

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

Заседания Диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН

От 23 октября 2019 года

Защита диссертации на соискание ученой степени доктора химических наук

Есипова Романа Станиславовича

**Методология биотехнологического получения рекомбинантных пептидов
медицинского назначения**

Специальность – 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Москва 2019

СТЕНОГРАММА

Заседания Диссертационного совета Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 23 октября 2019 года.

Председатель диссертационного совета

академик РАН Иванов В.Т

Ученый секретарь диссертационного совета

д.физ.-мат. н. Олейников В.А

Из 30 членов совета присутствует 24 человека, из них докторов по профилю диссертации – 11.

1.	Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
3.	Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
4.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
5.	Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
6.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
7.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(03.01.06)
8.	Академик РАН	Богданов Алексей Алексеевич	(03.01.03)
9.	Академик РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
10.	Член-корр. РАН	Деев Сергей Михайлович	(03.01.03)
11.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
12.	Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
13.	Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
14.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
15.	Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
16.	Д.б.н.	Мурашев Аркадий Николаевич	(03.01.06)
17.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(02.00.10)
18.	Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
19.	Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
20.	Академик РАН	Свердлов Евгений Давидович	(03.01.03)
21.	Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(02.00.10)
22.	Член-корр. РАН	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
23.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
24.	Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)

Иванов Вадим Тихонович

Утвердили повестку дня.

Олейников Владимир Александрович

Позвольте познакомить с материалами личного дела. Роман Станиславович Есипов окончил в 93 году Московский институт тонкой химической технологии по специальности биотехнология, в 99 – защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности молекулярная биология у нас в институте, с 93 по 95 – стажер исследователь, с 95 по 97 – м.н.с, с 97 по двухтысячный – научный сотрудник, с двухтысячного по настоящее время – старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии нашего института. И работа выполнена в нашем институте, в институте биоорганической химии и по теме диссертации опубликовано 22 работы в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий и рекомендуемых Минобрнауки для опубликования результатов диссертации, по теме получено 13 патентов Российской Федерации. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, именно 2 июля 19 года и все необходимые документы в деле имеются.

Иванов Вадим Тихонович

Вопросы, уточнения. Обычно нет. Спасибо. Тогда я даю слово диссертанту. Роман Станиславович, вам слово. Сорок минут, не более.

Есипов Роман Станиславович, диссертант

(Излагает основные положения диссертационной работы).

Иванов Вадим Тихонович

У вас все?

Есипов Роман Станиславович, диссертант

Да

Иванов Вадим Тихонович

Спасибо, Роман Станиславович. Есть ли вопросы к докладчику? Работа многоплановая, объемная, наверняка какие-то вопросы возникают. Прошу.

Смирнов Иван Витальевич

Спасибо за доклад. Скажите, можно ли сравнить промышленную стоимость производства пептидных и полипептидных препаратов в случае хим.синтеза и биосинтеза. И к этому же вопросу: те, кто производит, основные производители таких препаратов, они получают их биосинтезом, либо химическим синтезом?

Есипов Роман Станиславович, диссертант

Спасибо за вопрос. Существует достаточно много статей, таких «ревью», где пытаются оценить какой все-таки способ лучше. Вот из того, что я прочитал, примерно препараты, размером больше тридцати-сорока аминокислот, скажем так, уже достаточно выгодно получать с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Если же мы говорим, например, о пептидах, размером десять-пятнадцать аминокислот – то, конечно, их выгоднее получать химическим синтезом. Например, одна из технологий, о которой я говорил – окситоцин - это девятичленный пептид, несмотря на то, что мы делали тандемноповторяемую последовательность, тем не менее, все равно было очевидно, что химический синтез в этом случае является преобладающим. Второй момент, о котором нужно сказать, действительно, на Западе активно развивается химический синтез небольших пептидов. Почему у нас это сложно идет? Это связано, насколько я знаю, с тем, что в России производство именно больших пептидов или относительно больших пептидов, размером больше трех-четыре килодальтон, не происходит. Видимо, это связано с очень большой дороговизной тех реагентов, закупкой таких реагентов, которые требуются для химического пептидного синтеза. Поэтому, насколько я знаю, в России вот почему мы идем таким путем - нам биотехнологический путь на данный момент наиболее выгоден, потому что сам по себе пептидный синтез, а я, например, вообще не знаю компаний, которые в России способны производить такие продукты в промышленных масштабах, я имею в виду, десятки грамм или порядка килограмма, таких нет.

