, Starostina E.V., Borobova E.A., Antonets D.V., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. Artificial poly-CTL-epitopes DNA vaccines. The 8th International Conference on the Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS\SB-2012), 25 – 29 June 2012, Novosibirsk, Russia. – P. 87.

9. Карпенко Л.И., Рындюк Н.Н., Гинько З.И., Кузубов В.И., Лебедев Л.Р., Богрянцева М.П., Каплина О.Н., **Регузова А.Ю.**, Рыжиков А.Б., Усова С.В., Орешкова С.Ф., Масычева В.И., Нечаева Е.А., Ильичев А.А., Бажан С.И. Результаты I фазы клинических испытаний кандидатной вакцины против ВИЧ-1 (КомбиВИЧвак). Материалы научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней», 26 – 28 сентября 2013, Новосибирск, Россия. – С. 186 – 187.
10. **Регузова А.Ю.**, Антонец Д.В., Максютлов Р.А., Ильичев А.А., Орешкова С.Ф., Бажан С.И., Карпенко Л.И. Конструирование полиэпитопных Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов и исследование их биологической активности в составе ДНК-вакцины. I Международный Форум «Инновации в медицине: основные проблемы и пути их решения. Высокотехнологичная медицина как элемент новой инновационной экономики», 22 – 23 марта 2013 г., Новосибирск, Россия. – С. 248 – 255.
11. Karpenko L.I., Ryndyuk N.N., Gin'ko Z.I., Kuzubov V.I., Bazhan S.I., Lebedev L.R., Kaplina O.N., **Reguzova A.Yu.**, Ryzhikov A.B., Bogryantseva M.P., Usova S.V., Masycheva V.I., Nechaeva E.A., Ilyichev A.A. Phase I clinical trials of DNA-protein Vaccine (CombiHIVvac) Containing Artificial Multi-Clade Immunogens. International Conference «AIDS Vaccine 2013», 7 – 10 October 2013, Barcelona, Spain, OA03.02. – P. 61.
12. **Reguzova A.Yu.**, Antonets D.V., Maksyutov R.A., Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. Design of artificial HIV-1 poly-CTL-epitope immunogens optimized for inducing CD8+ HIV-specific immune responses. 13th Young Scientist's Forum (YSF), 3 – 6 July 2013, St. Petersburg, Russia. – P. 128.
13. **Reguzova A.Yu.**, Antonets D.V., Maksyutov R.A., Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Bazhan S.I. Design of artificial HIV-1 poly-CTL-epitope immunogens optimized for inducing CD8+ HIV-specific immune responses. Federation of European Biochemical Societies FEBS CONGRESS 2013 "Mechanisms in Biology", 6 – 11 July 2013, St. Petersburg, Russia. – P. 128.
14. **Reguzova A.Yu.**, Antonets D.V., Maksyutov R.A., Bazhan S.I., Karpenko L.I. Optimized Poly-CTL-epitope HIV-1 Immunogens for Inducing CD8+ HIV-specific Immune Responses. International Conference «AIDS Vaccine 2013», 7 – 10 October 2013, Barcelona, Spain, P. 13.32. – P. 286.
15. **Reguzova A.Y.**, Karpenko L.I., Mechetina L.V., Belyakov I.M. Peptide-MHC multimer-based monitoring of CD8 T-cells in HIV-1 infection and AIDS vaccine development // Expert Rev. Vaccines. – 2015. – V. 14. – N. 1. – P. 69 – 84.

16. **Reguzova A.**, Antonets D., Karpenko L., Ilyichev A., Maksyutov R., Bazhan S. Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T cell-epitope immunogens // PLOS ONE. – 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0116412. Accepted September 9, 2014.

Диссертация «Исследование специфической активности полиэпитопных Т-клеточных ВИЧ-1 иммуногенов, полученных с использованием различных стратегий проектирования» Регузовой Алёны Юрьевны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Заключение принято на заседании объединённого научного семинара Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Присутствовало на заседании 29 чел. Результаты открытого голосования: за – 29; против – нет; воздержавшихся – нет, протокол № 50 от 19 декабря 2014 г.

/  /

**Локтев Валерий Борисович**

д-р биол. наук, профессор  
председатель научного семинара

/  /

**Кононова Юлия Владимировна**

канд. биол. наук  
секретарь научного семинара

---