

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ  
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА  
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ  
ДОКТОРА НАУК

Решение диссертационного совета от 7 ноября 2019 г. №24 о присуждении Воробьеву  
Ивану Ивановичу, гражданство Российская Федерация, ученой степени доктора  
биологических наук

Диссертация «Методы функциональной экспрессии генов, кодирующих  
фармацевтически значимые гликопротеины» по специальности 03.01.04 Биохимия  
принята к защите 2 августа 2019 г. (протокол № 21) диссертационным советом  
Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный  
исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской  
академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет  
утвержден Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602  
от 16.11.2007 г. с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом  
Минобрнауки России от 13.02.2013 г. № 74/нк и от 10.02.2014 г. №55/нк и с учетом  
переименования Совета от 30.09.2015 г. № 1166/нк и от 13.03.2019 г. №222/нк.

**Соискатель**

Воробьев Иван Иванович, 1973 г. рождения, в июне 1995 года окончил кафедру  
химии природных соединений химического факультета Федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования  
«Московский Государственный Университет им М.В. Ломоносова» по специальности  
«химия». С 1995 по 1997 г. обучался в аспирантуре химического факультета МГУ им.  
М.В. Ломоносова. С 1998 г. Воробьев И.И. занимал должность научного сотрудника в  
лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения  
науки «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А.  
Овчинникова Российской Академии наук», с 2012 г. по настоящее время – заведует  
лабораторией биоинженерии клеток млекопитающих Института Биоинженерии  
Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук». В 2006 г.

Воробьев И.И. защитил кандидатскую диссертацию на тему «Подходы к получению протеолитических антител» по специальности 03.00.04 Биохимия.

Диссертационную работу соискатель Воробьев И.И. выполнял в лаборатории биоинженерии клеток млекопитающих Института Биоинженерии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии наук» и в лаборатории биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии наук».

**Научный консультант:**

Скрябин Константин Георгиевич, доктор биологических наук, профессор, академик, научный руководитель Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», заведующий лабораторией системной биологии растений Института Биоинженерии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

**Официальные оппоненты:**

Лаврик Ольга Ивановна, доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, заведующая лабораторией биоорганической химии ферментов.

Георгиева Софья Георгиевна, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, заведующая лабораторией факторов транскрипции.

Сергиев Петр Владимирович, доктор химических наук, Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Кафедра химии природных соединений, отдел структуры и функций РНК, профессор.

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН Лаврик Ольга Ивановна является одним из ведущих отечественных специалистов в биохимических исследованиях белков, в частности в области биофармацевтики;

тем, что доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН

Георгиева Софья Георгиевна является крупным специалистом в области регуляции экспрессии генов, в том числе и в гетерологических системах.

тем, что доктор химических наук, профессор Сергиев Петр Владимирович также является крупным специалистом в области механизмов регуляции трансляции РНК, в том числе и в гетерологических системах.

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Все три официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Воробьева И.И.

#### **Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН в своем положительном отзыве, подписанном главным научным сотрудником лаборатории биохимии процессов онтогенеза, доктором биологических наук, профессором Михайловым В.С., указала, что диссертационная работа Воробьева И.И. является завершенной научно-квалификационной работой, заслуживает высокой оценки, полностью соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к докторским диссертациям, а ее автор Воробьев И.И. заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности - 03.01.04 Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен с тем, что ИБР является признанным отечественным центром исследований клеточных культур, в котором лаборатория биохимии процессов онтогенеза активно проводит изучение механизмов регуляции экспрессии генов (в процессе онтогенеза), а также располагает значительным опытом решения практических задач в области биохимии. Таким образом, сотрудники ИБР и, в частности, указанной лаборатории являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой диссертационной работы И.И. Воробьева.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

#### **Публикации.**

Основные результаты диссертационной работы Воробьева И.И. изложены в 16 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о

присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1. Мацкевич В.А., Орлова Н.А., Воробьев И.И., Юрьев А.С., Воробьев А.И.. Поиск низкомолекулярного лиганда для аффинной хроматографической очистки фактора свёртывания крови VIII человека молекулярным докинггом *in silico* // **Математическая биология и биоинформатика** 2011. том 6, № 1, с. 14-22
2. Orlova NA, Orlov AV, Vorobiev II. A modular assembly cloning technique (aided by the BIOF software tool) for seamless and error-free assembly of long DNA fragments. // **BMC Research Notes** 2012, 5:303.
3. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И., Юрьев А.С., Габибов А.Г., Воробьев А.И. Стабильная экспрессия рекомбинантного фактора свертывания крови VIII в клетках СНО с использованием амплификации трансгена, инициированной метотрексатом. // **Acta Naturae** (русскоязычная версия), 2012, том 4, № 1 (12), с. 96-104
4. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И., Габибов А.Г. Фактор свертывания крови IX для терапии гемофилии В.// **Acta Naturae** (русскоязычная версия), 2012, том 4, № 2 (13), с. 62-75
5. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Воробьев И.И., Габибов А.Г., Воробьев А.И. Фактор свертывания крови VIII – от эволюции к терапии. // **Acta Naturae** (русскоязычная версия), 2013, том 5, № 2 (17), с. 19-39
6. Vorobiev I, Matskevich V, Kovnir S, Orlova N, Knorre V, Jain S, Genkin D, Gabibov A, Miroshnikov A. Chemical polysialylation: Design of conjugated human oxyntomodulin with a prolonged anorexic effect *in vivo*.// **Biochimie**. 2013 Feb;95(2):264-70.
7. Orlova NA, Kovnir SV, Hodak JA, Vorobiev II, Gabibov AG, Skryabin KG. Improved elongation factor-1alpha-based vectors for stable high-level expression of heterologous proteins in Chinese hamster ovary cells.// **BMC Biotechnol**. 2014 Jun 14;14:56.
8. Smirnov IV, Vorobiev II, Belogurov AA, Genkin DD, Deyev SM, Gabibov AG. Chemical Polysialylation of Recombinant Human Proteins. **Methods Mol Biol**. 2015;1321:389-404.
9. И. И. Воробьев, С. В. Ковнир, Н.А. Орлова, Ю.А. Ходак, М. А. Ползиков. Составы растворов биологически активного рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека // **Разработка и регистрация лекарственных средств** Т.13, №4, стр.123-126.
10. Воробьев И.И., Головина Е. О., Семихин А. С. Производство нового биоаналогового фоллитропина альфа в России - это уже реальность в 2017 году // **Акушерство, гинекология и репродукция**, 2017, том 11, № 3, с. 116-126.

11. Orlova N. A., Kovnir S. V., Gabibov A. G. and Vorobiev, I.I. (2017). "Stable high-level expression of factor VIII in Chinese hamster ovary cells in improved elongation factor-1 alpha-based system." **ВМС Biotechnol** 17(1): 33.
12. Орлова Н.А., Ковнир С.В., Ходак Ю.А., Ползиков М.А., Воробьев И.И. Рекомбинантный лютеинизирующий гормон человека для терапии бесплодия: получение линий-продуцентов. // **Акушерство, гинекология и репродукция**. 2017. Т. 11(3). С. 33-42
13. Тюлькина Е.Е., Гордеев И.Г., Гребенкин Д.Ю., Казей В.А., Цикаришвили М.М., Лучинкина Е.Е., Абдулла Б.Х., Самандари С., Воробьев И.И., Шигабутдинов А.Ф., Ползиков М.А. Сравнительное рандомизированное перекрестное исследование переносимости и фармакокинетики препаратов Примапур и Гонал-ф при однократном подкожном введении здоровым добровольцам. // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. 2017, Т. 80(4), С. 13-17
14. С.В. Ковнир, Н.А. Орлова, Ю.А. Ходак, М.П. Кондрашова, А.Г. Габибов, К.Г. Скрыбин, А.И. Воробьев, И.И. Воробьев. Подходы к управляемой ко-амплификации генов для получения рекомбинантных белков терапевтического назначения: Исследование динамики инсерции и амплификации генетических кассет в геноме клеток яичника китайского хомячка при ко-экспрессии пары совместимых плазмид. **Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины**. 2017. Т.163 (2), С. 245-249.
15. Мокрушина Ю.А., Пипия С.О., Степанова А.В., Шамборант О.Г., Кнорре В.Д., Смирнов И.В., Габибов А.Г., Воробьев И.И. Особенности механизма взаимодействия каталитических антител с фосфоорганическими субстратами. **Молекулярная Биология**. 2017. Т. 51 (6), С. 830-839
16. Ковнир С.В., Орлова Н.А., Шахпаронов М.И., Скрыбин К.Г., Габибов А.Г., Воробьев И.И. Высокопродуктивная линия-продуцент фактора свертывания крови IX человека на основе клеток CHO. // **Acta Naturae (русскоязычная версия)**. 2018. том 10. № 1(36). с. 55-69

