

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу 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)

Несмотря на огромные достижения современных технологий, как в микробиологическом, так и в пептидном синтезе, существует проблемная методическая серая зона для обоих подходов - это получение пептидов длиной 30-100 аминокислотных остатков. Синтез таких соединений химическим путем является очень дорогостоящим процессом, что обуславливает высокую стоимость получаемых продуктов. А альтернативный химическому синтезу пептидных препаратов биотехнологический подход не располагает эффективными масштабируемыми технологиями для получения целевых белковых соединений такого размера. В тоже время на фармацевтическом рынке востребовано большое количество полипептидных препаратов размером 30-100 а.о.. Созданию отечественной биотехнологической бактериальной платформы для биосинтеза и очистки небольших белков и пептидов посвящена данная диссертационная работа.

Целью диссертационной работы Романа Станиславовича была разработка методологии биотехнологических процессов биосинтеза рекомбинантных биологически активных полипептидов и создание на ее основе биотехнологий получения активных фармацевтических субстанций, предназначенных для приготовления готовых лекарственных форм.

Для достижения поставленной цели диссертант поставил **8 задач**, в которые входило: разработать методические подходы по применению интеиновых экспрессионных систем в создании биотехнологий получения рекомбинантных пептидов медицинского назначения; создать высокопродуктивные штаммы-продуценты гибридных белков, содержащих целевой полипептид и белок-носитель; разработать подходы получения растворимых гибридных белков, способных к протеолитическому расщеплению, включая оптимизацию условий рефолдинга; разработать биотехнологии получения АФС рекомбинантных полипептидов медицинского назначения; разработать методы постадийного технологического контроля получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантных полипептидов и готовых лекарственных форм; масштабировать технологический процесс и наработать опытные партии для проведения доклинических испытаний; разработать методы анализа конечного продукта, включая тестирование биологической активности, и проекты фармакопейных статей для полученных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов и готовых лекарственных форм; разработать опытно-промышленные регламенты на биотехнологическое получение активных фармацевтических субстанций и готовых лекарственных форм.

Научная новизна. Разработана и реализована биотехнологическая концепция получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов, основанная на применении элементов белкового сплайсинга. Показаны возможности и ограничения биотехнологического применения интеиновых структур для получения рекомбинантных полипептидов. На примерах получения конкретных полипептидов

продемонстрирован альтернативный биотехнологический подход с использованием элементов белкового сплайсинга, предполагающий отказ от использования специфических протеаз. Разработана технология получения N-ацетилированного тимозина $\alpha 1$ и тимозина $\beta 4$ за счет ацетилирования *in vivo*. Разработаны клеточные и животные модели, методики тестирования биологической активности полученных фармацевтических субстанций.

Практическая значимость. Разработана и реализована биотехнологическая концепция получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов, основанная на применении элементов белкового сплайсинга. Показаны возможности и ограничения биотехнологического применения интеиновых структур для получения рекомбинантных полипептидов. На примерах получения конкретных полипептидов продемонстрирован альтернативный биотехнологический подход с использованием элементов белкового сплайсинга, предполагающий отказ от использования специфических протеаз. Разработана технология получения N-ацетилированного тимозина $\alpha 1$ и тимозина $\beta 4$ за счет ацетилирования *in vivo*. Разработаны клеточные и животные модели, методики тестирования биологической активности полученных фармацевтических субстанций. На разработанные технологии и продукты получено 9 патентов.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 240 страницах, включая 129 рисунков, 15 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 350 источников. Работа написана по традиционному плану, изложение достаточно четкое и последовательное.

