

Отзыв

На автореферат диссертации Р.С. Есипова «Методология биотехнологического получения рекомбинантных пептидов медицинского назначения» на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Благодаря активному развитию технологии химического и биотехнологического синтеза значительно возросло количество новых фармацевтических препаратов пептидной природы, различающихся как своим происхождением, так и природной структурой. Оба подхода имеют свои сильные и слабые стороны: химический синтез эффективен для получения сравнительно коротких пептидов (до 20 аминокислотных остатков), с увеличением размера целевого продукта эффективность биосинтеза возрастает, и для пептидов размером более 40 аминокислотных остатков биосинтез является предпочтительной стратегией. Связано это с уменьшением выхода на каждой стадии химического синтеза и существенным усложнением очистки конечного целевого продукта из реакционной смеси. В то же время получение коротких пептидов для медицинского назначения, как правило, возможно только через биосинтез гибридных белков и в этом случае выход целевого пептида слишком мал по сравнению с общим весом синтезированного белка. Разработка биотехнологического получения пептидов медицинского назначения является достаточно трудоемким и затратным делом, особенно при наличии в молекуле посттрансляционных модификаций, и значительно отличается от получения пептидов для исследовательских целей, где возможно и использование «тагов» для быстрого выделения и присутствие аминокислот, не входящих в природную последовательность, и наличие в препарате примеси модифицированных аналогов.

Диссертационная работа Р.С. Есипова «Методология биотехнологического получения рекомбинантных пептидов медицинского назначения» как раз посвящена вопросам разработки биотехнологического получения пептидных фармпрепаратов. Содержание работы соответствует выбранной специальности 03.01.06-Биотехнология (в том числе бионанотехнологии). Представленный автореферат изложен на 55 стр., и содержит все необходимые разделы, описывающие актуальность, новизну, цель и задачи исследования, практическую значимость и положения, выносимые на защиту, сформулированные выводы и список публикаций автора по теме диссертации. Основное содержание работы изложено в 5 разделах и дает достаточно полное представление о выполненной работе. Автореферат написан хорошим научным языком, результаты проиллюстрированы 21 рисунком.

Автор рассматривает два различных методологических варианта биотехнологического получения рекомбинантных пептидов. Для реализации первого подхода потребовалась разработка технологии получения сайт специфического фермента – протеазы вируса гравировки табака (TEV-протеазы), т.к. при производственных масштабах закупочная цена фермента оказалась бы существенной. Во втором варианте целевой пептид образуется в результате автокаталитического расщепления гибридного белка за счет действия интеина (интеин-опосредованная технология).

В автореферате проанализированы достоинства и недостатки каждого варианта и приводятся аргументы в пользу их использования.

Главный критерий выбора той или иной технологии – это особенности первичной структуры целевого пептида, которая определяет возможность и целесообразность используемого варианта. Особый интерес вызывает разработка автором технологии получения анальгетического пептида PT1, основы препарата Пунальгин. На первом этапе автор исследовал эффективность биосинтеза гибридных белков, содержащих целевой пептид, в разных вариантах: с тиоредоксином А (гибридный белок Trx-PT1), с хитин-связывающим доменом (CBD-PT1), с модифицированным интеином *MxeGyrA* (GyrA-PT1) и с мини-интеином *SspDnaB* (DnaB-PT1). Уровень биосинтеза гибридных белков в *E.coli* был примерно сопоставим, однако способность гибридных белков к расщеплению с образованием целевого пептида различалась почти на порядок. Этот критерий и определил выбор оптимального варианта, что позволило автору в конечном итоге создать эффективную технологию получения активной фармацевтической субстанции. Более того, наработанный опыт был также успешно использован при создании технологии получения другого рекомбинантного пептида АРСНЗ, основного компонента препарата Пептальгин.

Считаю существенным научным достижением автора разработку технологии получения тимозина $\beta 4$ с ацетилированным N-концевым остатком серина. На первом этапе работ автором был получен нативный тимозин бета 4 из рекомбинантного предшественника, представляющего собой дезацетилтимозин $\beta 4$, который был регио-селективно ацетилирован уксусным ангидридом до получения конечного продукта. В автореферате подробно описана технология получения нативного тимозина бета 4 и показано, что стадией, при которой происходят наибольшие потери, является стадия химического ацилирования. Поэтому автором было предложено весьма оригинальное решение – заменить химическое ацетилирование на ферментативное, проводимое непосредственно в клетке, в процессе биосинтеза гибридного белка. Были созданы необходимые генно-инженерные конструкции, содержащие не только гены гибридных

белков, но и гены N-ацетилтрансфераз и подобраны оптимальные условия культивирования штамма-продуцента. В итоге была разработана инновационная биотехнология получения ацетилированного тимозина $\beta 4$ из пептидного предшественника.

Главным практическим достижением всей работы считаю создание промышленных технологий получения рекомбинантных пептидов медицинского назначения. Для прикладного научно-технологического исследования конечным результатом может считаться только реализованный технологический процесс, закрепленный в соответствующей технологической документации. А их в ходе настоящей работы было создано 8 штук. И конечно наибольшим практическим достижением следует признать создание промышленной технологии рекомбинантного глюкагона, получившего коммерческое название «Глюкоран». В работе представлены основные этапы создания технологии: разработка генно-инженерной конструкции, лабораторное получение продукта и оптимизация всех основных этапов. При масштабировании технологии была проведена повторная отработка основных этапов, что позволило реализовать технологию в промышленном производстве. Важным аспектом практической направленности всей работы является обеспечение разработанных технологий не только технологической документацией, но и создание нормативно-технической документации на разрабатываемые препараты. Сам факт организации работ по разработки технологии, написании всей необходимой технологической и нормативно-технической документации, а также организации проведения биологических испытаний ряда полученных активных фармацевтических субстанций говорит в высоких организаторских способностях автора и его способности работать с большой командой.

В целом, считаю работу законченным научно-прикладным исследованием, имеющим большое практическое значение. Выводы сформулированы четко и логично, подтверждены экспериментальным материалом и не вызывают сомнений.

Считаю, что диссертационная работа Р.С. Есипова «Методология биотехнологического микрополучения рекомбинантных пептидов медицинского назначения» выполнена на современном профессиональном уровне, свидетельствует о высокой квалификации диссертанта, полностью соответствует требованиям ВАК и безусловно заслуживает присуждения соискателю ученой степени доктора химических наук по специальности биотехнология.

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Член-корреспондент РАН
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Федеральный исследовательский центр
Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»
Подпись *Борогина А.М.* удостоверяю
Заведующий канцелярией *Мельникова*

А.М. Борогин (ФИЦ ПНЦБИ РАН)
142290, Московская область, г. Пушкино,
пр-кт Науки, 5
Телефон: +7 (495) 625-74-48
E-mail: boronin@ibpm.pushchino.ru