

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова Российской академии наук,
по диссертации на соискание ученой степени доктора наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 23 октября 2019 года № 15

О присуждении Есипову Роману Станиславовичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени доктора химических наук.

Диссертация «Методология биотехнологического получения рекомбинантных пептидов медицинского назначения» по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) принята к защите 17 июня 2019 г., протокол № 9 диссертационным советом Д 002.019.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, Российская Федерация, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г.

Соискатель Есипов Роман Станиславович, 1966 г. рождения. Диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология на тему: «Влияние структуры мРНК на уровень экспрессии генов в *E. coli*» защитил в 1999 году в диссертационном совете Д 002.35.01 на базе Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (диплом кандидата наук: Кт № 013815). Работает старшим научным сотрудником лаборатории биотехнологии ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный консультант: академик РАН, д.х.н., профессор **Мирошников Анатолий Иванович**, заведующий лабораторией биотехнологии ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Кочетков Сергей Николаевич, чл.-корр. РАН, д.х.н., профессор. Заведующий лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений ФГБУН Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН);

Костров Сергей Викторович, чл.-корр. РАН, д.х.н., профессор. Директор ФГБУН Института молекулярной генетики Российской академии наук (ИМГ РАН);

Лунин Владимир Глебович, д.б.н., заведующий лабораторией биологически активных наноструктур отдела генетики и молекулярной биологии бактерий ФГБУ

«Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ («НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»),

дали положительные отзывы на диссертацию

Ведущая организация ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» («НИЦ "Курчатовский институт" – ГосНИИГенетика»), г. Москва, в своем положительном заключении, составленном Дебабовым Владимиром Георгиевичем, академиком РАН, д.б.н., профессором, научным руководителем НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика», и утвержденным директором, д.б.н., профессором Александром Степановичем Яненко, указала, что по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне диссертация полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 № 335; 02.08.2016 № 748; от 29.05.2017 № 650), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Есипов Роман Станиславович заслуживает присуждения искомой степени доктора химических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Соискатель имеет 85 опубликованных работ, из них по теме диссертации опубликованы 22 научные работы объемом 20 печ. листов в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. Кроме того, соискатель является соавтором, а в подавляющем большинстве первым автором в 21 патенте РФ, 13 из которых получены по тематике диссертационной работы. Соискателем опубликовано по теме диссертации 34 доклада в материалах всероссийских и международных конференций и симпозиумов. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации, в которые автор внес основной либо существенный вклад:

1. **Esipov R.S.**, Makarov D.A., Stepanenko V.N., Kostromina M.A, Muravyova T.I, Andreev Y.A, Dyachenko I.A., Kozlov S.A., Grishin E.V. Pilot Production of the Recombinant Peptide Toxin of *Heteractis Crispa* as a Potential Analgesic by Intein-Mediated Technology. *Protein Expr. Purif.* 2018; 145: 71-76.

2. **Есипов Р.С.**, Степаненко В.Н., Зверева И.О., Макаров Д.А., Костромина М.А., Костромина Т.И., Муравьева Т.И., Мирошников А.И., Гришин Е.В. Биотехнологический способ получения рекомбинантного пептидного анальгетика – пуротоксина-1 из яда паука *Geolycosa sp.* *Биорг. химия.* 2018; 44(1): 38-46.

3. **Esipov R.S.**, Makarov D.A., Stepanenko V.N, Miroshnikov A.I. Development of the Intein-mediated method for production of recombinant Thymosin β 4 from the acetylated in vivo fusion protein. *Journal of Biotechnology.* 2016; 228: 73-81

4. **Esipov R.S.**, Kostromina M.A. Comparative Analysis of the Effectiveness of C-terminal Cleavage Intein-Based Constructs in Producing a Recombinant Analog of Anophelin,

an Anticoagulant from *Anopheles albimanus*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015; 175(5): 2468-2488.

5. **Esipov R.S.**, Stepanenko V.N., Chupova L.A., Miroshnikov A.I. Production of Recombinant Oxytocin through Sulfitolysis of Intein-containing Fusion Protein. *Protein&peptide letters*. 2012; 19 (5): 479-484.

6. **Esipov R.S.**, Beyrakhova K.A., Likhvantseva V., Stepanova E.S., Stepanenko V.N., Kostromina M.D., Abramchik Y.A., Miroshnikov A.I. Antiangiogenic and antivasular effects of a recombinant tumstatin-derived peptide in a corneal neovascularization model. *Biochimie* 2012; 94: 1368-1375.

