

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии»
ФМБА России

д.м.н., чл.-корр. РАН, профессор Хаитов М.Р.



2018

Отзыв

ведущей организации о научно-практической ценности диссертации
на тему «Конструирование искусственных иммуногенов против ВИЧ-1,
несущих эпитопы, узнаваемые широконейтрализующими антителами»
на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности:

03.01.03 – Молекулярная биология

1. Актуальность избранной темы

Несмотря на достигнутые успехи в терапии ВИЧ-инфекции, до сих пор не удается полностью приостановить распространение ВИЧ. Эта проблема особенно актуальна для РФ, где наблюдается рост числа зараженных и в ряде регионов зафиксированы генерализованные эпидемии ВИЧ/СПИД. Среди инфицированных, в основном, люди репродуктивного и трудоспособного возраста, что утяжеляет социально-экономический ущерб наносимый заболеванием. Эффективная вакцина могла бы значительно снизить распространение заболевания. Работа над её созданием началась с момента

открытия ВИЧ, и хотя к настоящему времени коммерчески доступного препарата не получено, накоплен большой опыт и знания, позволяющие конструировать вакцинные антигены, способные вызывать образование протективного иммунного ответа, в том числе антител, способных нейтрализовать ВИЧ. Данные антитела, связываясь с вирусом, предотвращают его проникновение в клетку. Существует ряд подходов по дизайну вакцинного антигена. Показано, что эпитопы, ответственные за образование нейтрализующих антител, не обладают высокой иммуногенностью. Поэтому, конструирование антигена, который повторяет только последовательности протективных эпитопов, позволяет индуцировать антитела строгой специфичности. Кроме того, введение в состав белков-носителей дает возможность значительно увеличить его иммуногенность.

Диссертационная работа Рудометова А.П. посвящена конструированию и исследованию биологической активности искусственных ВИЧ-иммуногенов, содержащих эпитопы, узнаваемые антителами с широкой нейтрализующей активностью. Иммуногены представляют собой белки, состоящие из последовательностей, узнаваемых нейтрализующими антителами и белка-носителя. Последовательности для нейтрализующих антител повторяют регион трансмембранного белка ВИЧ1 gp41 мембранно - проксимальной наружной области (MPER, 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 широконейтрализующим антителом VRC01. В качестве белков-носителей были использованы три молекулы: искусственный полиэпитопный белок TBI, коровый белок вируса гепатита В (HBcAg) и белок YkuJ *Bacillus subtilis*.

Таким образом, представленная диссертационная работа является актуальной, она посвящена исследованию и решению серьезной фундаментальной и прикладной научной проблемы.

2. Связь работы с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационная работа Рудометова А.П. выполнена в соответствии планом научно-исследовательской работы, проводимой в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

3. Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В ходе выполнения работы были получен ряд иммуногенов (nTBI, TBI-MPER, HBsAg-mimicVRC01 и YkuJ-MPER), включающие в свой состав эпитопы ВИЧ-1, узнаваемые широконейтрализующими антителами 10E8, 4E10, 2F5 и имитатор конформационного эпитопа, узнаваемый антителом VRC01, полученных на основе различных белков-носителей (полиэпитопный белок TBI, коровый белок вируса гепатита В (HBsAg) и белок YkuJ *Bacillus subtilis*).

Научная новизна диссертации Рудометова А.П. определяется созданием новых антигенов, способных вызывать образование антител, нейтрализующих ВИЧ1, и подтверждена патентом на изобретение № 2642258 от 24.01.2018. Оригинальность диссертационной работы заключается в том, что впервые в качестве белка носителя был предложен глобулярный белок *B. subtilis* YkuJ.

Показано, что включение эпитопа широконейтрализующего антитела 10E8 в состав ранее полученного 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-носителя (HBsAg) сохраняет свои иммуногенные свойства.

Бактериальные штаммы-продуценты рекомбинантных белков pTBI, TBI_tag и YkuJ-MPER были депонированы в «Коллекции микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, под номерами 1338, 1339 и 1340 соответственно.

4. Значимость для науки и производства (практики) полученных автором диссертации результатов.

Теоретическая значимость работы заключается в том, что в результате проведенных исследований получены новые данные, расширяющие современные представления о создании антигенов, способных вызывать протективный иммунный ответ против ВИЧ-инфекции.

Практическая значимость работы заключается в создании новых иммуногенов против ВИЧ-инфекции с использованием белков-носителей, а также модификация ранее полученных антигенов, что позволяет значительно увеличить их иммуногенность и расширить специфичность иммунного ответа на искусственные антигены ВИЧ. Кроме того показано, что ВИЧ-эпитопы в составе использованных белков-носителей, сохраняют свою структуру и антигенные свойства.

5. Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Полученные результаты имеют важное значение для совершенствования методологии создания кандидатных вакцинных препаратов против ВИЧ. Данные подходы могут быть применены для улучшения уже имеющихся антигенов ВИЧ.

