



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ им. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

ул. Вавилова д. 26, Москва, 119334
Тел.: (499) 135-33-22. Факс (499)135-80-12. E-mail: info@idbras.ru
ОКПО: 02699062 ОГРН 1027700450800 ИНН/КПП 7736044850/773601001
<http://idbras.ru>

02.10.2019 № 12.506-05/407
На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Директор Института биологии
развития им. Н.К. Кольцова РАН
член-корреспондент РАН, д.б.н.

А.В. Васильев

2 октября 2019



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу 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 (биологические науки)

Актуальность темы исследования

Исследования систем регуляции экспрессии генов, а также систем биосинтеза и пост-трансляционных модификаций белков являются одними из основных проблем современной биохимии. Изучение данных регуляторных систем имеет как фундаментальное, так и практическое значение для разработки новых подходов к экспрессии генов в гетерологичных системах и получению больших количеств рекомбинантных белков, обладающих требуемыми посттрансляционными модификациями.

В настоящий момент гетерологичные системы экспрессии генов используются для получения большинства белков, используемых в терапевтических целях, при этом все более значительная часть таких рекомбинантных белков создается *de novo* и не имеет природного прототипа. Вследствие этого, создание и разработка новых белков для биофармацевтического применения более эффективна в тех случаях, когда

применяемые в лабораторной практике системы гетерологической экспрессии генов этих белков могли бы без изменений применяться и при промышленном производстве. Другой типичной научной задачей для современной биофармацевтики можно считать получение линий клеток млекопитающих, секретирующих гликопротеины для использования в качестве воспроизведенных лекарственных средств. Для успешного решения задач по получению биоаналоговых лекарственных средств также необходимо использование гетерологических систем экспрессии генов, позволяющих создавать панели клональных линий-продуцентов с как можно более высоким уровнем секреции целевого белка.

Поскольку основным продуцентом гликопротеинов для медицинского применения в мире является линия клеток яичника китайского хомячка СНО и ее сублинии, в рассматриваемой диссертационной работе описаны новые векторные плазмиды и методы их применения, специфичные именно для клеток СНО. Для случаев негликозилированных природных полипептидов в работе предложены методы получения их полисиалированных производных и при помощи животных моделей продемонстрировано, что данные гликоконъюгаты обладают необходимой биологической активностью и существенно увеличенным временем действия по сравнению с немодифицированными полипептидами.

Современное состояние генетической инженерии позволяет создавать и применять для трансфекции культивируемых клеток векторные плазмиды или искусственные вирусные частицы, содержащие практически любые генетические элементы, влияющие на уровень транскрипции целевого гена, однако практическое применение таких векторов будет ограничено возможностями исследовательских групп по молекулярному клонированию, вследствие этого готовые векторные плазмиды, содержащие все необходимые генетические элементы для успешной гетерологической экспрессии генов различных целевых белков будет представлять для них большой интерес.

Главными характеристиками клеточных линий-продуцентов терапевтических белков являются их удельная продуктивность, постоянство продуктивности при непрерывном культивировании в течение двух-трех месяцев, а также корректность и однородность посттрансляционного процессинга целевого белка. Развитие современной

биохимии постоянно изменяет наши представления об адекватном дизайне регуляторных последовательностей, обеспечивающих корректное функционирование клеток-продуцентов. На сегодняшний день представляется целесообразным введение экспрессионные векторы, использующиеся для получения стабильных линий, дополнительных регуляторных участков ДНК, не участвующих непосредственно в транскрипции, а препятствующих гетерохроматинизации возникающей геномной вставки. Использование промоторов, минимально чувствительных к инактивации метилированием меняет популярное ранее представление о целесообразности использования сильных вирусных промоторов для обеспечения достаточного уровня экспрессии целевого гена при инсерции в геном продуцента небольшого числа копий генетической кассеты.

Выбранные автором целевые нагрузки генетических кассет – открытые рамки считывания нескольких негомологичных друг другу факторов свертывания крови и двух гонадотропных гормонов представляют большой интерес для современной биофармацевтики. Демонстрация получения высокопродуктивных клональных линий клеток, секретирующих данные белки, позволяет считать созданные плазмидные векторы и методы их использования достаточно универсальными и применимыми для решения широкого круга задач получения продуцентов инновационных и воспроизведенных лекарственных средств биотехнологического происхождения. Таким образом, тема работы И.И. Воробьева «Методы функциональной экспрессии генов, кодирующих фармацевтически значимые гликопротеины» представляется актуальной и имеющей как фундаментальное, так и прикладное значение.