7. **Есипов Р.С.**, Бейрахова К.А., Чупова Л.А., Лихванцева В. Г., Степанова Е.В. , Мирошников А.И. Рекомбинантный фрагмент 44-77 фактора дифференцировки пигментного эпителия препятствует развитию патологической неоваскуляризации роговицы. *Биоорг. химия*. 2012; 38(1): 1-8.

8. **Esipov R.S.**, Stepanenko V.N., Beyrakhova KA, Muravjeva T.I., Miroshnikov A.I. Production of thymosin $\alpha 1$ via non-enzymatic acetylation of the recombinant precursor. *Biotechnol Appl. Biochem*. 2010; 56(1): 17-25.

9. **Esipov R.S.**, Stepanenko V.N., Chupova L.A., Boyarskikh U.A., Filipenko M.L., Miroshnikov A.I. Production of recombinant human epidermal growth factor using Ssp dnaB mini-intein system. *Protein Expr. Purif*. 2008; 61(1): 1-6.

10. **Esipov R.S.**, Stepanenko V.N., Gurevich A.I., Chupova L.A., Miroshnikov A.I. Production and purification of recombinant glucagon overexpressed as Intein fusion protein in *Escherichia coli*. *Protein&Peptide letters*, 2006; 13(4): 343-347.

11. **Esipov R.S.**, Chupova L.A., Shvets S.V., Chuvikovskiy D.V., Gurevich A.I., Muravyova T.I., Miroshnikov A.I. Production and purification of recombinant human oxytocin overexpressed as a hybrid protein in *Escherichia coli*. *Protein&Peptide Letters*. 2003; 10(4): 404-411.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента Кочеткова С.Н., отзыв положительный, не содержит замечаний.
2. Отзыв официального оппонента Кострова С.В., отзыв положительный, содержит следующие замечания: «Однако встречаются орфографические и грамматические ошибки, и неточности в оформлении. Например, одна из ссылок на источник на ст. 147 выглядит следующим образом: «[Ошибка! Закладка не определена. 48]». «Структура работы последовательна и логична, однако возможно было бы в конце работы обобщить и систематизировать разработанные методологические приемы»
3. Отзыв официального оппонента Лунина В.Г., отзыв положительный, содержит следующие замечания: «В оформлении диссертации есть некоторые недостатки. В частности, имеются отдельные мелкие орфографические и пунктуационные ошибки и некоторые логические сбойки изложения материала. Так в литературном обзоре в разделе 2.2.6 описываются системы очистки рекомбинантных белков на основе интеинов, в 2.2.7. интеин-опосредованное лигирование белков, а в 2.3.8. модернизированные системы интеин-опосредованного выделения белков на основе полигидроксibuтератных гранул и эластин-подобных пептидов, хотя логичнее, все методики выделения было бы свести в одну главу».

4. Отзыв ведущей организации, отзыв положительный, содержит следующие замечания: «В работе встречаются орфографические ошибки и стилистические неточности. Предложение на с. 161 логически не закончено: «Оптимальную концентрацию растворенного кислорода (pO_2) поддерживали, скорость вращения мешалки.». На с. 166 написано: «Очистку глюкогона от примесных белков, не выпавшего в осадок,...». На с. 188 предложение логически не закончено: «При возможности использовался.». «Основным замечанием к работе является отсутствие в разделе «Материалы и методы» описания используемых животных моделей по исследованию биологической активности всех описанных биофармацевтических препаратов».

5. Отзыв на автореферат академика РАН Власова Валентина Викторовича, научного руководителя ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Отзыв положительный, замечаний не содержит.

6. Отзыв на автореферат д.х.н., проф. Кедика Станислава Анатольевича, заведующего кафедрой биотехнологии и промышленной фармации Института тонкой химической технологий ФГБОУ ВО «МИРЭА Российский технологический университет». Отзыв положительный замечаний, не содержит.

7. Отзыв на автореферат чл.-корр. РАН, д.б.н. Боронина Александра Михайловича, заведующего лабораторией биологии плазмид Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) - обособленного подразделения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук». Отзыв положительный, замечаний не содержит.

8. Отзыв на автореферат д.т.н., проф. Панфилова Виктора Ивановича, заведующего кафедрой биотехнологии ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева». Отзыв положительный, замечаний не содержит.