Обзор литературы, изложенный на 57 страницах, включает анализ отечественных и иностранных источников. В обзоре изложены как фундаментальные сведения, так и проблемы практического применения, это делает его интересным и насыщенным. Обзор литературы состоит из четырёх разделов. В первом диссертант подробно описал экспрессионные векторные системы *E. coli*, уделив основное внимание транскрипционным регуляторным элементам, во втором подробно рассказано о технологии гибридных белков и вспомогательных последовательностях, которые в них используются: аффинные домены, лидерные последовательности, сайты протеаз. Рассмотрены их свойства и тонкости применения. Особое внимание уделено интеин-содержащим системам. Подробно рассмотрены механизмы белкового сплайсинга, особенности первичной структуры интеинов и факторы, влияющие на эффективность процесса белкового сплайсинга. В третьем разделе описаны различные штаммы-продуценты рекомбинантных белков, использующихся для синтеза белков в форме телец включения и растворимой форме. В четвёртом соискатель анализирует информацию, представленную в обзоре и определяет основные задачи исследования. В целом литературный обзор охватывает необходимый и достаточный для понимания проблемы круг вопросов.

Перехожу к характеристике собственно результатов соискателя. Их изложение начинается с описания **материалов и методов**, использованных в работе. Этот раздел дает представление о высоком современном методическом уровне работы. Автор успешно сочетает разнообразные химические, биохимические, микробиологические и молекулярно-биологические подходы для решения поставленных задач. Следует подчеркнуть, что введение каждого нового метода в работу не было излишеством и не представляло собой погоню за распространением арсенала современных методов, а

явилось неизбежным логическим следствием решения конкретных научных задач. Особый интерес представляет технологический раздел, в котором описано получение TEV-протеазы и всех других пептидов объектов диссертационной работы. Данный раздел представляет колоссальный интерес для практикующих ученых и студентов профильных биотехнологических ВУЗов. Особую методическую ценность представляют биотехнологии ацетилирования *in vivo* и сиапирование *in vitro* рекомбинантных пептидов.

Результаты и обсуждение. Соискателем был выбран биотехнологический путь получения полипептидных препаратов медицинского назначения, основанный на идее микробиологического биосинтеза рекомбинантного гибридного белка, содержащего целевой пептид, с последующим специфическим расщеплением гибридного белка и выделением необходимого продукта. Разрабатываемая технология сводилась к биосинтезу гибридного белка и двум вариантам его гидролиза: специфическому расщеплению по сайту соответствующей протеиназой или автокаталитическому расщеплению за счет использования интеиновых структур. В созданных биотехнологиях получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных биологически активных полипептидов, в данной работе соискателем были использованы оба варианта. Это позволило не только выбрать оптимальную стратегию для конкретного полипептида с учетом особенностей его первичной структуры, но и сравнить эффективность технологических вариантов для тех полипептидов, которые были получены обоими способами.

Несмотря на широкое использование в лабораторных исследованиях, применение интеин-опосредованных систем в производственном масштабе для получения рекомбинантных белков или полипептидов не было описано. Роману Станиславовичу удалось внедрить интеиновую технологию в производственную платформу получения фармпрепаратов. Для этого было необходимо результаты, полученные в лабораторных условиях, масштабировать и оптимизировать все сопряженные со стадией расщепления процессы для каждого конкретного продукта. В результате был разработан ряд опытно-промышленных и промышленных биотехнологий с применением элементов белкового сплайсинга. В результате соискателем было создано интеин-опосредованные биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов: глюкогона, аналогов гирудина, фрагмента эндостатина, оксинтомодулина, эпидермального фактора роста, модифицированных фрагмента фактора дифференцировки пигментного эпителия, окситоцина, анальгетических пептидов - Analgesic peptide 3 из морской анемоны *Heteractis crispa* (АРНС-3) и пуротоксина-1 из яда паука *Alopecosa marikovsky* (РТ-1). Наиболее ярко внедрение протеазной и интеиновой технологии в практический биотехнологический процесс показано на примерах получения рекомбинантного Тβ4 человека.

Этот раздел начинается с оптимизации и масштабирования лабораторного метода получения рекомбинантного Тβ4 человека до пилотного производства. Надо отметить, что, как белок, Тβ4 человека крайне проблемный объект, как для химического пептидного синтеза, для которого он слишком длинный и дорогой в производстве, так и для микробиологического, для которого он слишком короткий и неустойчивый к протеазам бактерий. Для его получения соискатель первоначально использует стандартные генно-инженерные подходы, основанные на получении гибридного продукта с белком носителем с последующим отрезанием от него с помощью специфической протеазы. Диссертантом были оптимизированы и масштабированы стадии культивирования штамма-продуцента, разрушения клеточной биомассы, хроматографической очистки,

протеолитического расщепления и ацетилирования дезацетилтимозина $\beta 4$. Выход каждой операции составлял 90-95% и только эффективность процедуры ацилирования составляла 87%. Итоговый выход продукта составил 55% от исходного. После масштабирования и оптимизации технологии получения рекомбинантного Т $\beta 4$ человека, суммарный выход целевого продукта увеличился с 20 до 80 мг с 1 л культуральной жидкости.

