

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. Эпидемия ВИЧ-1 является одной из самых острых проблем современного здравоохранения. Согласно данным ЮНЭЙДС, широкое применение антиретровирусной терапии позволило снизить количество новых случаев заражения ВИЧ-инфекцией в ряде регионов мира. Однако в Российской Федерации и странах Восточной Европы число людей, впервые обнаруживших у себя ВИЧ, по-прежнему продолжает расти. Остановить распространение ВИЧ-инфекции могло бы использование эффективной профилактической вакцины. К сожалению, по причине высокой генетической и, как следствие, антигенной вариабельности ВИЧ-1 эффективной вакцины пока создать не удалось.

В настоящее время общепринятым считается, что вакцина против ВИЧ-1 должна включать как Т-, так и В- клеточные иммуногены. При этом В-клеточный иммуноген должен нейтрализовать широкий спектр генетических вариантов ВИЧ-1, что возможно при его способности индуцировать наработку антител к консервативным участкам вируса (широконейтрализующих антител (bNAbs)). Известно, что при естественном течении ВИЧ-инфекции такие широконейтрализующие антитела появляются в организме пациентов, но вызвать наработку этих антител при помощи вакцинации до настоящего времени не удалось.

На сегодняшний день перспективной считается стратегия иммунизации, подразумевающая последовательное введение серии различных белков-иммуногенов, презентирующих разные эпитопы определенного участка, с целью направить процесс аффинного созревания индуцируемых антител в сторону bNAbs.

Таким образом, научные исследования, направленные на создание ВИЧ-иммуногенов, способных инициировать наработку в организме человека широконейтрализующих антител, безусловно, являются актуальными.

Диссертационная работа Рудометова Андрея Павловича посвящена конструированию и изучению свойств искусственных ВИЧ-иммуногенов, содержащих эпитопы, узнаваемые широконейтрализующими антителами (bNAbs).

Были выбраны два наиболее важных и хорошо охарактеризованных региона ВИЧ-1: MPER (membrane-proximal external region) – мембрано-проксимальная наружная область

gp41 ВИЧ-1, играющая важную роль в процессе слияния вируса с клеткой-мишенью и содержащая линейные эпитопы широконейтрализующих антител 2F5, 4E10 и 10E8, и сайт связывания вируса с клеточным рецептором CD4 гликопротеина gp120 ВИЧ-1 (CD4bs), несущий конформационный эпитоп, узнаваемый bNAb VRC01.

В качестве белков-носителей эпитопов, узнаваемых широконейтрализующими антителами, в работе были использованы три белка: искусственный полиэпитопный белок TBI, коровий белок вируса гепатита В (HBsAg) и белок YkuJ *Bacillus subtilis*.

Научная новизна и практическая значимость исследования и полученных результатов. Научная новизна и оригинальность результатов, полученных автором, не вызывают сомнения. В ходе исследования при помощи компьютерного анализа и генно-инженерных работ впервые получены иммуногены nTBI, TBI-MPER, HBsAg-mimicVRC01 и YkuJ-MPER, содержащие эпитопы, узнаваемые широконейтрализующими ВИЧ-1 антителами 10E8, 4E10, 2F5, и имитатор конформационного эпитопа антитела VRC01.

Показано, что включение эпитопа широконейтрализующего антитела 10E8 в состав белка TBI повышает вируснейтрализующую активность IgG у животных, иммунизированных модифицированным белком nTBI в сравнении с исходным белком.

Впервые показано, что имитатор конформационного эпитопа VRC01 в составе белка скаффолда (HBsAg) сохраняет свои иммуногенные свойства.

В качестве белка носителя впервые был предложен и использован для презентации MPER региона ВИЧ-1 глобулярный белок *B. subtilis* YkuJ.

Полученные в работе рекомбинантные плазмиды могут быть использованы при разработке искусственных полиэпитопных иммуногенов для индукции ВИЧ-специфического В-клеточного ответа, а рекомбинантные белки-иммуногены – в качестве компонентов прайм-бустерных стратегий, направленных на индукцию bNAbs.

Структура и объем работы.

Диссертация Рудометова А.П. имеет классическую структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 167 источников преимущественно зарубежных авторов. Работа изложена на 129 страницах, включает 34 рисунка, 3 таблицы, 3 приложения.