Структура диссертации

Диссертационная работа построена по традиционной схеме. Она изложена на 264 страницах, содержит 59 рисунков и 31 таблицу, состоит из введения, обзора литературы, глав: «Материалы и методы», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов», заключения, списка литературы, включающего 305 источников и списка сокращений.

Изложение литературных данных и результатов исследований структурировано, подразделы отражают порядок проведения исследований и логически связаны друг с другом.

В работе поставлены 8 основных задач, по которым сформулировано 8 положений, выносимых на защиту, полностью отражающих эти задачи.

По результатам исследований сформулировано 7 выводов. Они полностью правомерны, соответствуют цели и задачам исследования, подтверждаются его результатами и являются научно обоснованными и практически значимыми.

Диссертация образует законченную работу, обозначенные во введении научная проблема и экспериментальные научные задачи решены в результате описанных в работе исследований. Автореферат диссертационной работы, опубликованные автором статьи и выданные патенты РФ в достаточной мере отражают содержание диссертации.

Содержание диссертации

Во введении приведено обоснование темы диссертации, актуальность и практическая значимость исследования. Обзор литературы структурирован и разбит на подглавы. Он содержит описание существующего научного уровня в области методов получения клеточных линий-продуцентов с высокой удельной продуктивностью, развернутые описания фармацевтически значимых гликопротеинов, на примере которых проводились исследования в данной работе – факторов свертывания крови VII, VIII, IX, фолликулостимулирующего гормона человека (ФСГ) и лютеинизирующего гормона человека (ЛГ). В отдельные подглавы также вынесены описания принципов получения гликоконъюгатов полипептидов с полисиаловой кислотой, описания свойств пролонгированных форм инсулина и оксинтомодулина человека. При рассмотрении свойств природных гликопротеинов особое внимание уделено описанию известных научных проблем эффективной гетерологической экспрессии их генов. Также в обзоре литературы перечислены современные подходы к дизайну генетических элементов для создания стабильных линий-продуцентов с большим числом транскрипционно активных копий целевого гена в геноме. Предпосылки для проведения экспериментальных исследований, проведенных автором, достаточно полно отражены в литературном обзоре рассматриваемой работы.

Глава «Материалы и методы» содержит описание полного арсенала методов, использованных для создания соответствующих векторных и целевых плазмид, получения клеточных линий-продуцентов, их характеристике и отбору, выделению,

очистке и анализу секретируемых белковых продуктов. Представленные описания методов работы изложены достаточно подробно для воспроизведения приведенных в главе «Результаты исследования».

Глава «Результаты исследования» разделена на девять частей, в первых семи из которых последовательно описаны результаты исследования систем гетерологической экспрессии генов в культивируемых клетках млекопитающих, а в последних двух разделах – результаты исследования искусственных гликопротеинов и каталитических антител, реагирующих с фосфоорганическими субстратами.

Первый раздел описывает попытку получения воспроизведенного лекарственного препарата активированного фактора свертывания крови VII человека (фVIIa) при помощи плазмидного вектора с коровой областью промотора гена фактора элонгации трансляции 1a человека (EF1) и селекционным маркером устойчивости к действию антибиотика зеоцин. Были получены линии-продуценты фVII с удельной продуктивностью, не уступающей удельной продуктивности, достигаемой для данного белка при использовании стандартных векторных плазмид с немедленным ранним промотором цитомегаловируса (CMV). Одновременно с этим было обнаружено, что изменение условий культивирования приводит к быстрому многократному падению удельной продуктивности полученных клональных линий-продуцентов.

Во втором разделе приведено исследование системы гетерологической экспрессии гена фактора свертывания крови VIII человека (фVIII), реализованной как стандартная плазида с промотором CMV, вариантами OPC гена фVIII и маркером устойчивости к действию метотрексата дигидрофолатредуктазой (DHFR). Было установлено, что данный маркер устойчивости в сочетании с промотором CMV позволяет многократно увеличивать уровень экспрессии гена фVIII в геноме клеток-продуцентов при постепенном повышении концентрации метотрексата, однако достигаемые уровни экспрессии гена целевого белка были все еще недостаточными для экономически обоснованного промышленного производства рекомбинантного фVIII. Вследствие этого, было предложено создание нового плазмидного вектора, лишённого недостатков существующих экспрессионных векторов.