Следующим направлением деятельности Романа Станиславовича стало получение аналогов Т $\beta 4$ с пролонгированным временем жизни. Из литературных источников известно, что биологической активностью обладает не только ацетилированная форма пептида, но и неацетилированная форма рекомбинантного Т $\beta 4$ человека. Ацетильная группа, присоединяемая в результате посттрансляционной модификации к первой аминокислоте Т $\beta 4$ - серину, никак не связана с биологической активностью пептида и необходима только для увеличения продолжительности его жизни в токе крови. Замена этой группы на другие стабилизирующие группы является наиболее логичным подходом к разработке селективного способа получения аналогов Т $\beta 4$ с пролонгированным временем жизни. Соискателем были оптимизированы и масштабированы стадии сиалирования дезацетилтимозина $\beta 4$. Выход данной процедуры модификации составлял 55% от исходного. Структура полученных аналогов была подтверждена пептидным картированием. Стабильность полученных Т $\beta 4$ была определена в сыворотке крови кролика. Исследование кинетики деградации Т $\beta 4$ и его производных показало, что время, за которое содержание пептида уменьшилось вдвое для Т $\beta 4$ соответствует 2 ч., а для моносиалированного Т $\beta 4$ соответствует 6 ч.

Казалось бы, Роману Станиславовичу удалось удачно преодолеть «Долину смерти», ожидающую каждую научную разработку, и сделать вполне качественные биотехнологические продукты. Но диссертант на этом не остановился.

Апофеозом данной диссертации является разработка интеин-опосредованного метода для производства рекомбинантного Т $\beta 4$ из ацетилированного *in vivo* гибридного белка. Химический способ модификации N-концевого серина Т $\beta 4$ ангидридом уксусной кислоты не является единственным способом селективного ацетилирования пептида. Все мы знаем, какой большой проблемой является работа с этим соединением. Альтернативным подходом является ферментативный метод ацетилирования, в котором роль ацетилирующих ферментов играют ферменты из класса N-ацетилтрансфераз, использующие в качестве субстрата кофермент – ацетилкоэнзим А, но высокая стоимость кофермента делает промышленное получение Т $\beta 4$ методом ферментативного ацетилирования *in vitro* нерентабельным. Наиболее перспективным с точки зрения производства представляется ацетилирование пептида *in vivo*, при котором мог бы использоваться ацетилкоэнзим А самой клетки.

Для того чтобы создать экспрессионную систему, обеспечивающую синтез гибридного белка параллельно с N-ацетилтрансферазой, были клонированы последовательности кодирующие гибридный белок Т $\beta 4$ GyrA и N-ацетилтрансферазу в полицистронную конструкцию. Также в вектор клонировали олигонуклеотидный дуплекс, содержащий измененную последовательность Шайна–Дальгарно необходимую для ослабления экспрессии второго гена в полицистронной конструкции. В качестве ацетилирующих ферментов выбрали аланиновую и сериновую N-ацетилтрансферазы *Escherichia coli*.

Сконструированные рекомбинантные плазмиды pER–Т $\beta 4$ GyrA–AcAla и pER–Т $\beta 4$ GyrA–AcSer были использованы для трансформации и экспрессии в штаммах *E.coli*.

Электрофоретический анализ показал, что при индукции в штаммах–продуцентах образовывался гибридный белок Tb4GyrA в растворимой форме, и параллельно с гибридным белком синтезировалась сериновая или аланиновая ацетилтрансферазы. Спонтанное расщепление гибридного белка *in vivo* отсутствовало.