9. Отзыв на автореферат д.х.н. Клячко Натальи Львовны, проф. химического ф-та, ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.М. Ломоносова". Отзыв положительный, замечаний не содержит.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их достижениями в областях наук, соответствующих теме представленной диссертации. Это подтверждается наличием у них значительно числа публикаций в ведущих российских и международных научных журналах и изданиях. Со времени своего основания Институт ГосНИИГенетика занимался фундаментальными исследованиями и созданием на этой основе промышленных биотехнологий. Накопленные знания о структуре и функционировании геномов микроорганизмов и опыт в исследованиях по генной инженерии позволили сформировать принципы современного конструирования штаммов и создания на их основе биопроцессов мирового уровня, которые используются крупнейшими биотехнологическими компаниями России. Профессор

Кочетков С.Н. является одним из ведущих специалистов в области физико-химической биологии, биохимии, молекулярной биологии и энзимологии. Профессор Костров С.В. – ведущий специалист в области фундаментальных основ биотехнологии, биохимии и белковой инженерии, известен работами по функционированию различных векторных систем. Прикладные работы Лунина В.Г. охватывают многие разделы современной сельскохозяйственной и медицинской биотехнологии, а также нанобиотехнологии. Практическая реализация его технологических решений привела к созданию эффективных биологически активных препаратов на основе рекомбинантных белков. Наличие солидного опыта и высокой квалификации в приведенных выше областях позволяет им объективно судить о научной новизне, а также теоретической и особенно практической значимости диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что применение автором мультивариантного подхода, или технологической платформы при разработке технологий получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных пептидов, с использованием интеин-опосредованных технологий можно рассматривать как общее методическое биотехнологическое направление при создании новых лекарственных средств генно-инженерного происхождения. В результате данной работы автором созданы новые векторные системы и получены высокопродуктивные бактериальные штаммы-продуценты гибридных белков, предназначенные для промышленного культивирования. Созданы и успешно апробированы как интеин-опосредованные, так и классические, с использованием сайт-специфичных протеаз биотехнологии получения целого ряда фармацевтических рекомбинантных полипептидов, включая получение их аналогов посредством химической и ферментативной модификации *in vitro* и *in vivo*.

Значение полученных соискателем результатов исследований на практике подтверждается, тем что на основе разработанных биотехнологических подходов созданы опытно-промышленные технологии получения активных фармацевтических субстанций, включающие методы технологического контроля, анализа конечного продукта и тестирование биологической активности.

Таким образом диссертация Есипова Р.С. имеет ярко выраженное научно-практическое значение. Проведенные исследования по разработке новых подходов по получению рекомбинантных пептидов медицинского назначения в значительной степени расширили технологическую базу современной фармацевтической биотехнологии.

Оценка достоверности результатов выявила, что работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, практические результаты не просто воспроизводимы, но фактически валидированы в условиях опытного биотехнологического производства. Технологии, предложенные соискателем, были внедрены в разработанные с его участием опытно-промышленные и промышленные регламенты и по ним наработаны опытные партии фармацевтических субстанций, а в ряде случаев и лекарственных

средств.

Личный вклад соискателя состоит в том, что он принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов. Весь экспериментальный материал получен лично автором и руководимыми им сотрудниками группы, аспирантами и студентами, а также членами временного трудового коллектива, куда входили сотрудники опытного биотехнологического производства. Анализ полученных данных проведен лично соискателем, кроме того, подготовка основных публикаций, патентов и регламентов выполнена при активном участии автора. Методы контроля качества активной фармацевтической субстанции рекомбинантных полипептидов были разработаны под руководством автора коллективом лаборатории биотехнологии совместно с Контрольно-аналитической лабораторией ОБП ИБХ РАН и отражены в фармакопейных статьях предприятия (ФСП). Нарботка и сертификация опытных серий АФС и ЛС проводилась в соответствии с опытно-промышленным регламентом в условиях ОБП ИБХ РАН. Доклинические испытания препаратов «Глюкоран», «Оксинтолонг», тимозинов $\alpha 1$ и $\beta 4$, аналогов гирудина (дезирудин и лепирудин) и часть работ с препаратами «Пигастин» и «Тумастин» проводились в лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН под руководством д.б.н., проф. А.Н. Мурашева. Доклинические испытания препаратов «Пептальгин» и «Пунальгин» проводились в Лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН совместно с сотрудниками Лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН под руководством академика Е.В. Гришина. Биологическая активность фрагментов пептидных ингибиторов ангиогенеза тестировалась на кафедре офтальмологии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова под руководством академика В.А. Ткачука на модели неоваскуляризации роговицы и глаз кроликов и мышей.

На заседании 23 октября 2019 г. диссертационный совет принял решение присудить Есипову Роману Станиславовичу ученую степень доктора химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 24 человек, из них 11 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 24, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель диссертационного совета
академик РАН



Иванов В.Т.

Ученый секретарь диссертационного совета
д.ф.-м.н.

Олейников В.А.

24.10.2019 г.