Иванов Вадим Тихонович

Есть еще вопросы? Да, прошу.

Долгих Дмитрий Александрович

Скажите, пожалуйста, какие то из этих препаратов, в частности аналоги анальгетиков, дошли до клинических исследований, и какие тут перспективы?

Иванов Вадим Тихонович

У меня просьба повторить вопрос в микрофон, чтобы все слышали.

Есипов Роман Станиславович

Я могу еще повторить сам, если вы позволите.

Вопрос был следующий: «Из рассказанных мною препаратов и анальгетиков, в частности, какой пошел в дальнейшее использование?».

Во-первых, я скажу, что все-таки в этой работе нашей задачей была только наработка и поэтому за продажу и реализацией этих разработок отвечаем не мы. Но я знаю точно, что в частности анальгетический пептид и его технология уже даже продан компании. Это было сделано в результате контракта через вновь образованный ЦНТИ, и насколько, я понимаю, там вполне серьезные финансы институт получил по продаже этой технологии. То есть была

осуществлена продажа полного комплекса, не только молекулы, но и тех результатов доклинических испытаний, протоколов, которые были нами разработаны. И я могу сказать уже сейчас, что почти все без исключения разработки, о которых я докладывал, они сейчас вошли в проект ЦНТИ ИБХ РАН. Я думаю, это работа будущего.

Иванов Вадим Тихонович

Еще вопросы? По-моему иссякли. Вопросы такие глобальные. Спасибо. Вы можете отдохнуть немного. Переходим к выслушиванию отзывов. В начале у нас отзыв ведущей организации и если есть отзыв на диссертацию. Такие редко бывают.

Олейников Владимир Александрович

Такие редко бывают, но бывают.

Иванов Вадим Тихонович

Сейчас нет.

Олейников Владимир Александрович

(Зачитывает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается)

Да. В данной ситуации отзывы на автореферат есть, а на диссертацию нет. Значит ведущая организация, это официально назначенная, ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное учреждение, Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Отзыв подписан доктором биологических наук, профессором, директором этого центра Ененко. Отзыв полностью положительный. Вначале говорится об актуальности, подчеркивается, что работа Есипова является примером развития прикладной биотехнологии. При поддержке государственных программ, в полной мере это соответствует современному вектору развития отрасли. Диссертация Есипова носит выраженный научно-прикладной характер и посвящена описанию существующих и созданию новых инновационных технологий получения биофармацевтических лекарственных препаратов пептидной природы. Далее о достижениях. Подчеркивается новизна исследования. Эта работа является результатом практической реализации новых биотехнологических подходов получения рекомбинатных полипептидов медицинского назначения. Отмечается, что в работе наглядно прослеживается путь от идеи до ее реализации. В работе изложены результаты экспериментов по исследованию интеиновых систем, которые предшествовали практическому использованию этих систем. На фоне описанных в работе методов получения химически модифицированных рекомбинантных полипептидов инновационно выглядит интеин-опосредованная технология N-концевого ацетилирования *in vivo*. Созданные экспрессионные системы, включающие штамм-продуцент и полицистронный вектор являются примером практической реализации тонко контролируемого

аппарата прокариотической системы экспрессии. И с точки зрения развития фундаментальной науки, в ходе выполнения диссертационной работы, автор расширил возможности применения экспрессионных систем на основе интеинов для получения гетерологических белков и показал возможные трудности и способы их преодоления на ряде конкретных примеров. Далее общая характеристика работы: 224 страницы, 117 рисунков, 11 таблиц, список цитируемой литературы – 385 источников и в целом работа представляет собой комплексное исследование. Литературный обзор покрывает широкий спектр современных подходов по получению рекомбинантных полипептидов в прокариотической системе экспрессии, содержит три значимые части. Я не буду останавливаться на частях, поскольку на это дается достаточно широкий обзор и далее в разделе материалы и методы подробно изложены созданные в данной работе лабораторные технологии, описано постадийное масштабирование процессов и их апробация в условиях опытного биотехнологического производства нашего института ИБХ РАН. В разделе результаты и обсуждение для каждого объекта в полной мере проведена цепочка итерационных шагов при разработке лабораторных технологий их выделения. Показаны «узкие» места в первоначальных версиях методики, без обхода которых невозможно было бы их успешное и масштабирование до препаративных объемов. Работа хорошо структурирована, во многом результаты, проведенные в экспериментальных разделах, являются следствием хорошего знания того технологического многообразия, что изложено в литературном обзоре. Здесь вот про литературный обзор. Материалы диссертационной работы опубликованы в 22 статьях в международных и отечественных научных журналах, получено 13 патентов Российской Федерации. Результаты проведенных исследований легли в основу опытных промышленных технологий и технологических регламентов на получение ряда активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов с различным терапевтическим действием. В диссертации практически для всех исследуемых препаратов подробно описан путь создания лабораторной методики до оптимизированной и масштабированной технологии производства опытных партий активных фармацевтических субстанций, необходимых для проведения доклинических исследований в рамках государственных контрактов Минпромторга Российской Федерации. Отмечаются лекарственные формы: это глюкоран, глюкагон рекомбинантный человеческий генно-инженерный. Полученные результаты доклинических исследований этого препарата, входящего в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, позволили создать регистрационное досье в Минздравсоцразвития Российской Федерации, получить разрешение для проведения дальнейших клинических испытаний. Но вот, наконец, замечания к работе. Большое количество, значит, в изложенной диссертационной работе результаты и выводы подкреплены большим количеством экспериментальных данных,

