

**Oponentský posudek na disertační práci Josefa Vlasáka
„Passive immunoprophylaxis against primate immunodeficiency virus
transmission using human neutralizing monoclonal antibody .“**

Tato obhajoba se koná téměř přesně po 10 letech (bylo to 18. května 1997), co president USA, Bill Clinton, pronesl výzvu světu „If the 21st century is to be the century of biology, let us make an AIDS vaccine its first great triumph“. Poslušna této výzvy, předložená disertační práce Josefa Vlasáka je souborem 6 publikací zabývajících se potenciálním využitím protilátek proti HIV-1 v prevenci HIV infekce. Veškerá práce byla provedena na pracovišti Ruth Ruprecht, profesorky Mediciny na Harvard Medical School, Department of Cancer Immunology and AIDS, Dana –Farber Cancer Institute, Boston. Práce směřují k vývoji vakcín založených na pasivní imunisaci s použitím neutralisujících monoklonálních protilátek namířených proti konservativním oblastem obalu HIV.

V první ze 6 prací, publikované v Nature Medicine (IF = cca 29), použil 19ti členný autorský tým, jehož byl J. Vlasák členem (4. v pořadí) kombinaci lidských monoklonálních protilátek proti HIV-1 k imunisaci 4 pregnantních makaků, a posléze i novorozenců, aby ukázal, že tyto IgG 1 monoklonální protilátky chrání novorozence proti jak proti parentální tak mukosální infekci chimerickým lidsko – opičím virem imunodeficiencie SHIV.

Postnatální pasivní imunisace je rovněž thematem další práce, publikované více než 20ti členným autorským týmem (J. Vlasák je druhým autorem) v J. Virology (IF > 5), ve které testovali autoři účinnost imunoprophylaxe s aplikací kombinace protilátek pouze postnatálně. I třetí a čtvrtá práce, obě publikované v J Med. Primatol. se týká pasivní imunisace a ochrany před orální HIV transmisí.

Práce pátá se zabývá více sekvenční analýzou a autoři popisují nález podobných mutací viru do virulentnějších forem u jednotlivých hostitelů různých živočiš. druhů a to jak u forem viru vyvíjejícího se leta, tak u forem selektovaných rychlým vývojem *in vivo* pasážemi.

Práce poslední, ve které je J. Vlasák prvním ze dvou autorů je publikovaná v časopise AIDS (IF 5,8) jako „Opinion“. Autor (se svým supervisorem) shrnují své poučené názory na to jakým směrem by se vývoj vakcín měl nebo mohl ubírat.

Prof. R. Ruprecht potvrzuje svým podpisem v disertační práci, že autor svou prací přispěl významně k publikacím jež tvoří náplň předložené práce. Vzhledem k závažnosti řešeného thematu i ke kvalitě časopisů v nichž byly práce publikovány (Nature Medicine, J. Virol., AIDS) i k počtu publikací (6) je úloha oponenta snadná – až formální:

Může bez váhání konstatovat, **závěrem, že**

disertační práce Josefa Vlasáka, jež součástí výzkumu rozsáhlého týmu hostitelské Dana-Farber laboratoře, je na vysoké vědecké úrovni a představuje hodnotný příspěvek výzkumu vedoucího k prevenci HIV infekce. Autor předložil práci, která kvalitou i počtem publikovaných prací překračuje rámec průměrných disertačních prací. Vřele doporučuji, aby disertační práce byla přijata jako podklad pro další řízení k udělení doktorského titulu.

Otázky do diskuse:

1. HIV má řadu mechanismů jak uniknout dozoru imunitnímu systému, což činí vývoj vakcín nesnadným. Jednou z komplikací je skutečnost, že gp 120 je velmi silně glykosylovaný. Vy jste v kombinaci protilátek použili také neutralisující protilátku 2G12 která je namířena proti manosovým zbytkům. Cukry jsou však obecně slabými imunogeny. Uvažuje se o nějaké cestě, jak zacílit vakcíny na další cukerné epitopy HIV obalu?
2. Jaký je Váš názor na budoucnost vývoje HIV vakcín založených na buněčné imunitě?

