

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 208.020.01 на базе  
ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ  
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И  
БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В  
СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ  
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 06.10.2017 № 9

О присуждении Щербаковой Надежде Сергеевне, гражданке РФ,  
ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Конструирование В-клеточных иммуногенов против ВИЧ-1 и изучение их способности индуцировать нейтрализующие антитела» по специальности 03.01.03 – молекулярная биология принята к защите 31.05.2017 г., протокол № 7, диссертационным советом Д 208.020.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 630559, Новосибирская область, Новосибирский район, р.п. Кольцово, АБК, корпус 12, приказ Минобрнауки России от 07.12.2007 г. № 2397-1739, изменения от 20.11.2009 г. № 2136-877/1739, от 02.04.2010 г. № 766-302/1739, от 18.06.2010 г. № 1777-640/1739, от 16.07.2010 г. № 1777-837/1739, от 20.05.2011 г. № 1110-561/1739, от 18.11.2013 г. № 813 прил. 1, от 09.06.2014 № 310/нк, от 15.03.2016 № 326/нк, 18.11.2016 №1478/нк.

Соискатель – Щербакова Надежда Сергеевна, 1984 года рождения, в 2006 году окончила Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский государственный аграрный университет» с квалификацией «Зооинженер» по специальности «Зоотехния».

В 2009 году окончила очную аспирантуру в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Работает научным сотрудником в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Диссертация выполнена в отделе биоинженерии Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель - доктор биологических наук, доцент Карпенко Лариса Ивановна, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория рекомбинантных вакцин, заведующая лабораторией.

Официальные оппоненты:

Коваленко Сергей Петрович, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», лаборатория генно-инженерных методов исследования, руководитель лаборатории;

Шаповал Андрей Иванович, кандидат биологических наук, Российско-Американский противораковый центр Федерального государственного бюджетного общеобразовательного учреждения Высшего образования «Алтайский государственный университет», ведущий научный сотрудник, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное Учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, в своем положительном заключении, подписанном Коробовой Светланой Вячеславовной, кандидатом биологических наук, лаборатория полисахаридных вакцин, старший научный сотрудник, и утвержденном Хаитовым Мусой Рахимовичем, доктором медицинских наук, профессором, членом-корреспондентом РАН, исполняющим обязанности директора института, указала, что диссертация Щербаковой Надежды Сергеевны является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи по созданию кандидатных вакцинных препаратов против ВИЧ/СПИД и методов их оценки, имеющее значение для развития молекулярной биологии, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Соискатель имеет 13 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 5 работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, 4 наиболее значимые научные статьи с основным участием автора объемом 10, 8, 7 и 6 с., соответственно:

- 1) Shcherbakova N. S., Shcherbakov, D. N., Bakulina, A. Y., Karpenko, L. I., Ryzhikov, A. B., Ilyichev, A. A. Artificial polyepitope HIV-1 immunogen containing mimotope of 2F5 epitope // Protein and peptide letters. – 2016. – V. 23, - N. 2. – P.159-168.
- 2) Shcherbakova N.S., Shalamova L.A., Delgado E., Fernandez-Garcia A., Vega Y., Karpenko L.I., Ilychev A.A., Sokolov Y.V., Shcherbakov D.N., Perez-Alvarez L., Thomson M.M. Molecular Epidemiology, Phylogeny, and Phylodynamics of CRF63\_02A1, a Recently Originated HIV-1 Circulating Recombinant Form

Spreading in Siberia // AIDS Research and Human Retroviruses. – 2014. – V. 30. – N. 9. – P. 912-919.

3) Karpenko L.I., Scherbakova N.S., Chikaev A.N., Tumanova O.Yu., Lebedev L.R., Shalamova L.A., Pyankova O.G., Ryzhikov A.B., Ilyichev A.A. Polyepitope protein incorporated the HIV-1 mimotope recognized by monoclonal antibody 2G12 // Molecular Immunology. – 2012. – V. 50. – N. 4. – P. 193-199.

4) Щербакова Н.С., Чикаев А.Н., Карпенко Л.И., Ильичев А.А. Влияние биотинилирования антител 2F5 на отбор пептидов из комбинаторной фаговой библиотеки // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2012 - № 1. - С. 20-25.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

от канд. биол. наук Баранова К.О. (ФГБУН ИМКБ СО РАН, старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики) - отзыв полностью положительный; от д-ра мед. наук Лебедева Л.Р. (ИМБТ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, заведующий лабораторией нуклеиновых кислот и рекомбинантных белков) – отзыв полностью положительный; от канд. хим. наук Степанова Г.А. (ФГБУН ИХБФМ СО РАН, научный сотрудник лаборатории биотехнологии) – отзыв положительный, но содержит замечание о краткости в обсуждении «...кооперативного нейтрализующего действия смеси сывороток...»; от канд. хим. наук Тамковича Н.В. (ООО "Биолабмикс", руководитель отдела исследований и развития) – отзыв положительный, содержит вопрос о том, является ли представленность субтипов гена *env* в Западно-Сибирском регионе особенной на фоне общей эпидемиологической картины в России, а также два замечания, одно из которых технического характера, другое касается неочевидности улучшения общей иммуногенности белка ТВІ.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их компетентностью в области молекулярной биологии и иммунологии, большим количеством публикаций в этой области, высоким профессионализмом и согласием на оппонирование.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана методика конструирования В-клеточных иммуногенов, включающих пептиды-имитаторы эпитопов ВИЧ-1, на основе искусственного белка TBI;