Также представленные в процессе выполнения диссертационной работы результаты по применению белков-носителей могут быть использованы специалистами в области конструирования искусственных белков – иммуногенов против ряда других социально-значимых вирусных инфекций человека и животных.

Кроме того, полученные автором антигены могут быть применены как самостоятельные вакцинные препараты, так и в качестве компонентов прайм-бустерных стратегий.

Результаты и выводы работы могут быть использованы научно-исследовательскими коллективами, занимающимися проблемами ВИЧ-инфекции, а также в высших учебных заведениях по специальностям «иммунология», «вирусология», «молекулярная биология».

6. Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.

Достоверность полученных в работе результатов, обоснованность научных положений, выводов и заключений не вызывает сомнений и основывается на продуманном методическом и методологическом подходе к выполнению диссертационного исследования. Поставленная цель — конструирование и изучение ВИЧ-1 иммуногенов, несущих эпитопы, узнаваемые широконейтрализующими антителами, с использованием в качестве носителей полиэпитопного белка ТВ1, НВсAg и белка YkuJ — достигнута. Четко сформулированные задачи определяют дизайн и последовательность выполнения исследования. Работа проведена с использованием современных молекулярно-биологических, иммунологических, вирусологических и биохимических методов. Автором выполнен значительный объем исследовательской работы с постановкой независимых экспериментов и надлежащих контролей. Все это позволяет считать диссертационное исследование Рудометова А.П. соответствующим всем требованиям, предъявляемым к проведению научных исследований. Выводы — аргументированы, материалы работы были представлены на всероссийских и международных конференциях, а также опубликованы в журналах из списка ВАК Минобрнауки России.

7. Оценка содержания диссертации, ее завершенность в целом, замечания по оформлению

Представленная диссертация носит целостный и завершенный характер, изложена на 129 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, раздела собственных исследований, заключения, выводов, списка использованных сокращений и библиографического указателя, включающего 167 источника, в том числе 156 – иностранных. Работа иллюстрирована 34 рисунками, 3 таблицами, содержит 3 приложения

Во введении изложена актуальность темы исследования и степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы, а также основные положения, выносимые на защиту, апробация работы и личное участие автора. В обзоре литературы изложены последние данные по строению и жизненному циклу ВИЧ, описаны антитела, обладающие широкой нейтрализующей активностью, по отношению к ВИЧ, а также строение эпитопов, на которые они образуются; данные по разработке и результатам исследований кандидатных антигенов против ВИЧ, особое внимание уделено иммуногенам на основе тримеров поверхностных белков ВИЧ-1. В разделе «Материалы и методы» характеризует примененные автором материалы методы исследования. В работе использовались методы молекулярного клонирования, секвенирования, трансфекция клеток плазмидами и получение псевдовиральных частиц, электронная микроскопия, анализ кругового дихроизма, выделение и очистка белка, иммунизация лабораторных животных и получение сывороток, иммуноферментный анализ и Вестерн- и Дот-блот-анализ, постановка теста нейтрализации с использованием псевдовиральных частиц. Методы исследования описаны достаточно подробно, что свидетельствует о высоком уровне методической квалификации, необходимом для выполнения поставленных задач. Результатам собственных исследований посвящено три части. 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 НВсАg, экспонирующему имитатор эпитопа bNAb VRC01. Третья – получению и анализу антигенных и иммуногенных свойств рекомбинантных белков, несущих участки MPER ВИЧ-1, полученных на основе белков YkuJ и TBI. В заключение обобщены результаты проведенных исследований и делается вывод об их фундаментальной и прикладной значимости. Выводы обоснованы данными экспериментальных исследований, логично сформулированы. Принципиальных замечаний по оформлению работы нет.

8. Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации отражает ее основное содержание, включает все основные разделы, текст четко структурирован, результаты проведенных исследований хорошо проиллюстрированы.

9. Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати.

По теме диссертации опубликовано пять работ в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень научных журналов и изданий для опубликований основных научных результатов диссертации ВАК Минобрнауки России. Получен 1 патент. Материалы были также представлены на всероссийских и международных конференциях, по итогам которых опубликовано 20 тезисов. Публикации автора полностью отражают основные результаты проведенных исследований.

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

Таким образом, диссертация Рудометова Андрея Павловича является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи по созданию и усовершенствованию кандидатных вакцинных препаратов против ВИЧ, имеющее значение для развития молекулярной биологии, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени 03.01.03 – Молекулярная биология.

Отзыв обсужден на заседании секции №2 Ученого Совета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (дата проведения 23 октября 2018, Протокол №9)

Кандидат биологических наук

Коробова Светлана Вячеславовна

С.В. Коробова

115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

e-mail: info@nrcii.ru

Федеральное государственное бюджетное
Учреждение «Государственный научный центр
«Институт иммунологии» Федерального
медико-биологического агентства,
старший научный сотрудник лаборатории
полисахаридных вакцин

