

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

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, решение которой 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 секреция различных фармацевтически значимых белков лимитирована разными факторами – количеством и стабильностью мРНК, одной или несколькими пост-трансляционными модификациями, скоростью деградации белкового продукта. Для многих белков скорость-определяющая стадия биосинтеза не установлена. Современный уровень развития генетической инженерии позволяет реализовать практически любой дизайн набора генетических элементов и вводить их в геном культивируемых клеток в виде большого числа копий, а также изменять как транскрипционную активность полученных искусственных генов, так и стабильность генома клетки в целом.

Важнейшими характеристиками клеточных линий-продуцентов терапевтических белков являются их удельная продуктивность, постоянство продуктивности при непрерывном культивировании, а также корректность и полнота пост-трансляционного процессинга целевого белка. 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 инаktivации метилированием, пришло на смену представлению 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 специализированных генетических конструкций для таких линий имеет как прикладное значение для разработки оригинальных и воспроизведенных лекарственных средств, так и фундаментальное значение для изучения функционирования генома и экспрессии генов млекопитающих. Разработанные диссертантом методические подходы были применены для создания промышленных технологий получения ряда факторов свертывания крови, а также 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.

Важной задачей современной биохимии также является создание искусственных гликопротеинов, заменяющих в медицинской практике природные негликозилированные или слабо гликозилированные полипептиды. В представленной работе исследовано получение конъюгатов инсулина и полипептидного гормона окситомодулина, родственного глюкагону, с полисиаловой кислотой. 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.

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 хорошем научном уровне, в нем проанализирован достаточный объем публикаций, посвященных биосинтезу, структуре и функциям факторов свертывания крови, а также гетеродимерных гормонов ЛГ и ФСГ. Даны развернутые характеристики известных продуцентов этих белков. Также в обзоре рассмотрены известные способы получения пролонгированных форм инсулина, окситомодулина и родственных ему гормонов.

Раздел «Материалы и методы» позволяет полностью проследить 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 этапам исследования.

1) Были созданы линии клеток-продуцентов фактора VII в клетках линии ВНК-21 при помощи коммерчески доступной векторной плазмиды с промотором фактора элонгации трансляции 1а человека.

2) Стандартная экспрессионная система была использована в клетках СНО 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 этому фактору.

3) Проведен дизайн генетических элементов для оригинальной системы экспрессии p.1.1 в клетках СНО, которая позволяет эффективно экспрессировать гены целевых белков. Функциональные элементы конструкции использованы также для получения целого семейства векторов серии p1.2 с различными совместимыми друг с другом селекционными маркерами.

4) Получены и охарактеризованы линии-продуценты фактора VIII с делецией В-домена на основе векторной плазмиды p1.1, исследовано влияние условий культивирования на продуктивность клеток. С использованием коммерчески доступного аффинного сорбента проведена очистка белка фармацевтического качества, с помощью компьютерного моделирования осуществлен поиск перспективного синтетического лиганда для очистки белка из среды. Полученные результаты демонстрируют, что уровень секреции нестабильных гликопротеинов большого размера может быть многократно увеличен при использовании специализированного плазмидного вектора и многоступенчатой амплификации генетических кассет в геноме продуцентов.

5) 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, несущих гены целевого белка и вспомогательные гены, 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.

6) На примере ФСГ человека описана ко-экспрессия пары генов, кодирующих гетеродимерный гликопротеин, при помощи трицистронного вектора, в котором открытые рамки считывания двух субъединиц гетеродимерного целевого белка соединены при

помощи внутреннего сайта связывания рибосом. Такой подход позволил получить линию-продуцент гликопротеина с исключительно высокой удельной продуктивностью и способностью секретировать преимущественно гетеродимерный целевой белок. Получены и охарактеризованы клональные линии-продуценты ФСГ, очищен и охарактеризован ФСГ, пригодный для клинического применения, создана фармацевтическая композиция прототипа лекарственного средства ФСГ, проведены доклинические исследования субстанции и клиническое исследование лекарственного препарата ФСГ.

7) Получен лютеинизирующий гормон 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. Таким образом, 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.

8) Рассмотрен принципиально другой способ получения гликопротеинов – метод химической конъюгации с полисиаловой кислотой. При помощи этого метода получены чистые препараты гликоконъюгатов инсулина и окситомодулина, обладающие пролонгированной биологической активностью на животных моделях.

9) В гетерологической системе получены гетеродимерные белки другого класса – моноклональные антитела, рассмотрен механизм взаимодействия каталитических антител с фосфоорганическими субстратами. Установлено, что каталитические антитела А5 и А17 образуют с фосфоорганическим веществом фосфонат X ковалентное соединение.

В разделах «Обсуждение результатов» и «Заключение» обобщаются данные, рассмотренные в разделе «Результаты». Все вынесенные на защиту положения и выводы обоснованы полученными автором экспериментальными данными.

Литературный обзор диссертации включает большинство ключевых 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.

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.

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.

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.

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 высказаны несколько замечаний:

1. В работе остался не исследованным возможный механизм влияния участка EBV-TR на интеграцию генетических кассет в геном клеток-продуцентов. Можно предположить, что увеличение частоты интеграции кассет примерно в 30 раз должно соответствовать какому-то направленному процессу рекомбинации ДНК.

2. При исследовании процесса ко-амплификации пары плазмид с селекционными маркерами дигидрофолатредуктазы и глутаминсинтазы было установлено, что ожидаемое автором событие происходит примерно в 1 случае из 6 для клональных линий. Остается неясным, является ли такая низкая вероятность успешного прохождения ко-амплификации типичной для большинства плазмид или это особенность разработанных экспрессионных векторов.

3. Заключительная глава диссертации посвящена взаимодействию каталитических антител с фосфорорганическими субстратами. На основе сравнительного анализа кинетических параметров реакции Fab-фрагментов антител A5 и A17 с фосфонатом X сделан вывод о механизме индуцированного соответствия, который реализуется в ходе наблюдаемого двустадийного механизма для обоих типов антител. В то же время отмечаются существенные различия взаимодействия антитела 5 с фосфонатом на стадии нековалентного связывания субстрата. В целом, это описание выглядит фрагментарно и следовало бы более четко описать наблюдаемое сходство и различие в механизмах взаимодействия исследованных антител с фосфонатом X.

4. К сожалению, обзор литературы не содержит заключения, которое могло бы в концентрированном виде поставить акценты на необходимости проведения данной работы.

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

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 биоорганической химии ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук доктор химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия», профессор, член-корреспондент РАН



Лаврик Ольга Ивановна

630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8.

Тел. (383) 363-51-50

E-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Подпись Лаврик О.И. заверяю.

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, кандидат химических наук



Пестряков Павел Ефимович

«14» октября 2019 г.

М.П.