Следующий раздел посвящен разработке системы экспрессии на основе

конститутивного аутологичного для клеток линии СНО промотора фактора элонгации трансляции 1a китайского хомячка (EEF1A1) и элементов, обеспечивающих транскрипционную активность кассеты в геноме – протяженных фрагментов ДНК, фланкирующих данный ген в геноме СНО с обеих сторон. При разработке экспрессионного вектора были предприняты шаги для уменьшения размера генетической кассеты и для увеличения вероятности ее интеграции в геном и частоты амплификации. Было предположено, что решению последней задачи способствует введение в вектор конкатемера терминальных повторов вируса Эпштейна-Барр. Функциональные свойства этих фрагментов вируса Эпштейна-Барр показаны путем сравнения вариантов вектора при экспрессии модельного белка – eGFP. Поскольку созданный плазмидный вектор обладал высокой скоростью амплификации и позволял сохранять стабильным уровень экспрессии целевого гена при продолжительном культивировании, был сделан вывод о возможности использования данной комбинации функциональных элементов для получения делеционного варианта фVIII в клетках СНО с высокой продуктивностью.

В четвертом разделе описаны получение и характеристика линий клеток СНО, продуцирующих делеционный вариант фVIII с использованием созданного вектора p1.1. После четырехстадийной амплификации введенного трансгена в геноме клеток под действием метотрексата получена стабильная клональная линия-продуцент фVIII, секретирующая целевой белок в конечной концентрации 39 МЕ/мл. После деблокирования транскрипционного сайленсера, находящегося внутри ОРС фVIII, при помощи бутирата натрия и подавления окислительного стресса клеток-продуцентов при помощи бутилгидроксианизола титр продукта был увеличен до 100 МЕ/мл. Таким образом, продемонстрировано увеличение удельной продуктивности клеток практически на два порядка по сравнению с рассмотренными в первом разделе работы линиями, полученными с использованием стандартного вектора с промотором CMV. Созданная система экспрессии помогла преодолеть специфические ограничения, обуславливающие низкий уровень типичных продуцентов фVIII. Характеристика уровня экспрессии генов клеток-продуцентов, отвечающих за синтез белка и его процессинг для трех клональных продуцентов с максимальным уровнем продуктивности не выявила среди них тех шаперонов или ферментов пост-трансляционной модификации, которые

лимитировали бы уровень биосинтеза фVIII в данных клетках. Автором был сделан вывод, что в случае фVIII для увеличения уровня экспрессии достаточно увеличить содержание в клетке его мРНК, то есть обеспечить большую копияность и транскрипционную активность введенного в геном трансгена. Для секретируемого клетками линии 11A4H фVIII была разработана пятистадийная методика очистки и продемонстрировано, что продукт с надлежащей удельной прокоагуляционной активностью может быть получен с общим выходом более 20%. Разработанный процесс получения рекомбинантного фVIII для медицинского применения потенциально пригоден для практического использования.

В пятом разделе на примере фактора свертывания крови IX человека продемонстрировано, что разработанные векторные плазмиды семейства p1.1 могут быть применены для создания клеточных линий, экспрессирующих целевой ген и два вспомогательных гена. В качестве таких вспомогательных генов были использованы растворимый вариант фурина человека и эндогенный для китайского хомячка кофактор 1 витамин-К-оксиредуктазы (VKORC1). Второй вспомогательный ген был применен впервые. Было установлено, что оверэкспрессия VKORC1 китайского хомячка в клетках CHO действительно позволяет вести секрецию фIX с полной прокоагуляционной активностью, т.е. с достаточным уровнем гамма-карбоксилирования остатков Glu в Gla-домене белка. Были получены клональные линии клеток, обеспечивающие конечный титр целевого белка в бессывороточной культуральной среде на уровне 6 МЕ/мл, что несколько превосходит известные мировые аналоги. Для получаемого рекомбинантного фIX был разработан процесс очистки продукта до фармакопейных показателей удельной активности при общем выходе продукта более 25 %, что также позволяет считать созданную систему экспрессии фIX применимой для промышленного производства.