сомнений не вызывают. Но в работе встречаются орфографические ошибки и стилистические неточности. Здесь три мелкие ошибки, предложение на странице 161 логически не закончено: оптимальную концентрацию растворенного кислорода pO_2 поддерживали скорость вращения мешалки. Или на странице 166 написано: очистку глюкагона от примесных белков не выпавшего в осадок. 188 страница: предложение логически не закончено – при возможности использовался «точка». Основным замечанием к работе является отсутствие в разделе материалов и методов описания использованных животных моделей по исследованию биологической активности всех описанных биофармацевтических препаратов. Это, наверное, наиболее существенное замечание. И при этом сделанные замечания не умаляют достоинства диссертации. Далее - заключение о том, что диссертационная работа Есипова Р.С. представлена на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности биотехнология, является завершенным научно-квалификационным исследованием, результаты работы легли в основу создания биотехнологий получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов, предназначенных для приготовления готовых лекарственных форм. Диссертация полностью соответствует требованиям положения о присуждении ученых степеней, соответствующий закон указан. Её автор Есипов Роман Станиславович заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.06 (биотехнология, в том числе бионанотехнологии). Отзыв рассмотрен на заседании ученого совета, указан номер протокола, составлен профессором, доктором биологических наук, академиком Дебабовым. Ну и как я сказал, подписан директором доктором биологических наук Ененко. Вот фактически одно замечание.

Иванов Вадим Тихонович

Если есть желание, можете ответить на замечание.

Есипов Роман Станиславович

Я могу только сказать слова благодарности академику Дебабову, что он так внимательно прочитал мою диссертацию и нашел те огрехи, с которыми я полностью согласен и которые признаю. Что касается того, что не показано, не обсуждаются модели. Я принципиально в своей диссертации не стал обсуждать биологические модели, а именно постарался сделать эту работу такой именно технологической. При этом, я был обязан при обсуждении конечных продуктов, обозначить проверку биологической активности этих препаратов, потому что именно результаты биологического испытания попадают в фармакопейную статью предприятия. Это позиция биологической активности и, собственно, только это я обсуждаю в своей диссертационной работе. Я соглашусь с этим замечанием. Надо сказать, что анальгетические пептиды были проверены методом горячей пластины или уксусной корчи и описать, при каких условиях проводился эксперимент, а в случае того же глюкагона с помощью стандартного

измерения концентрации глюкозы с мышами CD1. Это единственное, что я могу сказать по этому поводу. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович

Принимаю. Спасибо. У нас есть пять отзывов на автореферат. Давайте познакомимся с ними.

Олейников Владимир Александрович

Я сразу скажу, что все пять отзывов, положительные, без замечаний, но тем не менее я хочу подчеркнуть отзыв, подписанный Борониным. Это институт, Пушкинский научно-исследовательский центр биологических исследований Российской академии наук. Боронин отмечает, что: «Считаю существенным научным достижением автора - разработку технологии получения тимозина $\beta 4$ с ацелированным N-концевым остатком серина и оригинальное решение заменить химическое ацелирование на ферментативное. Главным практическим достижением 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 в ходе настоящей работы было создано 8 штук». Это положительный отзыв от Боронина.

Дальше отзыв, подписанный Вадимом Викторовичем Власовым. Это научный руководитель Института химической биологии, фундаментальной медицины Сибирского отделения. Отзыв полностью положительный. Он пишет: «Безусловно, объем выполненной работы впечатляет. Отдельного внимания заслуживают интеин-опосредованные методы, и диссертация вносит значительный вклад...».