Был отобран штамм, в котором наиболее эффективно происходило ацетилирование целевого пептида. Большой удачей данной разработки является полное удаление формилметионина с N–конца целевого пептида в штаммах-продуцентах в процессе посттрансляционной модификации, независимо от условий культивирования. В результате многофакторного эксперимента были выбраны условия, при которых выход Tβ4 достигал 74% от исходного количества предшественника. Далее было проведено исследование кинетики ацетилирования пептида в штамме-продуценте Tb4GyrA–AcSer. Через 20 часов после индукции доля ацетилированного предшественника рекомбинантного Tβ4 человека выросла до 93% от исходного количества дезацетилтимозина бета 4 и далее не увеличивалась.

Очистка и автокаталитическое расщепление гибридного белка были проведены на хитиновом сорбенте. В итоге выход рекомбинантного Tβ4 человека составил 93% от исходного количества неацетилированного пептида. Исходя из количества разрушенной биомассы и полученного лиофилизованного продукта был рассчитан выход целевого продукта, который составил 20 мг рекомбинантного Tβ4 человека с 1 л культуры, что сопоставимо с выходом Tβ4, полученному по лабораторной методике. Разработанная технология необычайно изящна и реализует сказочную русскую мечту наиболее емко выраженную в сказке «По щучьему велению, по моему хотению». В ней всё происходит само: удаляется формил-метионин, ацетируется целевой продукт, который сам отщепляется при добавлении тиольного реагента. Но эта простота и спонтанность процесса основано не на волшебном слове, а на глубоких фундаментальных знаниях и хорошем техническом исполнении.

Была исследована биологическая активность рекомбинантного Tβ4 человека в спонтанной мышинной модели хронического дерматита, которая показала, что местная обработка кожи спины мышей рекомбинантным Tβ4 человека не только способствовала достоверному ослаблению симптомов хронического дерматита, но и приводила к долгосрочному сохранению терапевтического эффекта.

Соискателем также были разработаны технологии получения готовых лекарственных форм и методы технологического контроля и анализа конечного продукта для всех разрабатываемых объектов.

Работа написана хорошим русским языком, материал изложен просто и доступно. 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 2.2.8. модернизированные системы интеин-опосредованного выделения белков на основе полигидроксibuтиратных гранул и эластин-подобных пептидов, хотя логичнее все методики выделения было бы свести в одну главу. Все это не снижает общего благоприятного впечатления от работы.

Отмеченные замечания не изменяют общей положительной оценки диссертации. В целом, экспериментальный материал, полученный в настоящей работе, и сделанные на его основе выводы весьма интересны. Решена научная задача, которая является заметным

шагом вперед на пути к созданию бактериальных продуцентов коротких модифицированных пептидов и имеет практическое значение для медицины и ветеринарии. Качество полученного материала и важность основных выводов заслуживает самой высокой оценки. Достоверность полученных результатов сомнений не вызывает.

Автореферат диссертации Р.С. Есипова удовлетворяет требованиям ВАК России и в полной мере отражает ее наиболее существенные положения и выводы. Ключевые результаты работы Р.С. Есипова адекватно отражены в опубликованных печатных работах. Апробация работы проведена на высоком уровне, результаты обсуждались на многочисленных Всероссийских и Международных конференциях, конгрессах и симпозиумах. Диссертация отвечает паспорту специальности 03.01.06 — биотехнология (в том числе бионанотехнологии) по пункту п.п. 5,8.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационное исследование Р.С. Есипова на тему: «Методология биотехнологического получения рекомбинантных пептидов медицинского назначения» выполнено на высоком уровне и полностью соответствует по актуальности, научной новизне, объёму и практической значимости полученных результатов требованиям, установленным пунктами 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней» (учреждённого Постановлением Правительства РФ 24 сентября 2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 №335; 02.082016 №748; от 29.05.2017 № 650), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук, а его автор заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.06 — биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент

Лунин Владимир Глебович

заведующий лаборатории биологически

активных наноструктур,

доктор биологических наук,

федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.18

lunin1955@gmail.com +7 (916) 144-2264, +7 (499) 193-3001

Подпись В.Г.Лунина заверяю

Учёный секретарь ФГБУ "НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи" Минздрава России

Кожевникова Л.К.

