

ОТЗЫВ

Акпарова Валерия Халильбековича, старшего научного сотрудника лаборатории №11 ФГУП «ГосНИИгенетика Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», кандидата химических наук по специальности 02.00.10 Биоорганическая химия.

на автореферат диссертации Воробьева Ивана Ивановича «Методы функциональной экспрессии генов, кодирующих фармацевтически значимые гликопротеины», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Диссертационная работа, представленная И.И. Воробьевым, посвящена разработке систем гетерологичной экспрессии терапевтических гликопротеинов человека в клетках млекопитающих а также получению гликоконъюгатов *in vitro*.

Несмотря на то, что экспрессию рекомбинантных белков в гетерологичных системах активно изучают на протяжении последних десятилетий, универсального подхода для экспрессии сложных белков человека не выработано, что связано уникальным набором лимитирующих факторов для каждого конкретного белка - в ряде случаев с нестабильностью их мРНК, нестабильностью самих полипептидов в культуральной среде, их сложным пост-трансляционным процессингом, с необходимостью балансировки уровня цепей гетеродимеров. Для многих известных по литературе продуцентов терапевтических белков, в том числе использующихся в промышленном производстве, уровень экспрессии крайне невысок. Для создания конкурентоспособных биоаналоговых препаратов продуктивность клеток, безусловно, должна быть значительно повышена, что требует глубокого понимания механизмов регуляции экспрессии и метаболизма клеток млекопитающих.

Диссертант вводит в состав векторной плазмиды оригинальную комбинацию генетических элементов – некодирующие участки гена EEF1A1 и фрагмент конкатемера длинного концевого повтора вируса Эпштейна-Барр (EBV-TR) и использует оригинальные схемы амплификации трансгена, позволившие добиться значительного увеличения продуктивности гетерологичной экспрессии по сравнению со стандартными векторами. Особенно наглядно это видно для случая фактора VIII свертывания крови человека – одного из самых сложных для гетерологичной экспрессии терапевтических белков, обладающего гигантской нестабильной мРНК с криптогенными сайтами сплайсинга и довольно нестабильным белковым продуктом. Продуктивность полученных продуцентов фактора VIII с делецией В-домена достигала 40 МЕ/мл культуры при простом периодическом культивировании, что существенно превосходит опубликованные ранее показатели.

При экспрессии фактора IX свертывания крови в геном клеток вводились также гены ферментов пост-трансляционного процессинга – фурина человека и витамин-К-оксиредуктазы китайского

хомячка, что позволило получить линии с продуктивностью около 6 МЕ/мл культуры, также превосходящие мировые аналоги.

В диссертации описано также получение продуцентов гетеродимерных белков – лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов человека, причем с применением как трицистронных экспрессионных конструкций (для ФСГ), так и ко-экспрессии бицистронных конструкций, кодирующих разные цепи гетеродимера (для ЛГ). Использование трицистронной конструкции не избавило от необходимости проведения дополнительной трансфекции конструкцией, кодирующей индивидуальную цепь ФСГ. Однако полученный продуцент ФСГ с продуктивностью 80 мг/л культуры также значительно превосходит мировые аналоги по продуктивности.

Для исследованных автором терапевтических белков – факторов VIII и IX, ФСГ диссертантом разработаны схемы выделения и очистки, позволяющие получать гомогенные препараты активных терапевтических белков, соответствующих фармакопейным показателям по удельной активности.

Необходимо отметить, что препарат биоаналогового фактора IX успешно прошел доклинические испытания, биоаналоговый ФСГ успешно прошел и доклинические и клинические испытания в РФ и зарегистрирован в РФ для клинического применения.

Таким образом, автору удалось продемонстрировать, что разработанная система экспрессионных векторов, процессы получения клональных линий-продуцентов и белков могут использоваться для создания промышленно пригодных клеток-продуцентов фармацевтически значимых белков.

Наряду с биосинтетическим получением терапевтических гликопротеинов в работе описывается также получение химических конъюгатов полипептидных гормонов инсулина и окситоцидина человека и полисиаловой кислоты. Показано, что модифицированные гормоны сохраняют биоактивность и обладают пролонгированным эффектом в опытах *in vivo*. Что также является перспективным подходом к получению терапевтических белков, поскольку урежение инъекций улучшает качество жизни пациентов.

Работа Воробьева И.И. выполнена на высоком научном и методическом уровне. Достоверность полученных результатов сомнений не вызывает, выводы вполне обоснованы. Автореферат написан ясно, логично, хорошим языком. Рисунки удачно иллюстрируют основной текст, оформление автореферата диссертации Воробьева И.И. удовлетворяет требованиям ВАК. Изложенные результаты адекватно отражены в опубликованных печатных работах.

В диссертации Воробьева И.И. «Методы функциональной экспрессии генов, кодирующих фармацевтически значимые гликопротеины» изложены новые научно обоснованные биотехнологические решения в области получения терапевтических белков в клетках млекопитающих. Внедрение этих решений, которое уже успешно произведено для ряда препаратов, вносит значительный вклад в развитие такой стратегической отрасли народного

хозяйства как биофармацевтика. Организация импортозамещающих производств биологических лекарственных средств имеет важнейшее социально-экономическое и хозяйственное значение.

В.Х.Акпаров,

кандидат химических наук, старший научный сотрудник

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» 117545 Россия, Москва
1-й Дорожный проезд, д. 1

15.10.2019


В.Х.Акпаров

Подпись руки к.х.н., с.н.с. В.Х.Акпарова заверяю

Начальник отдела кадров Института




Р.В. Виденеева