Дальше. Подписано зав.кафедрой биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий, доктором наук, профессором Кедиком. Отзыв без замечаний. «Положительной чертой представленной работы является ее комплексность». Это мы услышали сегодня в докладе.

Далее зав.кафедрой биотехнологии ФГБУ ВО Российский химико-технологический университет имени Менделеева, профессор, доктор наук Панфилов. Отзыв без замечаний.

И последний, отзыв от доктора химических наук, профессора Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования, Московского университета Натальи Львовны Клячко. «Впечатляет как объем выполненной автором работы, так и то, что практически для каждого из препаратов автором пройден весь цикл работ, от создания конструкций для получения рекомбинантного полипептида до получения готовой лекарственной формы и проведения выпуска опытной партии на промышленном производстве».

Вот фактически без замечаний пять отзывов на автореферат.

Иванов Вадим Тихонович

Мы принимаем к сведению. Ни вопросов, ни ответов на замечания не требуются. Переходим к выслушиванию официальных оппонентов. Господин Кочетков Евгений Николаевич, Институт молекулярной биологии.

Кочетков Евгений Николаевич

(Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается)

Глубокоуважаемый Вадим Тихонович, глубокоуважаемые коллеги, мы прослушали доклад, и я не думаю, что стоит особенно распространяться на тему того, что сделано. Доклад был хороший, и я хочу поделиться некоторыми мыслями, которые у меня возникли при чтении диссертации и при чтении доклада. Одна из этих мыслей следующая, что на самом деле диссертация защищается на звание доктора химических наук, но диссертация технологическая. Рассматривая эту диссертацию, мы должны исходить из таких критериев, как если бы мы рассматривали диссертацию чисто научную. Задачи научной диссертации заключаются в описании нового явления, новой реакции, или получения нового вещества, класса веществ, от белков до низкомолекулярных соединений, а задачи технологической работы – это сделать все эти вещи полезными для людей. Довести это до такого состояния, чтобы это можно было получать в масштабах, достаточных для использования этого вещества, и также сделать это экономически целесообразным. И эта работа отвечает второй категории требований полностью. Еще два слова я хочу сказать насчет пептидов и системы экспрессии. Безусловно, мы знаем, что пептидные соединения используются сейчас все больше и больше, может быть не от хорошей жизни, но мы знаем, что количество антибиотических пептидов, которые изучает Татьяна Владимировна и нейропептиды, расширяется. Все это связано с резистентностью организма. Второй момент, о котором сказал докладчик, когда отвечал на вопросы. К сожалению, мы живем в тех условиях, что получать пептиды прямым химическим синтезом, в общем-то мы не на столько богаты. Из этого следует, что получать такие пептиды с помощью микробиологического производства целесообразнее. И получение с помощью прокариотической системы экспрессии дешево, отработано и лишено многих подводных камней, которые имеют системы эукариотической экспрессии. Соответственно, эта работа, которую мы сейчас послушали, отвечает этим критериям, потому что производятся продукты, полезные людям, производятся они в достаточно больших количествах, что делает возможным их применение для клинических испытаний, что уже очень важно. Я должен сказать, что диссертанту очень повезло, что он работает в этом институте, где есть такая мощная производственная база и, соответственно, он был лишен "радости" пристраивать свои разработки куда-то еще, прям здесь все это доводилось до хорошего состояния. Чтобы не принижать значение и не говорить, что это чисто технологическая работа, конечно как мы

видели реальный объем работ, который был проведен и мы прекрасно понимаем, когда диссертант быстро перечисляет «мы температуру поправили, добавили того сего, пятого-десятого» - это огромное количество экспериментов, причем экспериментов не в пробирочке, вот такой маленькой, а в масштабных экспериментах, трудоемких, дорогих. И работа делится на две части: одна часть, которая помогает улучшить некие принципиальные моменты. Вот, например, отработанная интеиновая тест-система, очень хорошо доведенная до конца, которая позволяет получать такие продукты, причем, это достаточно длинные пептиды, с большим выходом. Вторая часть, и она не менее важная, это разработка регламентов и получение многих продуктов (два десятка реальных продуктов), которые уже доведены до состояния производственных регламентов. Пока, наверное, в основном в этом институте, но то что уже есть 250 литровые ферментеры, это уже заводское производство.

