

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию 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

1. Актуальность избранной темы.

Управление механизмами экспрессии генов эукариот является одной из центральных проблем современной биологической науки. Получение фармацевтически значимых гликопротеинов – одна из важнейших задач на стыке биохимии и биотехнологии. Получение фармацевтически значимых гликопротеинов предполагает гетерологическую экспрессию в культивируемых клетках млекопитающих, секретирующих гликозилированные белки в культуральную среду, или химическую конъюгацию биополимеров и белков.

Разработка методических подходов к получению высокопродуктивных линий клеток млекопитающих требует глубокого понимания процессов регуляции экспрессии генов. Известно, что для различных фармацевтически значимых белков секреция лимитирована разными факторами – количеством и стабильностью мРНК, одной или несколькими пост-трансляционными модификациями, скоростью деградации белкового продукта. Для многих белков скорость-определяющая реакция биосинтеза не установлена. Современный уровень развития генетической инженерии позволяет реализовать в виде плазмиды или дефектного по репликации вируса практически любой дизайн набора генетических элементов и ввести их в геном культивируемых клеток в виде большого числа копий. Открытые рамки считывания белков можно помещать в различный контекст, изменяя как транскрипционную активность полученных искусственных генов, так и стабильность генома клетки в целом.

Важнейшими характеристиками для клеточных линий-продуцентов терапевтических белков являются их удельная продуктивность, постоянство продуктивности при непрерывном культивировании в течение 60-90 дней, а также корректность и полнота пост-трансляционного процессинга целевого белка.

Развитие современной биологии корректирует наши представления об оптимальном дизайне регуляторных последовательностей, обеспечивающих такое функционирование клеток.

Так, в свете последних работ по молекулярной биологии представляется целесообразным введение в экспрессионные векторы, используемые для получения стабильных линий, дополнительных регуляторных участков ДНК, препятствующих гетерохроматинизации возникающей геномной вставки. Использование промоторов, минимально чувствительных к

инактивации метилированием сменило популярное ранее представление о целесообразности использования сильных вирусных промоторов для увеличения уровня экспрессии.

Среди культивируемых клеток млекопитающих, используемых в биофармацевтике, широко применяется линия клеток яичника китайского хомячка (СНО) и ее производные сублинии. Создание специализированной генетической системы для экспрессии целевых генов в этих клетках, с использованием регуляторных последовательностей из генома СНО, а также разработка подходов для селекции и геномной амплификации клеток, несущих данные генетические кассеты, имеет как прикладное значение для создания оригинальных и воспроизведенных лекарственных средств, так и фундаментальное значение для изучения функционирования генома и экспрессии генов млекопитающих.

Разработанные диссертантом методические подходы были последовательно применены для создания промышленных технологий получения факторов свертывания крови VIIa, VIII, IX, фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ) гормонов человека - терапевтически значимых гликопротеинов, входящих в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения в Российской Федерации.

Наряду с обеспечением нужного паттерна посттрансляционных модификаций терапевтических белков силами клеток-продуцентов, важной задачей современной биохимии является создание искусственных гликопротеинов, заменяющих в медицинской практике природные негликозилированные или слабо гликозилированные полипептиды. Одним из возможных подходов к получению таких гликопротеинов является химическая конъюгация интактных полипептидов с природным линейным полисахаридом – полисиаловой кислотой, позволяющая увеличить время их полувыведения из системной циркуляции. Варианты решения задачи получения таких конъюгатов исследованы на примерах инсулина и полипептидного гормона - окситомодулина, родственного глюкагону. Как сами эти препараты, так и методология конъюгации в целом представляют очевидный интерес для современной биофармацевтики.

Таким образом, тема диссертационной работы И.И. Воробьева представляется актуальной с научной и практической точек зрения.

2. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Диссертационная работа И.И.Воробьева построена по общепринятому плану и содержит следующие основные разделы: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы.

Во введении дано краткое описание научной проблематики работы, ясно обоснована актуальность и значимость работы.

Обзор литературы написан на должном научном уровне, в нем проанализирован достаточный

объем публикаций, посвященных биосинтезу, структуре и функциям факторов свертывания крови VII, VIII и IX, а также гетеродимерных гормонов ЛГ и ФСГ. Даны развернутые характеристики известных продуцентов этих белков, перечислены их основные достоинства и недостатки, проанализированы факторы, ограничивающие продуктивность известных экспрессионных систем и рассмотрены возможные пути ее увеличения и их промышленная пригодность. Также в литературном обзоре рассмотрены известные способы получения пролонгированных форм инсулина, окситоцидина и родственных ему гормонов.

Раздел «Материалы и методы» позволяет полностью реконструировать последовательность действий по получению генетических конструкций, получению клеточных-линий-продуцентов, выделению и очистке терапевтических белков, синтезу гликоконъюгатов. Автором был использован широкий спектр методов молекулярной биологии, биохимии, биоинформатики и клеточной биологии.

Раздел «Результаты и обсуждение» разделен на девять частей, каждая из которых, в свою очередь, разбита на подразделы, соответствующие логическим шагам исследования.