V Praze dne 18. 5. 2007

Jitka Forstová

OPONENTSKÝ POSUDEK

na disertační práci Mgr. Josefa Vlasáka Passive immunoprophylaxis against primate immunodeficiency virus transmission using human neutralizing monoclonal antibodies

Mgr. Josef Vlasák předkládá k disertaci ucelený soubor pěti původních prací z let 2000 až 2002, na jejichž vzniku se podílel jako spoluautor, a jednu přehlednou práci z loňského roku, kde je prvním autorem. Všechny publikace vznikly v laboratoři Dr. Ruth M. Ruprechtové v Dana-Farber Cancer Institute v Bostonu. Takto vysoký počet článků publikovaných ve velmi kvalitních časopisech (Nature Medicine, Journal of Virology) umožňuje předložení zkrácené disertace, kde je soubor prací doplněn jen úvodem a literárním přehledem.

Hlavním tématem disertace je studium pasivní protilátkové profylaxe viru SHIV způsobujícího imunodeficienci u primátů. Virus SHIV, kombinující virus opičí imunodeficiency (SIV) s obalovým glykoproteinem viru lidské imunodeficiency (HIV-1), umožňuje testovat neutralizační účinnost monoklonálních protilátek při různých aplikacích viru a jejich schopnost ochránit imunisované makaky před virovou infekcí. Zvířecí model *in vivo* prokazuje efekt pasivní imunisace při aplikaci viru na ústní sliznici a perinatální transmissi viru z matky na potomky. Koktejl tří lidských monoklonálních protilátek s definovanými epitopy je použitelný jak před tak i po expozici viru. Výsledky experimentů *in vivo* naznačují použitelnost pasivní imunisace i v ochraně před transmisí HIV-1 z matky na dítě.

Problematiku přípravy protilátkové vakcíny proti HIV-1 kriticky rozebírá přehledná práce J. Vlasáka a R.M. Ruprechtové publikovaná v r. 2006 v časopise AIDS. Hlavními tématy zde jsou použití relevantní dávky viru na experimentálních primátech, generalizace výsledků získaných pomocí rekombinantního viru SHIV a nutnost zaměřit imunoprofylaxi na neutralizační protilátky proti virům rané fáze, které překonávají bariéry slizniční imunity. Zaujala mne zde data o transmissi HIV-1 opakovanými malými dávkami viru, jak se tomu děje při heterosexuálním styku. Kvantitativní údaje zde citované pocházejí z Ugandy a byly publikovány v lokálním časopisu. Nakolik jsou to data relevantní pro obecnější úvahy o protilátkové interferenci infekce HIV-1?

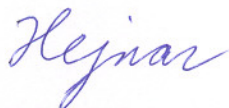
V úvodu k disertaci se J. Vlasák zabývá obecně problematikou protilátkové neutralisace HIV-1 v průběhu infekce, modelem SHIV a dosavadními studii pasivní imunisace u makaků a šimpanzů. Vzhledem k tomu, že práce předkládané k disertaci byly publikovány před pěti až šesti lety, jedná se o velmi potřebný komentář problematiky z dnešního pohledu. Přesto autor nedovedl literární přehled až do současnosti, pouze do r. 2004 (je zde jediná citace z roku 2005!). Jak je to s pasivní imunisací v klinickém testování? Podle mých povrchních znalostí jsou v pokročilém stadiu klinických zkoušek rekombinantní anti-HIV-1

vakcíny povzbuzující buněčnou imunitu. Směřuje koncept pasivní imunizace od *in vivo* experimentů na primátech k praktickému použití při ochraně před přenosem z matky na plod či novorozence?

Velký počet článků publikovaných v náročných časopisech (zdaleka ne všechny práce jsou v disertaci explicitně uvedeny) stejně jako dlouhodobý pobyt na vynikajícím pracovišti jsou zárukou odborné kvality disertanta. Ačkoli Mgr. Vlasák není prvním autorem žádné původní práce, jeho přínos k souboru prací byl podle sdělení prof. Ruprechtové podstatný a tvůrčí. Bylo by ovšem vhodné podrobně uvést, jakou částí práce disertant k výsledkům přispěl. Na závěr konstatuji, že Mgr. J. Vlasák ve více než vrchovaté míře osvědčil svoji schopnost samostatně vědecky pracovat a proto vřele doporučuji, aby jeho disertační práce byla kladně přijata.

V Praze dne 14. května 2007

RNDr. Jiří Hejnar, CSc.



