

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Воробьева Ивана Ивановича

«Методы функциональной экспрессии генов, кодирующих фармацевтически значимые гликопротеины», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия

Диссертация Ивана Ивановича Воробьева посвящена разработке методов получения лекарственных препаратов – рекомбинантных белков человека. Нет необходимости убеждать кого-либо в высочайшей актуальности и практической значимости данной работы. Получение рекомбинантных белков для медицинского применения является одной из наиболее востребованных, динамично растущих областей биотехнологии. Согласно исследованиям данного рынка компанией Creative biomart, лекарства на основе рекомбинантных белков составляют до 10% рынка назначаемых лекарственных препаратов. В то время как в 1989 году продажи лекарственных рекомбинантных белков составляли «всего» 4.7 миллиардов долларов, уже в 2001 они достигли 28.5 миллиардов, в 2004 – 34.7 миллиардов, более 100 миллиардов в 2011 году, при прогнозе на 2020 год свыше 600 миллиардов долларов. При этом, как мы с Вами догадываемся, на долю США и стран западной Европы приходится свыше 80% производства данных лекарств. Производством подобного высокотехнологичного продукта занимаются огромные биофармацевтические корпорации Amgen, Biogen IDEC, Johnson & Johnson, Eli Lilly, Novo Nordisk, Roche и другие им подобные. При этом многие из лекарств на основе рекомбинантных белков входят в перечень жизненно важных препаратов Министерства здравоохранения Российской Федерации. Президент Российской Федерации В.В. Путин на заседании Совета по науке и образованию, прошедшему примерно год назад, поставил перед российскими учеными задачу достижения технологической независимости в ключевых сегментах фарминдустрии. Решению именно этой актуальной задачи и посвящена диссертационная работа И.И. Воробьева. Диссертация Ивана Ивановича Воробьева построена по классической схеме и состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы и список литературы. Диссертация изложена на 264 страницах машинописного текста и содержит 31 таблицу и 59 рисунков. Список цитируемой литературы насчитывает 305 источников.

Обзор литературы посвящен, во-первых, общим принципам, проблемам и решениям проблем получения рекомбинантных белков человека. Во-вторых, основное содержание обзора литературы сконцентрировано на особенностях строения, функционирования и получения в системах экспрессии тех белков, с которыми автор провел экспериментальную работу. Среди них факторы свертывания крови VII, VIII и IX, фолликулстимулирующий и лютеинизирующий гормоны, а также инсулин и окситоцимодулин. Детально освещены проблемы экспрессии

соответствующих генов в различных клетках млекопитающих. После прочтения обзора литературы становится ясно, что получение в больших количествах рекомбинантных факторов свертывания крови и гетеродимерных гормонов задача сложная и нетривиальная. Для всех рекомбинантных белков стоит задача максимизации продукции, а также ее стабилизация. Достаточно часто, линии клеток, имеющих изначально высокую продуктивность, в ходе длительного культивирования ее теряют. В основном это явление можно связать с гетерохроматинизацией промоторов соответствующих генов. Как становится ясным из обзора литературы, от такого «подавления» в первую голову страдают вирусные промоторы. Тут читателю становится ясным, что автор склонен будет отказаться от вирусных промоторов в пользу сильных промоторов генов «домашнего хозяйства». Также в обзоре литературы описывается и другой, дополнительный, способ максимизации продукции - отбор клеток с амплифицированной встроенной в геном экспрессионной кассетой при культивации клеток в среде с метотрексатом, ингибитором продукта маркерного гена дигидрофолат редуктазы. Рассмотрены и другие варианты пар маркер/ингибитор. Для гетеродимерных белков, таких, как фолликулстимулирующий гормон и лютеинизирующий гормон, актуальной задачей является также и поддержание правильного стехиометрического соотношения субъединиц. Рассмотрены различные подходы к этому процессу, например, использование полицистронных конструкций, в которых рамки считывания соединены через участки внутренней посадки рибосом. Наиболее сложной задачей является экспрессия генов факторов свертывания крови, продукты которых должны пройти нетривиальный путь пост-трансляционной модификации. Кроме протеолитического процессинга пробелка и гликозилирования, факторы свертывания крови VII и IX содержат остатки карбоксиглютаминовой кислоты (Gla), образующиеся при витамин К зависимом карбоксилировании. Не во всех типах клеток уровень экспрессии систем созревания достаточен. Отдельным трюком для увеличения продукции биологически активных факторов свертывания крови с Gla доменами является коэкспрессия фурина, протезы, отщепляющей пропептид и компонентов витамин К оксидоредуктазного комплекса. Обзор литературы весьма информативен и совершенно достаточен для того, чтобы погрузить даже неподготовленного читателя в проблематику получения вышеуказанных рекомбинантных белков.