Во введении автор обосновал актуальность исследуемой проблемы и изложил возможные пути ее решения, поставил цель и задачи исследования и привел положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы включает анализ как зарубежных, так и отечественных источников, относящихся к исследуемой проблеме. В обзоре представлены как

фундаментальные сведения, касающиеся вируса иммунодефицита человека, так и подробно описаны существующие подходы к проблеме создания профилактической вакцины против ВИЧ. Обзор литературы содержит 167 источников и дает возможность получить достаточное представление о предмете исследования.

Глава «Материалы и методы» содержит описание используемых в работе реактивов, материалов и методов исследований и позволяет полностью воспроизвести проведенные эксперименты.

Глава «Результаты и обсуждение» представлена в виде трех частей, исходя из используемых белков-носителей эпитопов bNAbs. Первая часть посвящена получению и анализу антигенных и иммуногенных свойств полиэпитопного ВИЧ-иммуногена nTbI, несущего нативные эпитопы широконейтрализующих антител 10E8, 4E10, 2F5 и имитатор конформационного эпитопа антитела VRC01. Вторая часть – химерному HBcAg, экспонирующему имитатор эпитопа bNAbs VRC01. Третья – получению и анализу антигенных и иммуногенных свойств рекомбинантных белков, несущих участки MPER ВИЧ-1, полученных на основе белков YkuJ и TbI.

Показано, что сконструированный иммуноген nTbI, содержащий нативные эпитопы bNAbs 10E8, 4E10, 2F5 и линейный миметик эпитопа bNAbs VRC01, при иммунизации кроликов способен индуцировать образование антител, нейтрализующих ряд псевдотипированных штаммов ВИЧ-1.

Показано, что химерный белок HBcAg-mimicVRC01 образует частицы, подобные нативному коровому белку вируса гепатита В. Сыворотки крови животных, иммунизированных HBcAg-mimicVRC01, обладают вируснейтрализующей активностью в отношении молекулярного клона ВИЧ-1 92BR025. Продемонстрирована возможность использования HBcAg в качестве системы презентации имитаторов эпитопов антитела VRC01 и показана иммуногенность имитатора эпитопа MKA VRC01.

В составе искусственного белка MPER-TbI последовательность MPER сохраняет α -спиральную структуру, присущую ей в составе вириона ВИЧ-1.

Белки MPER-TbI и YkuJ-MPER индуцируют в организме лабораторных животных выработку специфичных антител к MPER региону ВИЧ-1.

Таким образом, все сконструированные иммуногены обладают антигенностью ВИЧ-1 и способны индуцировать у иммунизированных животных образование ВИЧ-специфических антител. Полученные иммуногены могут быть использованы в разработке вакцины против ВИЧ 1 как на стадии создания иммуногена, так и при разработке различных схем прайм-бустерных протоколов иммунизации вакцинируемых.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов. В целом достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Положения, представленные на защиту, согласуются с данными, приведенными диссертантом в работе. Выводы обоснованы и являются логическим завершением диссертационной работы.

Замечания. В целом диссертация Рудометова А.П. является оригинальным, законченным исследованием, работа изложена логично, корректно, хорошо иллюстрирована. К работе нет принципиальных замечаний, однако работа не лишена некоторых недостатков:

1. В литературном обзоре хотелось бы видеть больше информации об искусственном полиэпителином белке ТВІ, являющимся основой при создании новых иммуногенов.

2. При исследовании структуры белков ТВІ_tag и nТВІ методом кругового дихроизма не удалось получить КД спектр для белка nТВІ и идентифицировать его структуру. В работе практически нет обсуждения возможных причин такого результата эксперимента.

3. В тексте диссертации, особенно в подписях к рисункам, встречаются неточности и опечатки, несколько затрудняющие восприятие текста диссертации.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней. По своей актуальности, методическому уровню, ценности и новизне полученных результатов диссертационная работа 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.

Официальный оппонент:



Кулигина Елена Владимировна

кандидат биологических наук,

старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8

тел. (383) 363 51 90, email: kuligina@niboch.nsc.ru

Подпись к.б.н. Кулигиной Е.В. заверяю:

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН

05.12.2018 г.



к.х.н. П.Е. Пестряков