Referee's review on doctoral thesis of Josef Vlasák

Josef Vlasák has submitted a doctoral thesis entitled 'Passive immunoprophylaxis against primate immunodeficiency virus transmission using human neutralizing monoclonal antibodies' that worked out within his long lasting research work placement in the Dana-Farber Cancer Institute in the U.S.A. The dissertation thesis is composed of 6 scientific publications of those 5 ones are research papers and the last one published recently in the 'AIDS' magazine seems to be more a review paper addressing some of highly topic aspects of HIV and immune response of hosts regarding a route of transmission, tropism, target cell distribution, mucosal interactions in primates, a question of protective potential of neutralizing antibodies against heterologous virus challenge. Josef Vlasák has written the overview paper as the first author, whereas in case of whole set of research articles, he is one of co-authors as a member of the large research teams. This is a circumstance, however, which does not reduce Josef Vlasák's merit on such outstandingly worthwhile collection of publications at all. He had always played a crucial role as the 2nd or 3rd co-author in the order of whole bunch of participants. Research area of medical virology/immunology in which Josef Vlasák has found a sense of his scientific career belongs to those of highest importance as well as challenge. And Josef Vlasák has succeeded in such highly competitive research of modern experimental medicine, and publications in such journals as Nature Medicine, Journal of Virology, Journal of Medical Primatology and AIDS have proved the highest quality of the research work of his and his colleagues. The Dana-Farber Cancer Institute belongs to the leading research institutions in the area of cancer research in the world including malignant disorders of viral etiology, and therefore Josef Vlasák has successfully taken advantage of unique methodical approaches including the experimental work on monkeys. Nowadays, HIV infections resulting into AIDS disease in human is one of the most serious problem of health and quality of life in recent human society. Amazingly high ability of HIV virions to change their features during its life cycles has made situation even worse, and has resulted into searching aimed at rational protection/therapy against HIV agent. Results of the research group at the D-FCI that Josef Vlasák and his colleagues have achieved are very much promising in terms of making protection/therapy of HIV infected human more efficient by means of immunotherapy using targeting effect of therapeutic monoclonal antibodies.

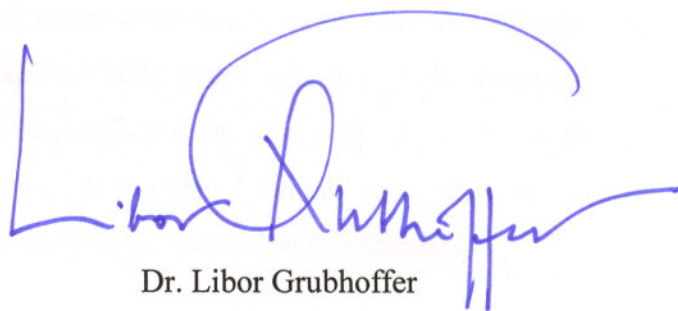
I have a few question on the Ph.D. candidate/author of doctoral thesis regarding the topic of his dissertation.

- 1) I would appreciate if a procedure of preparation of human monoclonal antibodies with potential therapeutic effect could be briefly described. Is it possible to use the recombinant monoclonal antibodies made in phage displayed libraries?
- 2) Oligosaccharides/glycans of HIV envelope glycoproteins have been considered as the main source of antigenic variability. How did you check/measure an interaction of the human MAbs with oligosaccharide moieties.
- 3) Glycosylation of HIV envelope glycoprotein depends on glycosylation apparatus of the host cells. Did you check differences in glycosylation products in human and macaque host cells.
- 4) Is there any significance/correlation of the binding affinity (a value of the binding constant) of neutralizing monoclonal antibodies to the target antigenic structure (epitope) in terms of their ability to make escaping/resistant HIV mutants?

In conclusion:

Taking advantage of referee's obligation I would like to state that the Josef Vlasak's doctoral dissertation fulfils all requirements in terms of science as well as formal traits. The author of dissertation has achieved and published such great results of the highest acknowledgement. Therefore, it is my great pleasure to support the Josef Vlasák's dissertation as a doctoral thesis and based on its successful defence to award Josef Vlasák a Doctor Philosophy (Ph.D.).

In České Budějovice, May 14, 2007



Dr. Libor Grubhoffer