В первой части рассмотрено создание линии клеток-продуцентов фактора VII в клетках линии ВНК-21 при помощи коммерчески доступной векторной плазмиды с промотором фактора элонгации трансляции 1а человека.

Во второй части стандартная экспрессионная система, но уже в клетках СНО, использована для получения линии продуцента фактора VIII с делецией В-домена. Для препаративной очистки фактора VIII с делецией В-домена предложен оригинальный иммуноаффинный сорбент на основе полученных научной группой автора диссертации моноклональных антител к фVIII.

В третьей части работы подробно рассказывается о дизайне генетических элементов для оригинальной системы экспрессии р.1.1 для экспрессии в клетках СНО. Для ее получения создали минимальный базовый вектора рВL, в который вставили собранные из фрагментов длинные фланкирующие области гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка и фрагмент вирусного повтора EBV (его функциональная значимость подтверждена для модельного белка eGFP). Установлено, что векторная плазида р1.1, включающая некодирующие последовательности ДНК из области гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (EEF1A1) китайского хомячка и фрагмент конкатемера длинного концевго повтора вируса Эпштейна-Барр (EBV-TR) интегрируется в геном клеток СНО с существенно повышенной вероятностью и позволяет эффективно экспрессировать гены целевых белков. Данные функциональные элементы использованы также для получения целого семейства векторов серии р1.2 с различными совместимыми друг с другом селекционными маркерами.

В четвертой части работы описано получение и характеристика линий-продуцентов фактора VIII с делецией В-домена на основе векторной плазмиды р1.1, исследовано влияние условий культивирования на продуктивность, в частности солей алкановых кислот, модулирующих

транскрипционную активность хроматина. Продемонстрированы подходы к очистке, позволяющие получить белок фармацевтического качества, с использованием коммерчески доступного аффинного сорбента, а также компьютерное моделирование для поиска перспективного синтетического лиганда для очистки фVIII из среды. На примере линии клеток СНО, секретирующей делеционный вариант фактора VIII свертывания крови человека показано, что уровень секреции нестабильных гликопротеинов большого размера может быть многократно увеличен при использовании специализированного плазмидного вектора и многоступенчатой амплификации генетических кассет в геноме продуцентов.

В пятой части работы продемонстрирована ко-экспрессия гена целевого белка и вспомогательных генов на примере фактора свертывания крови IX, секреция которого лимитирована скоростью процессинга пропептида и гамма-карбоксилирования. Описано создание и характеристика линии клеток-продуцентов 3В12-86, несущих гены целевого белка, протеазы PACE/furin и компонента ферментного комплекса VKOR или VKORC (vitamin K oxireductase complex)- субъединицы 1 комплекса 2,3-эпоксиредуктазы витамина К (VKORC1, EC 1.1.4.1), а также выделение и очистка продукта - фактора IX из культуральной среды. На примере линии-продуцента фактора свертывания крови IX продемонстрировано, что разработанные плазмидные векторы могут быть применены для последовательных трансфекций целевого гена и вспомогательных генов.

В шестой части работы на примере ФСГ человека описана ко-экспрессия пары генов, образующих гетеродимерный гликопротеин, при помощи трицистронного вектора. Разобрано получение и характеристика клональных линий-продуцентов ФСГ, получение очищенного ФСГ, пригодного для клинического применения и его характеристика, создание фармацевтической композиции прототипа лекарственного средства ФСГ, доклинические исследования субстанции и клиническое исследование лекарственного препарата ФСГ. В целом для случая фолликулостимулирующего гормона человека показано, что использование трицистронной матрицы, кодируемой плазмидой p1.1, в которой открытые рамки считывания двух субъединиц гетеродимерного целевого белка соединены при помощи внутреннего сайта связывания рибосом, позволяет получить линию-продуцент гликопротеина с исключительно высокой удельной продуктивностью и способностью секретировать преимущественно гетеродимерный целевой белок.

Седьмая часть работы посвящена получению лютеинизирующего гормона при одновременной амплификации пары экспрессионных плазмид в геноме клеток-продуцентов. Возможность и условия ко-амплификации пары плазмид показаны на примере модельных флуоресцентных белков и затем на генах цепей гормона. На примере лютеинизирующего гормона человека установлено, что разработанные векторные плазмиды позволяют вести ко-амплификацию пары

целевых генов, один из которых связан с амплифицируемым маркером устойчивости, а второй – с неамплифицируемым маркером.

В восьмой части работы рассмотрен принципиально другой способ получения гликопротеинов - метод химической конъюгации с полисиаловой кислотой. При помощи метода химической конъюгации полисиаловой кислоты и полипептидов получены чистые препараты гликоконъюгатов инсулина и окситомодулина, обладающие пролонгированной биологической активностью на животных моделях.

В девятой части работы описано получение в гетерологической системе гетеродимерных белков другого класса - моноклональных антител и рассмотрен механизм взаимодействия каталитических антител с фосфоорганическими субстратами. Установлено, что каталитические антитела А5 и А17 образуют с фосфоорганическим веществом фосфонат X ковалентное соединение, при этом механизм реакции может быть описан как индуцированное соответствие.