предложена схема повышения эффективности экспрессии гена рекомбинантного белка TBI-2G12 за счет использования более сильного промотора;

доказана перспективность использования пептидов-имитаторов эпитопов ВИЧ-1, узнаваемых широконейтрализующими антителами 2F5 и 2G12, для индукции нейтрализующих антител против ВИЧ-1;

введены новые представления об использовании псевдовиральной системы для оценки эффективности искусственных ВИЧ-1 иммуногенов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано, что искусственные белки TBI-2F5 и TBI-2G12 способны индуцировать у лабораторных животных образование антител против широкого спектра изолятов ВИЧ-1;

применительно к проблематике диссертации результативно использован широкий спектр молекулярно-биологических и иммунологических методов, в т.ч. статистической обработки результатов;

изложены условия и методические подходы, применяемые для получения *env*-псевдовирусов ВИЧ-1;

раскрыты новые проблемы при проведении процедур получения и очистки рекомбинантных белков;

изучены иммуногенные свойства пептидов-имитаторов эпитопов ВИЧ-1, узнаваемых широконейтрализующими антителами 2F5 и 2G12, в составе белка TBI;

проведена модернизация существующих методик получения *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 для увеличения выхода псевдовиральных частиц.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработана и внедрена в практику лаборатории рекомбинантных вакцин ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора новая коллекция *env*-псевдовирuсов ВИЧ-1 рекомбинантной формы CRF6302\_A1, распространенной на территории Западной Сибири, полученные псевдовирuсы используются при проведении реакции нейтрализации;

определены на примере рекомбинантных белков TBI-2F5 и TBI-2G12 перспективы использования пептидов-имитаторов эпитопов ВИЧ-1 для конструирования В-клеточных иммуногенов;

создана схема получения коллекции *env*-псевдовирuсов ВИЧ-1, которая может быть использована при оценке эффективности действия вируснейтрализующих свойств антител и антиретровирусных препаратов;

представлены рекомендации по использованию *env*-псевдовирuсов ВИЧ-1 рекомбинантной формы CRF63\_02A1 при оценке вируснейтрализующей активности антител, в том числе, подобраны концентрации клеток, DEAE-декстрана и количество вносимых псевдовирuсов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ результаты получены на сертифицированном оборудовании с использованием наборов реагентов ведущих мировых производителей, охарактеризованных моноклональных антител, пептидов, плазмидных векторов и культур клеток, воспроизводимость результатов подтверждалась трехкратными повторами, а качество – референтными контрольными образцами;

теория о возможности создания широконейтрализующих антител предлагаемыми соискателем методами и использовании псевдовирuсных частиц для оценки их эффективности согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

идея создания искусственных В-клеточных иммуногенов базируется на глубоком анализе экспериментальных данных и их соотнесении с данными литературных источников;

использованы данные более 300 научных работ для сравнения с таковыми, полученными автором при разработке искусственных ВИЧ-1 иммуногенов;

установлено совпадение авторских результатов по субтипированию изолятов ВИЧ-1 с таковыми других авторов;

использованы современные методики получения и анализа данных, данные корректно обработаны с помощью методов математической статистики, выводы обоснованы всей совокупностью полученных экспериментальных результатов.

Личный вклад соискателя состоит в выполнении всех основных экспериментов, включая создание иммуногена TBI-2F5, выделение и очистку плазмид и рекомбинантных белков, постановку иммуноблотинга, иммунизацию лабораторных животных, проведение ИФА и ПЦР, конструирование и характеристику *env*-псевдовирусов ВИЧ-1, филогенетический анализ, оценку вируснейтрализующей активности сывороток иммунизированных животных с использованием *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 рекомбинантной формы CRF63\_02A1. Обсуждение результатов исследования и подготовка основных публикаций проводились с участием д-ра биол. наук, профессора Ильичева А.А., канд. биол. наук Рыжикова А.Б., канд. биол. наук Томсона М.М. Конструирование иммуногена TBI-2G12 выполнено совместно с Чикаевым А.Н. Электронные микрофотографии псевдовирусных частиц выполнены Зайцевым Б.Н., Тарановым О.С., отдел микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Секвенирование ДНК выполнено Бондарем А.А., ЦКП «Геномика», ИХБФМ СО РАН. Масс-спектрометрический анализ подготовленных образцов белков выполнен Дужак Т.Г., ИЦиГ СО РАН. Оценка вируснейтрализующей активности сывороток иммунизированных

животных с использованием *env*-псевдовирусов ВИЧ-1 субтипа В проводилась совместно с Шаламовой Л.А., отдел зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Молекулярный докинг пептида-имитатора 2F5 эпитопа с МКА 2F5 проводился Бакулиной А.Ю., теоретический отдел ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Планирование исследований и общее руководство работой осуществлялось д-ром биол. наук, доцентом Карпенко Л.И.

На заседании 06.10.2017 г. диссертационный совет принял решение присудить Щербаковой Н.С. ученую степень кандидата биологических наук. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 22 человека, из них 8 докторов наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, биологические науки, участвовавших в заседании, из 28 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 22, против нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель

диссертационного совета

Ученый секретарь

диссертационного совета

06.10.2017 г.



Агафонов Александр Петрович

Зубавичене Наталья Маратовна