Материалы и методы исследования описаны чрезвычайно подробно. Читателю, по прочтении данного раздела представляется полная возможность воспроизвести все эксперименты, при возникновении у него соответствующего желания или потребности. Мне кажется, что некоторые главы могли бы стать основой методических пособий для сотрудников других лабораторий. Удивителен широчайший спектр методических приемов, используемых в работе. Хотя основа самой работы генная инженерия и получение рекомбинантных белков, автору диссертации, Ивану Ивановичу Воробьеву, потребовалось применять множество методов для тестирования полученных препаратов. Также подробно описана методика получения моноклональных антител,

которую можно применять в других лабораториях. Особенно хочется отметить проведение в рамках диссертационной работы доклинических и даже клинических испытаний полученных препаратов. Это особенное достижение и большая редкость.

Результаты исследования — это конечно же, самый главный раздел, и посвящен он тому, что сделал Иван Иванович Воробьев в рамках своей диссертационной работы. Результаты разделены на главы таким образом, чтобы последовательно рассмотреть создание систем экспрессии и очистки нескольких важнейших для медицины рекомбинатных белков. Позволю себе не проводить перечисление разделов, а остановиться на наиболее интересных и значимых местах. Во-первых, при получении практически всех описываемых белков используется метод встраивания и последующей амплификации генетической кассеты в геноме клеток. Для повышения эффективности встраивания в кассету были внедрены конкатемеры длинного концевого повтора вируса Эпштейна-Барр. Для отбора клеток с амплификацией встроенной кассеты использовалась селекция метотрексатом. Для этого в кассету был встроен ген дигидрофолат редуктазы. В работе достаточно много обсуждается проблема надежного сцепления генов DHFR и целевого. Для оптимизации сцепления используется бицистронный вектор, в котором рамки считывания разделены участком внутренней посадки рибосом вирусной природы. Также по мере возможности используется линия клеток, лишенная собственного гена DHFR, чтобы избежать его амплификации вместо трансгена. Курьёзно, но в случае гена фолликулстимулирующего гормона это соображение не сработало. Напротив, только линия клеток в природном геном DHFR дала приемлемый уровень экспрессии трансгена. Интересно, почему это так? В то время как применение бицистронной конструкции для сцепления DHFR и генов факторов свертывания крови вполне оправдалось, при использовании подобной конструкции для получения гетеродимерных гормонов не удалось сразу заставить клетки производить белковые цепи в стехиометрическом соотношении. Эта проблема, впрочем, была в дальнейшем успешно решена внедрением дополнительных копий гена бета-цепи ФСГ. В результате получена клеточная линия – рекордсмен, продуцирующая невиданное ранее количество ФСГ. Отрадно было узнать, что препарат на основе полученной линии успешно прошел доклинические и клинические испытания и находится на рассмотрении министерства здравоохранения. Это поистине триумфальный результат, когда практическое применение результатов диссертации не ограничивается туманными фразами про возможное далекое будущее, а уже осязаемо и реально готово внести свой вклад в высокотехнологичную отрасль промышленности. Также успешно были решены проблемы коэкспрессии генов фактора IX и белков его созревания, фурина и VKORC. При этом был оптимизирован выбор организма - источника последовательности VKORC. В данном случае, фермент человека уступил по своим характеристикам аналогичному ферменту хомячка.

После глав о получении рекомбинатных факторов свертывания крови и фолликул-стимулирующего и лютеинизирующего гормонов, идет описание весьма интересной работы по получению полисиалированных производных инсулина и оксинтомодулина. В данном случае конъюгация белков полисахаридными остатками проводилась химическим способом, преследуя цель создать препарат пролонгированного действия. Хотя эффективная доза конъюгированного оксинтомодулина многократно превышает дозу неконъюгированного, искомый эффект был достигнут – действие препарата действительно было пролонгированно до 8 часов. Повышение дозы, как было объяснено в тексте диссертации, не должно существенно сказаться на цене препарата, а вот продолжительность действия действительно, приведет к существенному снижению нагрузки на систему здравоохранения.