В разделах «Обсуждение результатов» и «заключение» на тринадцати страницах обобщаются данные, рассмотренные в разделе «Результаты».

Все вынесенные на защиту положения и выводы обоснованы полученными автором экспериментальными данными.

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

Литературный обзор диссертации включает большинство релевантных источников по теме работы, в основном оригинальные научные статьи и, таким образом, представляется вполне достоверным. Проведенные экспериментальные исследования по большей части полностью оригинальны, их достоверность подтверждена рецензированием рукописей соответствующих научных работ и экспертизой патентных заявок. Основные выводы, сформулированные в диссертации, также являются достоверными, большая часть полученных автором результатов обладает несомненной научной новизной.

4. Значимость для науки и практики полученных автором результатов.

Полученные результаты, состоящие в разработке и молекулярно-биологической характеристике систем экспрессии гликопротеинов, основанной на применении специализированных плазмидных векторов, оптимизированных для клетки-хозяина, представляет большой практический интерес для биофармацевтики. Подходы к получению гликопротеинов методом химической конъюгации представляются перспективными для получения целого ряда терапевтических полипептидов пролонгированного действия. Результаты, полученные автором, создают базу для эффективной наработки факторов свертывания крови, гетеродимерных гормонов человека и моноклональных антител, для получения фармацевтических препаратов.

5. Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.

Разработанное автором семейство плазмидных векторов может применяться для создания систем экспрессии других фармацевтически значимых белков, в частности - моноклональных антител, а дальнейшие эксперименты с комбинированием функциональных элементов генома СНО позволят уточнить современные представления о механизмах активации транскрипции. Полученные линии-продуценты терапевтических гликопротеинов могут быть использованы в биофармацевтическом производстве.

6. Оценить содержание диссертации, ее завершенность.

Объем рукописи диссертации, составляющий 263 страницы машинописного текста, адекватен проведенному диссертантом исследованию. Диссертация содержит 31 таблицу и 59 иллюстраций, что позволило автору в достаточной мере структурировать представление полученных им данных и представить все необходимые читателям данные, фотографии и сканограммы результатов экспериментов. Литературный аппарат работы содержит 305 источников. В обзоре литературы использованы как основополагающие, так и недавние публикации, преимущественно зарубежных авторов, что значительно облегчает понимание экспериментального раздела работы. Описываемое в диссертационной работе Воробьева И.И. научное исследование является полностью завершенным. Автореферат работы, опубликованные статьи и патенты РФ полностью отражают содержание диссертации.

7. Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе соискателя в целом.

Работа, представленная автором, является важным научным исследованием, выполненным на высоком теоретическом и экспериментальном уровне. Хочется отметить, что работа представляет собой исследование, имеющее фундаментальную базу, основанную на глубоком знании механизмов регуляции экспрессии и биохимии, которые используются для получения практических результатов. Таким образом, большим успехом работы является проделанный автором путь от фундаментальных исследований к получению прикладных результатов – вплоть до внедрения разработанных технологий в фармацевтическое производство и успешное прохождение клинических испытаний. Представленная работа отличается четкостью, продуманностью и обоснованностью построения. Обращает на себя внимание и широкий спектр экспериментальных методов, применяемых автором. О важности работы свидетельствуют не только статьи в реферируемых журналах, но и полученные автором патенты. К диссертационной работе могут быть предъявлены следующие замечания.

При создании конструкций автор не использует MAR/SAR элементы. Данные элементы, являющиеся участками прикрепления ДНК к ядерному матриксу, достаточно активно используются при создании конструкций для экспрессии белков, в частности, для экспрессии целевых белков в животных и растениях. Элементы MAR/SAR защищают трансген, встроенный в ДНК хозяина, от воздействия окружающего хроматина. Было


показано, что данные элементы обладают способностью повышать уровень транскрипции трансгена и уровень продукции белка. Хотелось бы понять, почему автор не использует данные элементы. Ведь, возможно, при их использовании удалось бы повысить уровень наработки целевых белков.

Следует отметить, что сделанное замечание не относится к основному содержанию работы и не влияют на ее высокую оценку.

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


На основании выполненных автором диссертационной работы исследований разработаны теоретические положения и научно-обоснованные технические решения, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие страны и повышение конкурентоспособности отечественной биофармацевтической промышленности. Диссертационная работа И.И. Воробьева «Методы функциональной экспрессии генов, кодирующих фармацевтически значимые гликопротеины» по своему содержанию, уровню проведенных исследований, актуальности выбранной темы, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности полученных результатов, их научной и практической значимости в полной мере соответствует положениям Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года N 842 «О порядке присуждения ученых степеней» в редакции (ред. от 01.10.2018), а ее автор, Воробьев Иван Иванович, заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

Заведующая лабораторией факторов транскрипции
ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А.
Энгельгардта РАН
д.б.н., профессор



(подпись) Георгиева С. Г.

Подпись Георгиевой С.Г. удостоверяю
Ученый секретарь ФГБУН Институт молекулярной
биологии им. В.А. Энгельгардта РАН



(подпись) Бочаров А. А.

Дата 17.09.2019

