

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу Щербаковой Надежды Сергеевны «Конструирование В-клеточных иммуногенов против ВИЧ-1 и изучение их способности индуцировать нейтрализующие антитела»,
представленную на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология**

Актуальность темы. Вирус иммунодефицита человека является одним из самых изученных вирусов. Достаточно подробно исследованы иммунологические аспекты протекания ВИЧ-инфекции в организме. Одна из интенсивно развивающихся областей в последние годы - это изучение антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении большого числа первичных изолятов ВИЧ-1 разных субтипов и рекомбинантных форм. Широко нейтрализующие антитела удается выделить у значительной части ВИЧ-инфицированных людей. Отличительная особенность таких антител – невосприимчивость к изменчивости структуры тримеров gp120/gp41 на поверхности вируса. Исследования показали, что пассивная иммунизация отдельными широко нейтрализующими антителами или коктейлем из антител защищали макаков от заражения рекомбинантным вирусом иммунодефицита человека/обезьяны при разных путях введения. Поэтому, одним из перспективных направлений в разработке анти-ВИЧ вакцины является создание иммуногена, который был бы способен индуцировать широко нейтрализующие антитела. На сегодняшний день накоплено много данных, которые говорят о том, что традиционные подходы, такие как убитые, живые аттенуированные, субъединичные вакцины в случае ВИЧ-1 не эффективны. В частности, это связано с тем, что практически все широко нейтрализующие антитела против ВИЧ-1 взаимодействуют с конформационными эпитопами, либо гликан-зависимыми, либо четвертичными. Это требует использование новых подходов. Одним из таких подходов является технология фагового дисплея. Фаговый дисплей позволяет получать пептиды, имитирующие эпитопы нейтрализующих антител, не только по структурным, но и по иммунологическим свойствам. Диссертационная работа Щербаковой Надежды Сергеевны связана с получением иммуногенов, способных индуцировать широко нейтрализующие антитела против ВИЧ-1. Иммуногены были сконструированы с использованием пептидов-имитаторов, полученных при помощи технологии фагового дисплея.

Научная новизна и практическая значимость исследования и полученных результатов. Научная новизна результатов диссертационной работы не вызывает сомнения. Автором были получены иммуногены, несущие в своем составе пептиды-

имитаторы 2F5 и 2G12-эпитопов. Впервые получена коллекция env-псевдовирусов субтипов, распространенных на территории Западной Сибири. В результате выполнения данной работы автором были депонированы в международную базу данных GenBank 3 полных генома ВИЧ-1, 22 фрагмента области генов *pol* и *gag* ВИЧ-1, 15 фрагментов гена *env* ВИЧ-1.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов. Достоверность полученных результатов обеспечена применением актуальной научно-методической базы, использованием современных молекулярно-биологических методов исследования и сертифицированного оборудования. Выводы основаны на достаточном экспериментальном материале и являются логическим завершением диссертационной работы. Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на международных и российских научно-практических конференциях.

Выводы, сделанные в диссертационной работе, соответствуют поставленным целям и задачам, обоснованы и логично вытекают из полученных результатов. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Результаты опубликованы в пяти статьях в журналах из списка ВАК Минобрнауки России.

Соответствие содержания и оформления диссертации правилам ВАК. Диссертация Щербаковой Н.С. изложена на 150 страницах, включает 34 рисунка, 11 таблиц. Она имеет классическую структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 308 источников преимущественно иностранных авторов.

Во введение автор обосновывает актуальность выбранной темы исследования, на основании чего формулирует цель и задачи работы, показывает научную новизну и практическую значимость исследования, формулирует положения, выносимые на защиту.

Глава «Обзор литературы» состоит из трех подразделов: первый посвящен описанию широко нейтрализующих антител к ВИЧ-1 и эпитопов на поверхности вируса, с которыми антитела взаимодействуют. Во второй части обзора литературы изложены различные подходы при создании иммуногенов, направленных на стимуляцию гуморального иммунного ответа. Отдельный подраздел посвящен подробному описанию феномена псевдотипирования в целом и env-псевдовирусам ВИЧ-1 в частности. На взгляд оппонента следует опубликовать обзор литературы представленной диссертации в виде обзора в серьезном научном журнале.

В главе «Материалы и методы» подробно описан широкий спектр методик, использованных автором в работе, включая такие молекулярно-биологические и

микробиологические, как ПЦР, клонирование, филогенетический анализ, работа с прокариотическими и эукариотическими культурами клеток. В целом, диссертационная работа Щербаковой Н.С. выполнена на высоком научно-методическом уровне.

В главе «Результаты и их обсуждение» приведены полученные данные. Глава разделена на три части: получение ВИЧ-иммуногенов, несущих имитаторы эпитопов нейтрализующих антител широкого спектра действия; конструирование панели *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 и оценка полученных ВИЧ-иммуногенов при помощи *env*-псевдовирусов. Большинство экспериментов и анализ полученных данных были выполнены лично диссертантом.

Следует отметить, что в работе использованы современные методы и интересные технические решения. В частности, автор столкнулся с проблемой низкой экспрессии TBI-2G12, для увеличения выхода химерного белка TBI-2G12 было решено перенести ген TBI-2G12 в плазмиду pET21a, содержащую сильный промотор РНК-полимеразы фага T7.

Общие замечания по диссертационной работе. Работа не лишена некоторых недостатков.

1. Не совсем понятны результаты представленные на рисунке 5.25. Выглядит, что сыворотки мышей иммунизированных с белком носителем TBI, способны нейтрализовать некоторые псевдовирусы.
2. Также не понятны механизмы синергичной нейтрализации псевдовируса PVO.4 комбинацией сывороток TBI-2G12 и TBI-2F5 (представленные в таблице 5.7), так как сыворотка мышей иммунизированных с TBI-2G12 сама по себе не имеет нейтрализующих свойств против этого псевдовируса.
3. Автор часто использует в тексте фразу "из рисунка ... видно....". Наверное, правильно писать "из данных представленных на рисунке ... следует (видно)....". Это следует учитывать автору диссертации при написании статей в будущем.
4. В диссертации не обсуждается как автор планирует дальнейшее внедрение результатов работы: в виде разработки вакцины для человека или иммунизация животных с целью получения моноклональных антител.

Заключение. Кандидатская диссертация Щербаковой Надежды Сергеевны «Конструирование В-клеточных иммуногенов против ВИЧ-1 и изучение их способности индуцировать нейтрализующие антитела», выполненная под руководством д.б.н., доцента Карпенко Ларисы Ивановны является законченной научно-квалификационной работой, в которой представлены результаты разработки иммуногена для индукции антител способных нейтрализовать ВИЧ. В работе использовались современные методы