В следующем разделе пара векторных плазмид p1.1 и p1.2-Нугро была применена для проведения координированной ко-экспрессии двух неродственных друг другу генов, образующих гетеродимерный белок – фолликулостимулирующий гормон человека (ФСГ). Было продемонстрировано, что секреция ФСГ стабильно трансфицированными клетками линии CHO S возможна при последовательном соединении гена альфа-цепи ФСГ, внутреннего сайта связывания рибосом вируса энцефаломиокардита (EMCV IRES), бета-цепи ФСГ второго EMCV IRES и OPC дигидрофолатредуктазы в одну

трицистронную матрицу, но не при соединении элементов в порядке бета-цепь – IRES – альфа-цепь – IRES – дигидрофолатредуктаза. Также было установлено, что введение в геном стабильно трансфицированных клеток дополнительной плазмиды, кодирующей только ген бета-цепи ФСГ, позволяет отобрать клональные линии-продуценты, секретирующие преимущественно гетеродимерный целевой белок и небольшие количества свободной альфа-цепи. Полученные линии-продуценты обладали высокой удельной продуктивностью – до 12 пг/клетка/день, вследствие этого титр ФСГ в простой периодической культуре достигал 40 мг/л. Был разработан промышленно применимый процесс получения субстанции ФСГ для доклинических и клинических исследований и продемонстрировано, что биоаналоговый препарат ФСГ безопасен и взаимозаменяем с оригинальным лекарственным средством на основе рекомбинантного ФСГ человека.

В седьмом разделе рассмотрен другой подход к получению клеточных линий-продуцентов гетеродимерных белков – одновременная трансфекция пары плазмид с взаимно совместимыми селекционными маркерами, каждая из которых кодирует одну из цепей целевого белка, и их последующая ко-амплификация в геноме клеток. Несмотря на то, что на примерах флуоресцентных модельных белков и практическом примере – лютеинизирующем гормоне человека была зафиксирована ко-амплификация обоих целевых генов и возрастание уровня их экспрессии, получаемые продуценты лютеинизирующего гормона обладали значительно меньшей удельной продуктивностью, чем продуценты ФСГ. Автором работы сделан вывод о том, что для плазмидных векторов семейства p1.1 использование полицистронных матриц является предпочтительным методом при получении продуцентов гетеромультимерных белков. Данный вывод в целом соответствует современной мировой практике в области получения продуцентов гуманизированных антител с высокой удельной продуктивностью.

В предпоследнем разделе описаны впервые разработанные методы получения чистых гликоконъюгатов полипептидов с полисиаловой кислотой. На примере двух полипептидных гормонов (инсулина и окситоцидина человека) обнаружено, что в обоих случаях гормоны частично сохраняют биологическую активность, могут применяться в тестах *in vivo* в высоких дозах без проявления токсических эффектов и

демонстрируют многократное увеличение времени действия. Конъюгат оксинтомодулина и полисиаловой кислоты получен и охарактеризован впервые. Разработанные в работе методы получения искусственных гликопротеидов могут быть применены к широкому спектру негликозилированных полипептидов и белков для получения перспективных лекарственных средств пролонгированного действия.

В последнем разделе главы описано исследование кинетики химического взаимодействия каталитических антител с фосфоорганическими антигенами (субстратами). При помощи точечного мутагенеза продемонстрировано, что механизм их химической реакции с субстратами может быть описан как индуцированное взаимодействие.

Все экспериментальные результаты диссертационной работы получены с применением известных, надежных и эффективных экспериментальных методов. Выводы, сформулированные в диссертации, логично вытекают из результатов проведенных исследований и представляются в полной мере обоснованными.

Достоверность полученных результатов обусловлена квалифицированным применением современных методов, тщательностью проведения экспериментов, использованием достаточно больших выборок и корректной математической обработкой результатов. Результаты диссертационного исследования опубликованы в рецензируемых российских и международных журналах.

По результатам диссертации получено десять патентов РФ, что отражает оригинальность и новизну полученных данных, а также их практическую значимость.

Выводы диссертационной работы соответствуют полученными автором экспериментальным данным.

Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов

Описанные в работе материальные объекты, а именно специализированные плазмидные векторы, различные моноклональные антитела и линии-продуценты нескольких фармацевтически значимых гликопротеинов различных классов, представляют большой практический интерес для биофармацевтики.

Практическая значимость работы

Описанная в работе линия-продуцент уже применена отечественной фармацевтической промышленностью при производстве воспроизведенного лекарственного средства, успешно прошедшего полный цикл клинических исследований. Полученные автором данные об уровне экспрессии ферментов и шаперонов линий клеток-хозяев, секретирующих большие количества фVIII, представляют несомненный интерес для исследователей систем мембранного внутриклеточного транспорта.

