

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Есипова Романа Станиславовича «Методология биотехнологического получения рекомбинантных пептидов медицинского назначения», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.06. – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

### **Актуальность**

Развитие современной фармакологии невозможно представить без открытия и использования новых препаратов, получаемых с помощью методов генетической инженерии. Успехи медицины сегодняшнего дня все более базируются на активном диагностическом и терапевтическом применении белковых препаратов, полученных с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Ключевой стадией в данных разработках является использование возможностей организма нового хозяина к считыванию генетической информации и трансформации ее в белковый продукт. Способность биосинтеза в организме заданного полипептида (его экспрессия) является определяющей в выборе нового хозяина и условий его культивирования.

Представленная к защите работа Р.С. Есипова «Методология биотехнологического получения рекомбинантных пептидов медицинского назначения» посвящена как применению имеющихся, так и разработке инновационных подходов к биотехнологическому получению биологически активных пептидов в системе экспрессии прокариот на основе *E. coli*. Подчеркивая преимущества рассматриваемых экспрессионных систем для крупномасштабного производства, автор существенное внимание уделил преодолению различных недостатков и ограничений, присущих прокариотической экспрессии гетерологичных генов, с использованием новых, интересных подходов. В связи с вышеуказанным, в работе Р.С. Есипова поставлена конкретная цель – разработка эффективных способов биотехнологического получения полипептидов и небольших белков медицинского назначения с применением новейших молекулярно-биологических «инструментов», таких как белковый сплайсинг.

### **Научная новизна и практическая значимость**

Основной акцент в диссертации Р.С. Есипова сделан на разработке и практическом применении инновационных, на момент выполнения соответствующих экспериментов, экспрессионных систем, при этом особенно интересно сравнение эффективности различных методов при получении одного и того же полипептида.

Отдельно можно отметить, что масштабирование и стандартизация реакций белкового слайсинга до уровня пилотного производства осуществлена впервые.

Представленные в работе конкретные примеры, отражающие этапы теоретической и практической работы, дополняются сравнительным анализом результатов применения того или иного подхода к созданию эффективной технологии, направленной на получение практически важных биологически активных пептидов, таких как тимозин  $\alpha 1$ , тимозин  $\beta 4$ , глюкагон, модифицированный фрагмент тумстатина (тумастин), аналоги гирудина, эпидермальный фактор роста, оксинтомодулин (оксинтолонг), модифицированный фрагмент фактора дифференцировки пигментного эпителия (пигастин), окситоцин, анальгетический пептид АРНС-3 (пептальгин) и анальгетический пептид РТ-1 (пунальгин). По созданным автором технологиям разработаны опытно-промышленные регламенты на получение соответствующих препаратов. По этим регламентам были наработаны опытные партии активных фармацевтических субстанций для проведения доклинических исследований. Технология получения рекомбинантного глюкагона человека легла в основу опытно-промышленного регламента получения АФС и промышленного регламента производства готовой лекарственной формы.

### **Общая характеристика диссертации**

Диссертация соответствует традиционному плану: присутствует обзор литературы по теме, описание экспериментальных методик, результаты и обсуждение, выводы и список использованной литературы. Работа изложена на 224 страницах и включает 117 рисунков и 11 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 385 ссылок.

Обзор литературы представляет собой последовательное рассмотрение основных этапов создания технологий получения активных фармацевтических полипептидов в *E. coli*, начиная от выбора и конструирования плазмидного вектора до масштабирования протоколов выделения. При этом рассматриваются современные подходы к решению различных проблем и трудностей, возникающих в процессе разработки. Необходимо подчеркнуть, что при выделении полипептидов фармацевтического назначения абсолютно недопустимо присутствие дополнительных аминокислотных последовательностей, таких как аффинные метки или неприродные N-концевые аминокислоты. Такие как формилметионин. Из всего современного арсенала биотехнологических методов выбор в этом случае ограничен двумя подходами: использование специфических протеиназ для отделения вспомогательной

последовательности или включение в состав гибридного белка интеинового домена для его автокаталитического расщепления. В литературном обзоре уделено большое внимание описанию основных механизмов белкового сплайсинга и применения интеинов в коммерческих системах для отщепления вспомогательных последовательностей, их основных достоинств и существенных недостатков.

Экспериментальная часть работы посвящена разработкам эффективных биотехнологических методик получения из гибридных белков широкого списка биологически активных субстанций фармацевтического назначения.

Для разработки технологии с использованием сайт-специфических ферментов автором был создан штамм-продуцент и наработан препарат высокоспецифичной протеазы вируса гравировки табака. Среди альтернативных ферментов, таких как тромбин, фактор Ха или энтерокиназа, TEV-протеаза отличается высокой специфичностью и эффективностью, большой толерантностью в отношении N-концевого остатка отщепляемого полипептида, а также широким диапазоном условий ферментативной реакции. Этим и был обусловлен выбор этого фермента при разработке технологий выделения ряда полипептидов. Тем не менее, и данный фермент имеет ряд ограничений, которые не позволяют его успешно применять для расщепления гибридных белков во всех без исключения случаях. Это было показано автором работы на конкретных примерах.

Автором успешно был внедрен в собственные разработки альтернативный подход, основанный на явлении белкового сплайсинга и не требующий использования протеиназ. Были разработаны методологические подходы к масштабированию и оптимизации процессов получения целевых пептидов из гибридных белков, содержащих интеины в качестве белков-партнеров, осуществляющих автокаталитическое расщепление при определенных условиях. При создании каждой из описанных технологий автор стремился к достижению максимальной эффективности расщепления интеин-содержащего гибридного белка. За счет того, что условия проведения стадии расщепления по сравнению с описанными ранее в литературе значительно упрощены и унифицированы, стало возможным масштабирование процессов без потери эффективности.