В основном я уже даже сказал то, что я хотел сказать. Мне кажется, что эта работа является достаточно хорошим примером того, что у нас очень много диссертаций защищается под грифом «биотехнология». На самом деле они реально биотехнологическими не являются, потому что, допустим, разработан лабораторный способ получения того или иного вещества и это называется биотехнологией, конечно это не биотехнология. Биотехнология это то, что Роман Станиславович сделал, то есть взял некую систему, систему эту улучшил до такого состояния, что это стало выгодным, и довел все эти разработки до технологического состояния. Не случайно 13 патентов и 8 регламентов. Это существенный момент, который я думаю, выводит эту работу, по крайней мере, в наших условиях на весьма значимое положение. Я не буду говорить о недостатках, о неправильных оборотах и глаголах, что для докторской диссертации это не самое главное. Мне хочется поздравить заранее, я уверен, что все будет хорошо в плане голосования, мне заранее хочется поздравить Романа Станиславовича и Анатолия Ивановича с такой хорошей работой и, действительно, вкладом в развитие биотехнологии у нас в стране. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович

Давайте подождем голосования насчет поздравления. Сейчас мы выслушаем предложение официальных оппонентов. Господин Костров Сергей Викторович, Институт молекулярной генетики.

Костров Сергей Викторович

(Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается)

Уважаемые коллеги, я, во-первых, должен сказать, что я полностью согласен с теми отзывами, которые прозвучали, и мне стало проще после этого выступать. Я постараюсь быть кратким и просто высказать несколько соображений, которые у меня возникли, когда я ознакомился с этой работой и очень коротко охарактеризовать свое от нее впечатление. Действительно, эта

работа биотехнологическая, наверное, в самом хорошем смысле этого слова. И результаты говорят сами за себя, получен целый ряд продуктов, которые идут на клинические испытания. Я совершенно согласен с тем, что для нашей страны работа просто пионерская; и работа автора, и работа того коллектива, в котором он работает. Соответственно я хотел бы немного с другой стороны охарактеризовать и посмотреть на эту работу. Получено большое количество действительно важных результатов и действительно важных продуктов. В то же время, количество должно переходить в качество и это тот случай, когда это произошло в диссертации. Есть еще очень важный аспект, который является результатом этой диссертационной работы. На самом деле, такая принципиальная вещь – масштабное получение физиологически активных пептидов медицинского назначения микробным синтезом, гетерологичная система. Вообще говоря, не очевидно, что пептиды можно было получить таким способом. Понятно, что прямой подход, который связан с непосредственным синтезом пептида, он в данном случае не актуален в связи с целым рядом понятных причин – низкая стабильность, неадекватность и так далее. Соответственно, по-видимому, стратегически единственным вариантом является использование химер, синтез гибридного продукта, который кроме целевого пептида включает еще белок-носитель или аффинную метку и, соответственно, дальше встает вопрос о последующем отщеплении целевого пептида и его очистки. Это выводит только на два, на данный момент, возможных варианта – это последующая, специфическая протеолитическая атака или та система, которая в основном разрабатывается в данной диссертации. Ключевой момент использования интеиновой системы состоит в том, что, система-то далеко не новая, хорошо охарактеризована, но охарактеризована с лабораторной точки зрения, как говорили предыдущие выступающие, наверное, не случайно, так как широкого распространения на масштабирование эта система не получила. Проблема, по-видимому, состоит в невозможности создать единый стандартный подход, потому что функционирование интеиновой системы очень сильно зависит от структуры конкретного пептида, в данном случае, или белка, который вы собираетесь таким образом получать. Стержневой дороги здесь нет. И вот тут как раз сработало то, что сделал автор, и то, что я считаю очень существенным результатом этой диссертационной работы. Если нет возможности сделать стержневую дорогу, потому что в принципе невозможно придумать единое решение, тогда можно попробовать сделать много тропинок, которые будут обходить вот эти вот проблемы, возникающие перед строительством многополосного шоссе. Вот, собственно, автор этим и занялся. На мой взгляд, такой задачей явилось создание мультивариантного подхода, если хотите методического куста или сейчас это принято называть технологической платформой. Тем не менее, если нельзя сделать дорогу, можно сделать много тропинок. Значительная часть работы автора состояла именно в том, что он отработывал разные и разные