Описанные в работе разработанные возглавляемой автором научной группой специализированные плазмиды могут быть использованы для создания систем экспрессии различных фармацевтически значимых белков, в том числе гуманизированных антител, гетеродимерных полипептидных гормонов и белков системы гемостаза.

Апробация диссертации

Основные научные результаты диссертационной работы Воробьева И.И. «Методы функциональной экспрессии генов, кодирующих фармацевтически значимые гликопротеины» в течение последних десяти лет были представлены на 19 научных форумах: IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (г. Новосибирск, 11 – 15 мая 2008 г.); Научно-практической конференции «Достижения в гематологии и трансфузиологии» (Москва, 17-18 ноября 2008 г.); III Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика» (Пушино, 10-15 октября 2010 г.); школе-конференции «Методы культивирования клеток» (Санкт-Петербург 6-10 октября 2008 г.); I Российском симпозиуме с международным участием «Биофарма-2009» (Турция, Анталия, 25-27 мая 2009 г.); Международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 20-22 марта 2012 г.); 38-м Конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (FEBS) «Биологические механизмы» (Санкт-Петербург, 6-11 июля 2013 г.); V и VIII Московском международном конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 16-20 марта 2009 г. и 17-20 марта 2015 г.); V Съезде физиологов СНГ и V Съезде биохимиков России (Дагомыс, 4-9 октября 2016 г.); XXVII международной конференции Российской Ассоциации Репродукции Человека

«Репродуктивные технологии сегодня и завтра» (Санкт-Петербург, 6—9 сентября 2017 г.); на 16-ой, 19-ой, 20-ой, 23-ей Международных Пущинских школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 16-21 апреля 2012 г., 20-24 апреля 2015 г., 18-22 апреля 2016 г., 15 – 19 апреля 2019 г.); на XXVI, XXVIII, XXIX, XXXI Зимних молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 10-14 февраля 2014 г., 08-11 февраля 2016 г., 07-11 февраля 2017 г., 11-14 февраля 2019 г.).

Замечания по работе

Диссертация написана хорошим литературным языком, практически не содержит опечаток и ошибок. Единственное замечание может быть сделано по использованию автором не отличающихся научной строгостью выражений подобных «существенно повышенная вероятность» или «исключительно высокая удельная продуктивность». Это не снижает высокую оценку научного уровня и ценности выполненной диссертантом работы.

Заключение

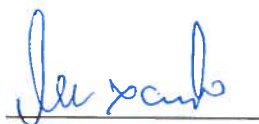
Диссертационная работа Воробьева И.И. «Методы функциональной экспрессии генов, кодирующих фармацевтически значимые гликопротеины» является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований изложены новые научно обоснованные технологические решения, внедрение которых вносит значительный вклад в развитие биофармацевтического производства в Российской Федерации. В данной работе представлены решения проблемы создания высокопродуктивных и стабильных линий-продуцентов рекомбинантных белков различных типов на основе культивируемых клеток млекопитающих.

Таким образом, диссертация Воробьева Ивана Ивановича на тему «Методы функциональной экспрессии генов, кодирующих фармацевтически значимые гликопротеины», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия, является завершенной научно-квалификационной работой, заслуживает высокой оценки, полностью соответствует п. 9

«Положения о порядке присуждения ученых степеней», а автор диссертации Воробьев Иван Иванович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 - Биохимия.

Отзыв обсужден и одобрен на объединённом семинаре пяти биохимических и физиологических лабораторий: биохимии процессов онтогенеза, физиологии рецепторов и сигнальных систем, нервных и нейроэндокринных регуляций, нейробиологии развития, сравнительной физиологии развития Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН от 4 сентября 2019 г. (протокол заседания №3).

Профессор, доктор биологических наук Михайлов В.С.



Сведения о составителе отзыва:

Михайлов В.С., доктор биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биохимии процессов онтогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова 26

Телефон: 8(499)135-88-47

Электронная почта: mikhailov48@mail.ru

Подпись Михайлова В.С. удостоверяю

Ученый секретарь ИБР РАН,

кандидат биологических наук, доцент

Хабарова Марина Юрьевна



/ Хабарова М.Ю./

Дата: 1 октября 2019 года