Результаты работы также были представлены на 7 международных и 15 российских конференциях (и опубликованы в материалах этих конференций) в частности:

Biocatalysis 2007: Fundamentals & Applications (Moscow - St. Petersburg, 17-22.06.2007 г.);  
 38th Federation of European Biochemical Societies Congress 2013 «Mechanisms in Biology» (6-11.07.2013, St Petersburg); V Московский Международный Конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 16-20.03.2009 г.); Московская

международная научно-практическая конференция «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 20-22.03.2012г); VIII Московский Международный Конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 17-20 марта 2015 г.); V Съезд биохимиков России (г. Дагомыс, Сочи, 04-8.10.2016 г.); XXVII международная конференции Российской Ассоциации Репродукции Человека (6—9 сентября 2017 г., Санкт-Петербург).

На технологии и продукты, описанные в диссертационной работе Воробьева И.И. выдано 10 патентов РФ.

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

**На диссертацию поступили следующие отзывы:**

Отзыв официального оппонента доктора химических наук, профессора, члена-корреспондента РАН Лаврик О.И. (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

- 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.
- 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.
- 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 A5 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.

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

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора, члена-корреспондента РАН Георгиевой С.Г. (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и 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.

Отзыв официального оппонента доктора химических наук, профессора Сергиева П.В. (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

- 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 геноме DHFR дала приемлемый уровень экспрессии трансгена. Интересно, почему это так?
- На странице 23 утверждается, что «векторная плаزمида... 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 ВІР 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?

Отзыв ведущей организации - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

- Единственное замечание может быть сделано по использованию автором не отличающихся научной строгостью выражений подобных «существенно повышенная вероятность» или «исключительно высокая удельная продуктивность».

**На автореферат поступили положительные отзывы:**

Научный руководитель Федерального государственного бюджетного учреждения науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии

наук, доктор биологических наук, профессор, член-корр. РАН Ф.И. Аттауллаханов, замечаний нет.

Заведующий сектором молекулярной вирусологии кафедры вирусологии Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, доктор биологических наук, профессор А.А. Аграновский, замечаний нет.

Заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, доктор химических наук, профессор, чл.-корр. РАН С.Н. Кочетков, замечаний нет.

Главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор Е.С. Корнилова, замечания:

1. Во-первых, чем определялся выбор в качестве 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.

Ведущий научный сотрудник кафедры молекулярной биологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, доктор биологических наук, профессор, Т.С. Калебина, замечания:

1. Некоторые данные, приведенные в таблицах и на рисунках не содержат указания на проведенную статистическую их обработку а в иллюстративном материале отсутствуют границы погрешности.

Старший научный сотрудник лаборатории №11 ФГУП «ГосНИИгенетика Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»», кандидат химических наук, В.А. Акпаров, замечаний нет.

#### **В дискуссии приняли участие:**

М.А. Ползиков, С.А. Еремин, Н.В. Бовин, В.А. Акпаров, А.Ф. Топунов, В.В. Кушников, В.В. Шумянцева, А.С. Капрельянц, В.П. Варламов, Н.В. Равин;

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты:**

- Установлено, что векторная плазида p1.1, включающая некодирующие

последовательности ДНК из области гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (EEF1A1) китайского хомячка и фрагмент конкатемера длинного концевого повтора вируса Эпштейна-Барр (EBV-TR) интегрируется в геном клеток CHO с существенно повышенной вероятностью и позволяет эффективно экспрессировать гены целевых белков.

- На примере линии клеток CHO, секретирующих 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.
- На примере линии-продуцента фактора свертывания крови IX продемонстрировано, что разработанные плазмидные векторы могут быть применены для последовательных трансфекций целевого гена и вспомогательных генов.
- 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.
- 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.
- При помощи метода химической конъюгации полисиаловой кислоты и полипептидов получены чистые препараты гликоконъюгатов инсулина и оксинтомодулина, обладающие пролонгированной биологической активностью на животных моделях.
- Каталитические антитела A5 и A17 образуют с фосфоорганическим веществом фосфонат X ковалентное соединение, при этом механизм реакции может быть описан как индуцированное соответствие.

**Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:**

В работе было впервые установлено, что существенное увеличение удельной продуктивности клеток по сравнению с существующим мировым уровнем может быть достигнуто путем создания оригинальных векторных плазмид на основе некодирующих участков гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (EEF1A1) китайского хомячка и фрагмента конкатемера длинного концевого повтора из вируса Эпштейна-Барр. Для

данного типа экспрессионного вектора было установлено, что он позволяет проводить многостадийную амплификацию генетических кассет в геноме клеток-продуцентов и получать высокопродуктивные клональные клеточные линии при анализе относительно небольшого (несколько сотен) числа клонов. Созданные векторные плазмиды позволяют получать высокопродуктивные клональные линии-продуценты как при трансфекции одной генетической конструкцией с двуцистронной или трицистронной матрицей, так и в ситуациях ко-трансфекций культивируемых клеток парами плазмид с различными селекционными маркерами и последовательных трансфекций нескольких плазмид.

Для случая клеточных линий-продуцентов фактора VIII свертывания крови было впервые установлено, что удельная продуктивность клеток более 10 мкг/клетка/день может быть достигнута простым увеличением уровня транскрипции целевого гена, при этом не наблюдается ни развития ЭР-стресса клеток, ни значимой адсорбции секретлируемого фактора VIII на мембраны клеток-продуцентов.

Для случая клеточных линий-продуцентов фактора IX свертывания крови было впервые установлено, что полный процессинг остатков Glu в составе Gla-домена фактора IX может быть обеспечен гиперэкспрессией аутологичного гена VKORC1 китайского хомячка.

Для случая клеточной линии-продуцента фолликулостимулирующего гормона человека было впервые продемонстрировано, что при удельной продуктивности клеток более 10 пг/клетка/день сохраняется корректный паттерн терминального сиалирования N-связанных олигосахаридов, что позволяет получать конечный продукт с высоким выходом.

Для полипептидных гормонов инсулин и окситоцидин были впервые разработаны такие способы их конъюгации с полисиаловой кислотой и последующей очистки продуктов, которые позволяют полностью удалить примеси неконъюгированных полипептидов, что необходимо для корректных исследований их биологической активности на животных моделях и проведения клинических исследований.

#### **Практическая значимость работы заключается в том, что:**

Для кандидатных линий-продуцентов нескольких медицински значимых гликопротеидов было продемонстрировано, что высокая удельная продуктивность клеток сохраняется практически постоянной в течение 2-3 месяцев последовательного культивирования, что позволяет использовать данные клеточные линии в промышленном производстве соответствующих биоаналоговых лекарственных средств. Для полученных в ходе выполнения работы линий-продуцентов факторов свертывания

крови VII и IX, а также фолликулостимулирующего гормона человека было проведено получение опытно-промышленных серий целевых белков, доклинические и клинические исследования, продемонстрировавшие безопасность и надлежащую биологическую активность продуктов. Созданные в ходе настоящей работы плазмидные векторы семейства p1.1 и исследованные методы их применения могут быть использованы для получения высокопродуктивных клеточных линий, секретирующих фармацевтически значимые белки.

Для конъюгата оксинтомодулина с полисиаловой кислотой было впервые продемонстрировано, что он, в отличие от интактного оксинтомодулина, сохраняет анорексигенную активность в течение нескольких часов после единственной инъекции на модели голодания мышей.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:**

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

**Личный вклад соискателя состоит:**

- в получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке публикаций по выполненной работе.

## Заключение

Диссертация Воробьева И.И. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием плана исследования, использованием большого набора современных методов, взаимосвязанностью выводов и результатов, а также публикациями в рецензируемых журналах (16 статей), выданными патентами РФ и фактом регистрации лекарственного средства Примапур Минздравом РФ (ЛП-005826 от 4.10.2019 и РЗН 2014/1791 от 22.07.2019), полученного при помощи описанной в работе клеточной линии-продуцента ФСГ. Таким образом, из представленных материалов следует, что данная работа выполнена на высоком методическом уровне, содержит решение научной задачи, имеющей важное значение для развития биохимии и биотехнологии, а также в данной диссертационной работе изложены новые научно обоснованные технологические решения, внедрение которых в фармацевтическую промышленность внесет значительный вклад в развитие страны.

На заседании 7 ноября 2019 г. диссертационный совет принял решение присудить Воробьеву Ивану Ивановичу ученую степень доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 22 человек, из них 13 докторов биологических наук, 8 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета Д 002.247.01:

«За» присуждение ученой степени - 22,

«Против» - нет,

Недействительных бюллетеней - нет.

Председатель диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

доктор химических наук, профессор, чл.-корр. РАН



В.О.Попов

Ученый секретарь диссертационного совета

ФИЦ Биотехнологии РАН

кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

«7» ноября 2019 г.