

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Рудометова Андрея Павловича
«Конструирование искусственных иммуногенов против ВИЧ-1,
несущих эпитопы, узнаваемые широконейтрализующими антителами»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Актуальность темы. Как следует из данных ВОЗ, в Российской Федерации и странах Восточной Европы число людей, у которых впервые обнаружен ВИЧ, по-прежнему продолжает расти, несмотря на успехи антиретровирусной терапии. Решением проблемы распространения ВИЧ-инфекции может стать применение эффективной профилактической вакцины. К сожалению, в результате высокой генетической и, как следствие, антигенной вариабельности ВИЧ-1, до сих пор не удалось создать иммуноген, способный индуцировать формирование протективного иммунного ответа против широкого разнообразия генетических вариантов вируса. Надежду на появление эффективной вакцины дало открытие антител, обладающих вируснейтрализующей активностью, в отношении широкого разнообразия изолятов ВИЧ-1 (bNabs). Однако создать иммуноген, способный индуцировать такие антитела, пока не удалось. В настоящее время многие исследователи склоняются к тому, что надёжная вакцина должна состоять из нескольких различных иммуногенов. Вполне вероятно, что комбинация иммуногенов, основанных на разных стратегиях их дизайна, приведёт к успеху.

Таким образом, представленная диссертационная работа Рудометова Андрея Павловича является актуальной, поскольку она посвящена решению серьёзной научной и прикладной задачи, связанной с конструированием и изучением искусственных иммуногенов против ВИЧ-1.

В работе описаны иммуногены, полученные на основе трёх белков-носителей: искусственного полиэпитопного белка TBI, корового белка вируса гепатита В (HBsAg) и белка YkuJ *Bacillus subtilis*. В состав этих белков были включены эпитопы, узнаваемые bNabs 2F5, 4E10/10E8 и VRC01.

Научная новизна и практическая значимость исследования и полученных результатов. Научная новизна работы Рудометова А.П. определяется тем, что при конструировании иммуногенов в качестве белков-носителей использованы как хорошо охарактеризованные белки и системы презентации чужеродных эпитопов (иммуноген TBI и HBsAg соответственно), так и выбранный из базы данных белковых последовательностей перспективный белок YkuJ *Bacillus subtilis*. Оригинальность работы заключается в том, что при проектировании иммуногенов использовались как линейные эпитопы широконейтрализующих антител, так и имитатор конформационного эпитопа антитела VRC01, полученного ранее с помощью технологии фагового дисплея.

Для достижения цели автором были выбраны два наиболее важных и хорошо охарактеризованных региона ВИЧ-1: регион gp41 мембранно-проксимальной наружной области (MPER, от англ. membrane-proximal external region), которая играет важную роль в процессе слияния вируса с клеткой-мишенью и содержит линейные эпитопы широконейтрализующих антител, таких как 2F5, 4E10 и 10E8; и сайт связывания вируса с клеточным рецептором CD4 гликопротеина gp120 ВИЧ-1 (CD4bs), несущий конформационный эпитоп, узнаваемый bNabs VRC01. В качестве белков-носителей эпитопов, узнаваемых bNabs, были выбраны три молекулы: белок TBI, HBsAg и белок YkuJ.

Автором сконструирован иммуноген pTBI, содержащий линейные эпитопы, узнаваемые bNabs 10E8, 4E10, 2F5, а также линейный миметик конформационного эпитопа bNAbs VRC01. Показано, что при иммунизации кроликов pTBI индуцирует

образование антител, способных нейтрализовать рекомбинантный штамм ВИЧ-1 92BR025 и env-псевдотипированные штаммы SF162 и QH.

Получен химерный белок HBsAg-mimicVRC01, экспонирующий линейный пептид-имитатор конформационного эпитопа, узнаваемого bNAbs VRC01. Показано, что химерный белок HBsAg-mimicVRC01 образует частицы, подобные нативному коровому белку. Установлено, что сыворотки иммунизированных животных обладают вируснейтрализующей активностью в отношении рекомбинантного ВИЧ-1 92BR025.

Значительный интерес представляет часть работы, в которой приведены результаты исследований по изучению иммуногенов, несущих участки MPER ВИЧ-1. Было показано взаимодействие с антителами 10E8 и 4E10, которые связываются с MPER в альфа-спиральной конформации, и с 2F5, которое связывается с MPER без регулярной вторичной структуры. При анализе иммуногенных свойств YkuJ-MPER и MPER-TBI было установлено, что обе конструкции способны индуцировать выработку анти-MPER антител.

Полученные результаты могут быть полезны исследователям, работающим в области конструирования вакцины против ВИЧ-1 и других противовирусных вакцин.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов. Во введении автор убедительно обосновал актуальность исследования, чётко сформулировал цели и задачи, а так же положения, выносимые на защиту. Основной раздел диссертации содержит описание полученных результатов исследования и их обсуждение. Написан хорошо, материал изложен логично, достаточно иллюстрирован. Обсуждение результатов проведено грамотно. Обоснованность полученных результатов обеспечена применением современной научно-методической базы, с использованием высокотехнологичных методов исследования и сертифицированного оборудования, при постановке экспериментов использовались адекватные контроли.

Достоверность результатов работы не вызывает сомнений. Сделанные выводы строго базируются на полученных результатах исследования и полностью им соответствуют.

По материалам диссертации опубликовано пять научных статей, две из них в журналах, входящих в список ВАК для публикации диссертационных материалов, получен патент РФ на изобретение. Работа прошла апробацию на ряде российских и международных конференциях.

Структура и объем работы. Диссертация построена по традиционной схеме: состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа хорошо иллюстрирована, логически выстроена и чётко изложена. Работа изложена на 129 страницах, включает 34 рисунка, 3 таблицы, 3 приложения и 167 цитируемых источника.

Замечания.

В качестве замечаний следует отметить следующее:

- 1) На рисунке 16-В название пептида не соответствует названию соответствующего моноклонального антитела.
- 2) В разделе "Материалы и методы", на мой взгляд, не достаточно подробно описан метод вирус-нейтрализации с использованием псевдовирусов ВИЧ-1. Было бы не лишним привести схему эксперимента и пояснить, почему регистрация сигнала происходит по измерению люминесценции.
- 3) В тексте диссертации не дается разъяснения интересному факту, почему спектр КД у белков pTBI и TBI значительно отличается?
- 4) Известно, что протективный эффект вакцины против ВИЧ RV144 (показавший 31,2 %) был связан с формированием не-нейтрализующих антител. Снижение риска инфицирования ВИЧ-1 коррелировало с появлением антител, обладающих антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью. Вопрос, могут ли полученные в

данной работе антигены индуцировать антитела, способные активировать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность?

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней.

В целом работа оставляет хорошее впечатление. Указанные недостатки не умаляют достоинств выполненной работы. Рудометов А. П.

Таким образом, считаю, что диссертационная работа Рудометова Андрея Павловича «Конструирование искусственных иммуногенов против ВИЧ-1, несущих эпитопы, узнаваемые широконейтрализующими антителами» полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Рудометов Андрей Павлович, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Дейнеко Елена Викторовна,
зав. лабораторией биоинженерии растений,
доктор биологических наук, профессор

/Дейнеко Е.В./

Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН»
пр-т академика Лаврентьева, 10, 630090, Новосибирск
+7913-740-8108
эл.почта:deineko@bionet.nsc.ru

5 декабря 2018 г.

Подпись д.б.н., проф. Дейнеко Е.В. заверяю:

Орлова Галина Владимировна
Ученый секретарь
ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН»
кандидат биологических наук



/Орлова Г.В./