В последней части работы описано исследование механизма взаимодействия каталитических антител с фосфоорганическими субстратами. Мне представляется, что эта часть, несмотря на свою самостоятельную ценность, лежит несколько в стороне от основной идеи диссертации.

Исходя из вышеизложенного анализа я уверен, что все вынесенные на защиту положения и выводы обоснованы полученными автором экспериментальными данными. Основные выводы, сформулированные в диссертации, также являются достоверными, большая часть полученных автором результатов обладает несомненной научной новизной. В ходе выполнения работы Воробьев Иван Иванович создал удачное семейство плазмидных векторов, которое сможет найти применение для экспрессии других фармацевтически значимых белков, а также и в фундаментальной науке для экспрессии изучаемых другими учеными генов без выраженной практической значимости.

Работа, проделанная Иваном Ивановичем Воробьевым, является важным научным исследованием, выполненным на высоком теоретическом и экспериментальном уровне. Особенно впечатляет то, что научную разработку удалось достаточно быстро довести до лекарственного препарата, стоящего на пороге клинического применения. О практической значимости работы свидетельствуют и полученные автором патенты.

Как и во всякой большой и интересной работе в диссертационной работе Воробьева Ивана Ивановича можно изыскать некоторые малозначительные недостатки.

На странице 23 утверждается, что «векторная плазида... была описана в работе Бегущего Оленя и Аллисона [10]». В научной литературе не принято переводить фамилии авторов, тем более, что Бегущий Олень, судя по имени Дженнифер, женщина. Тактично ли тут называть ее «бегущей оленихой»? Не думаю.

На странице 37 дается ссылка на рисунок 1, на котором, как следует из контекста, должна быть представлена схема каскада свертывания крови. На самом деле, на рисунке 1 представлена диаграмма об использовании различных систем экспрессии. Кстати, схема каскада свертывания крови действительно была бы совсем не лишней в диссертационной работе.

Зачастую, автоматическое исправление опечаток может привести к неверному написанию. Например, на странице 43 вместо «удаление силовых остатков», наверное, следовало бы написать «удаление сиаловых остатков».

На рисунке 24 (страница 159) не очень понятно, что изображено на панели Б. По-видимому, содержание не соответствует подписи. Кстати, интересно, почему клон клеток с наибольшей экспрессией не обладает наибольшей копийностью кассеты и наоборот. Было бы хорошо понять природу этого явления. Также было бы интересно узнать, какова причина повышенной экспрессии гена шаперона VIP в самом удачном клоне. Является это причиной или следствием высокой экспрессии гена aVIII? Ведь это не праздное наблюдение – понимание причины может помочь в создании других систем высокоэффективной экспрессии.

Страница 171 содержит повышенную частоту опечаток и неудачных выражений. Во-первых, это ссылка на рисунок без номера. Во-вторых, сразу два примера не совсем правильного использования термина «гомология». Гомология - это общность происхождения от общего предка. «Уровень гомологии» хорошо бы заменить на уровень сходства. Тем более не имеет смысла выражение «...при помощи праймеров, гомологичных началу и концу...». Наверное, лучше было бы написать «комплементарных».

Также мне не совсем понятно в каком смысле на странице 172 написано про «*оверэкспрессию патологического* гена *vkorc1*»?

В целом, в работе довольно часто внимание исследователя сконцентрировано на практической задаче – получению продуцента. Это вполне понятно. Тем не менее, если бы удалось понять причины, почему та или иная линия оказалась более удачной для экспрессии, эти знания можно было бы применить по отношению к другим белкам. Например, почему для экспрессии гена ФСГ не подошла линия с инактивированным геном DHFR, в то время как для получения факторов свертывания крови эта линия оказалась оптимальной?

Следует отметить, что сделанные замечания не относятся к основному содержанию работы и не влияют на ее высокую оценку.

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».

Официальный оппонент:

доктор химических наук,
профессор кафедры химии природных соединений
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (химический факультет МГУ)

СЕРГИЕВ Петр Владимирович

Контактные данные:

тел.: 7(495)9395418, e-mail: petya@genebee.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

02.00.10 – биорганическая химия

И.о. декана химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, д.х.н, чл-корр. РАН

Калмыков Степан Николаевич



Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, строение 3, ГСН Г МГУ, химический факультет
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (химический факультет МГУ)

тел.: 7(495)9395418, e-mail: petya@genebee.msu.ru