При этом и данный методологический подход имеет целый ряд особенностей и недостатков. Основным недостатком этой технологии является невозможность заранее предсказать успешность использования полученной конструкции. При наличии определенных аминокислот на N-конце целевого полипептида возможно, как преждевременное автокаталитическое расщепление на стадии культивирования, так и

полная инактивация расщепления уже выделенного гибридного белка. Поэтому при использовании интеиновых систем каждый конкретный белок требует индивидуального подхода для получения рентабельной и масштабируемой технологии. Автор на целом ряде примеров показывает итерационные шаги по разработке технологий получения пептидов с использованием и классического или интеин-опосредованного подхода, проводящие в конечном итоге к реализации полномасштабного процесса в рамках пилотного производства.

Весьма интересное решение предложено автором при разработке интеин-опосредованной технологии получения окситоцина. В ходе работы было определено, что большое количество цистеиновых остатков в гибридном белке, содержащем семь повторов окситоциноил-лизина, приводит к полной агрегации белка и невозможности проведения стадии ренатурации. Для предотвращения агрегации и стабилизации гибридного белка автором была успешно применена реакция сульфитолиза цистеинов, сопряженная с солюбилизацией тел включения. Таким образом, значительно расширены возможности применения интеин-опосредованного способа получения полипептидов, содержащих большое количество дисульфидных связей.

Также автором были предложены технологии получения тимозинов  $\alpha 1$  и  $\beta 4$  посредством получения неацетилированных форм пептидов и их последующим химическим ацетилированием. Проведенная работа по оптимизации параметров реакции ацетилирования, включающая подбор и эффективное соотношение ацетилирующего агента и пептида, состава реакционной смеси, привела к 45–50 % практического выхода региоселективной реакции ацетилирования. Дальнейшее масштабирование было проведено для тимозина  $\beta 4$ . В работе подробно отображены все шаги перехода от лабораторной к опытно-промышленной технологии.

Поскольку химическая стадия является лимитирующей, с целью повышения выхода продукта автором был разработан инновационный ферментативный подход с ацетилированием *in vitro*. Для этого в единую полицистронную конструкцию были включены гены гибридного белка на основе интеина *MxeGytA* с N-концевым тимозином  $\beta 4$  и N-ацетилтрансферазы *E. coli*. Такой подход позволил осуществлять процесс ацетилирования целевого продукта на этапе культивирования с очень высокой эффективностью и тем самым значительно повысить выход целевого продукта. Это стало возможным благодаря хорошо продуманной генно-инженерной конструкции и подобранным условиям культивирования штамма-продуцента.

В работе отдельно рассмотрен важный вопрос масштабирования технологий. Например, при масштабировании технологии выделения химически

гликомодифицированного окситомодулина человека, оксинтолонга, было обнаружено, что среди продуктов реакции, вследствие неправильного сплайсинга, накапливался окситомодулин с двумя лишними аминокислотами (HisAsn-), принадлежащими интeину *SspDnaB*, причем в литературе такое явление не было ранее описано. Для предотвращения этой побочной реакции автором были оптимизированы основные параметры реакции расщепления (рН, ионная сила, время инкубирования).

Нужно отметить, что автор не ограничился созданием технологий получения перспективных фармацевтических полипептидов. Для улучшения фармакологических свойств тимозина  $\beta_4$  и окситомодулина были разработаны методы их химических модификаций с полисиаловой кислотой и получены региоселективные конъюгаты. Фармакокинетические свойства полученных производных были подтверждены в соответствующих экспериментах.

Приведенные примеры показывают, какие разные трудности приходилось преодолевать автору в процессе разработки технологий получения фармацевтических полипептидов, что делает методические наработки, полученные в результате работы, чрезвычайно ценными с прикладной точки зрения. Результаты данной работы отражаются в большом количестве полученных патентов. Многие из разработанных технологий были доведены до стадии опытно-промышленных регламентов, а для двух препаратов, «Глюкорана» и «Оксинтолонга» были созданы промышленные технологии получения готовых лекарственных форм.

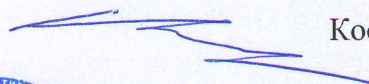
Особое внимание автор уделил разработке методов технологического контроля и анализа конечного продукта, включая тестирование биологической активности, чему посвящены последние главы работы. Сложность этого этапа заключается в том, что лишь для двух продуктов, глюкагона и окситоцина, существует устоявшаяся мировая практика тестирования. Для других субстанций, полученных в работе, потребовалась разработка аналитических методик контрольных точек на всех стадиях производства и метода контроля конечного продукта, включая оценку биологической активности.

Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, однако встречаются орфографические и грамматические ошибки, и неточности в оформлении. Например, одна из ссылок на источник на с. 147 выглядит следующим образом: «[Ошибка! Закладка не определена.48]».

Структура работы последовательна и логична, однако, возможно, целесообразно было бы в конце работы обобщить и систематизировать разработанные методологические приемы.

В качестве заключения необходимо сказать, что диссертация Р.С. Есипова «Методология биотехнологического получения рекомбинантных пептидов медицинского назначения» полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Есипов Роман Станиславович заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.06. – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной генетики РАН  
Чл.-корр. РАН, д.х.н., проф.



Костров С.В.

Подпись д.х.н. Кострова С.В. удостоверяю  
Ученый секретарь Института молекулярной генетики РАН  
к.б.н



Андреева Л.Е.

123182 Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2  
Телефон: +7-499-196-00-00  
E-mail: kostrov@img.ras.ru