

ОТЗЫВ

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.

Специальность рецензента – 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, доктор биологических наук

В диссертации И.И. Воробьева рассмотрены подходы к получению линий клеток млекопитающих, секретирующие максимально возможные количества терапевтически значимых белков различных классов, при помощи специализированных плазмидных векторов, а также способы получения искусственных гликопротеинов методом химического синтеза.

Актуальность темы исследования.

Тема исследований автора вполне актуальна для современной биохимии и представляет большой практический интерес для биофармацевтики. Основным вопросом, рассмотренным в рецензируемой работе, является создание и применение таких специализированных векторных плазмид, которые могли бы максимизировать удельную продуктивность культивируемых клеток СНО при экспрессии ими генов белков различных классов, то есть в ситуациях с разными реакциями биосинтеза и пост-трансляционной модификации белков, лимитирующими скорость секреции целевых белков в культуральную среду.

Научная новизна исследования и полученных результатов.

Для случая фактора VIII свертывания крови было обнаружено, что эффективность использования некодирующих участков гена EEF1A1 для создания линий-продуцентов гликопротеинов может быть значительно увеличена при введении в состав векторной плазмиды фрагмента конкатемера длинного концевой повтора вируса Эпштейна-Барр (EBV-TR). Общая продуктивность полученных линий-продуцентов достигала 40 МЕ/мл культуры при простом периодическом культивировании, что существенно превосходило известные ранее показатели.

Для фактора IX свертывания крови было продемонстрировано, что векторные плазмиды, содержащие одинаковые некодирующие участки гена EEF1A1 и элемент EBV-TR, но различные селекционные маркеры, могут быть успешно интегрированы в геном клеток при последовательных раундах трансфекции и селекции. В клональных линиях-продуцентах фактора IX была успешно проведена ко-экспрессия двух вспомогательных генов – фурина человека и витамин-К-оксиредуктазы китайского хомячка, что позволило вести биосинтез практически полностью биологического активного фактора IX с конечной продуктивностью около 6 МЕ/мл культуры, что превосходит известный мировой уровень. Полученный при помощи созданной линии клеток препарат биоаналогового фактора IX успешно прошел доклинические испытания.

Также было продемонстрировано, что разработанные векторные плазмиды позволяют вести координированную экспрессию двух различных генов при их соединении в полицистронную матрицу при помощи внутреннего сайта связывания рибосом. На примере фолликулостимулирующего гормона человека (ФСГ) было показано, что проведение трансфекции дополнительной генетической конструкции, кодирующей только одну цепь ФСГ, в клетки, экспрессирующие гены ФСГ с трицистронной матрицы, можно получить клональные продуценты, секретирующие преимущественно гетеродимер ФСГ и только небольшие количества свободной альфа-цепи данного гликопротеина при конечной концентрации целевого белка около 80 мг/л культуры, что также значительно превосходит все ранее описанные системы биосинтеза ФСГ человека. Полученный при помощи созданной клональной линии-продуцента биоаналоговый ФСГ успешно прошел доклинические и клинические испытания в РФ (фаза I и фаза III) и на момент написания настоящего отзыва был зарегистрирован в РФ для клинического применения.

В работе впервые описывается получение конъюгата оксинтомодулина человека и полисиаловой кислоты, продемонстрировавшего пролонгированный анорексигенный эффект в опытах *in vivo*

Научная и практическая значимость.

Работа производит очень хорошее впечатление, в частности, тем, что ее результаты обладают как высокой степенью фундаментальности, так и практический потенциал. Результаты данной работы способствуют более глубокому пониманию процессов биосинтеза и секреции гликопротеинов различных классов гетерологичными клетками и принципов создания конъюгатов полипептидов с полисиаловой кислотой. Полученные результаты могут быть использованы для создания линий-продуцентов различных фармацевтически значимых белков, пролонгированных вариантов белков и полипептидов

Замечания по тексту автореферата.

Замечаний по тексту автореферата нет, однако возникла пара вопросов.

1. Во-первых, чем определялся выбор качества продуцентов клеток СНО и ВНК – все же это, хоть и псевдонормальные клетки млекопитающих, но не человеческие. Что известно относительно различий профилей гликозилирования в этих клетках по сравнению с клетками человека?
2. Во-вторых, с чем связан выбор монослойной культуры, а не суспензионной? Обычно считается, что суспензионные культуры легче вести и процесс наращивания массы гораздо эффективнее по сравнению с монослойными.

Публикации.

Содержание диссертационной работы представлено в 17 научных статьях, опубликованных в ведущих международных рецензируемых научных журналах, а также отечественных научных журналах, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований. Индекс Хирша автора диссертации составляет 9 по данным Scopus, общее число цитирований – 393. В автореферате также приведены 10 патентов РФ, выданных на изобретения, описанные в тексте диссертации.

В диссертационной работе И.И. Воробьева «Методы функциональной экспрессии генов, кодирующих фармацевтически значимые гликопротеины» изложены новые научно обоснованные технологические решения, внедрение которых в фармацевтическую промышленность внесет значительный вклад в развитие страны. По своему содержанию, уровню проведенных исследований, актуальности выбранной темы, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности полученных результатов, их научной и практической значимости диссертационная работа И.И. Воробьева 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».

Главный научный сотрудник
Федерального бюджетного учреждения науки
Институт цитологии Российской академии наук,
доктор биологических наук по специальности
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология,
профессор

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
Тел. 8 921 302 59 05

Елена Сергеевна Корнилова

10.10.2019