варианты для разных моделей, для разных белков, для разных проблем, а проблем, слава богу, как вы видели из рассказа автора, который был ориентирован на технологичность. И представление большого количества экспериментального материала, на разных системах были разные проблемы. И автор пытался создать пути того, каким образом эти проблемы можно обходить и решать. И в результате получилась некая технологическая платформа, некий набор методических направлений, который можно применить, разрабатывая новые пептиды и новые задачи. То есть по сути дела создано то, что принято называть новой технологической платформой, которая на самом деле, для нас с вами обеспечила возможность использования интегративной технологии вот в этом сложном направлении. Соответственно, именно с этой точки зрения я считаю, что это действительно докторская работа и в данном случае количество перешло в качество. Мы не просто имеем набор полученных теми или иными способами продуктов с соответствующей нормативной документацией, а надо сказать, что это тоже производит очень большое впечатление, потому что это масштабирование очень важно, не говоря уже о том, что автору пришлось заняться такими вещами, как, например, отработка методов анализа всех стадий процесса, отработка методов анализа конечных продуктов и так далее. Работа очень объемная и тяжелая, и с этой стороны все в полном порядке, как и с остальных сторон. Но, в данном случае, мне просто хотелось бы еще раз подчеркнуть, что это не просто набор методик для получения восьми регламентов или 12 продуктов, или 13 патентов, это создание технологического направления, которое теперь, благодаря работе автора, благодаря тому опыту, который накоплен в этом подразделении, теперь позволяет эффективно воспринимать новые задачи и делать пептиды медицинского назначения при помощи этой технологии с использованием тех обходных путей, того методического куста, который создан в этой работе. Соответственно, мне кажется, что это очень важная, очень значимая работа и не менее значимы те результаты, которые получены автором. Соответственно, у меня никаких сомнений, что это очень достойная докторская работа, я призываю поддержать автора, но и должен огласить заклинание, что в качестве заключения необходимо сказать, что диссертация Романа Станиславовича Есипова «Методология биотехнологического получения рекомбинантных пептидов медицинского назначения» полностью соответствует требованиям положения о присуждении ученых степеней, указаны ссылки в официальном отзыве на соответствующие нормативные документы в предъявляемой диссертации на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Есипов Роман Станиславович заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора химических наук по специальности биотехнология (в том числе бионанотехнологии). Считаю, что данная работа действительно очень существенна, очень объемна, очень значима, имеет непосредственные практические результаты, и она привела к созданию некоего нового технологического

направления, биотехнологического, которое может быть эффективно использовано в этом важнейшем направлении создания лекарственных средств пептидной природы. Призываю поддержать диссертанта. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович

Спасибо, Вам. Роман Станиславович, правильно я понимаю, что нет причины для выхода на трибуну и спора с оппонентом.

Есипов Роман Станиславович

Если позволите пару слов.

Иванов Вадим Тихонович

Если есть желание, пожалуйста.

Есипов Роман Станиславович

Я уже сразу хочу сказать слова благодарности.

Иванов Вадим Тихонович

Это потом.

Есипов Роман Станиславович

Здесь важный момент. Я говорил о том, что я не ожидал, что оппоненты так внимательно прочитают диссертацию и обратят внимание на те самые важные моменты, которые я лично для себя уже давно знаю. Мы давно ввели систему, когда мы начинаем работать с новым объектом, мы используем принцип веерной генно-инженерной конструкции, потому что на данном этапе генная инженерия является самым малозатратным процессом. То есть мы одновременно создаем несколько генно-инженерных конструкций, затем выбираем потенциально интересную, далее таким итерационным подходом решаем технологическую проблему. Мне, безусловно, очень приятно, что оппоненты обратили внимание именно на эту систему, что мы точно знаем, как она будет работать. Более того, когда мы видим пептид, который нам необходимо разработать, мы обладаем таким пониманием, в какой из тех же интеиновых систем или какой интеин будет наиболее удачным для получения такого пептида. Собственно, вот то замечание, которое я...не замечание, которое я хотел сказать.

Костров Сергей Викторович

Вот это и есть результат.

Есипов Роман Станиславович

Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович

Спасибо. Что-то новое. Диссертант хвалит рецензента. Тем не менее, двигаемся дальше. Официальный оппонент Лунин Владимир Глебович, доктор биологических наук, Институт эпидемиологии и микробиологии имени Гамалеи.

Лунин Владимир Глебович

(Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается)

Моя задача значительно упрощена, потому что два предыдущих оппонента дали замечательные и исчерпывающие отзывы. Я бы хотел рассказать, что отзывы в основном научные, но я бы хотел сказать, чем меня эта работа удивила и во многом порадовала именно как биотехнолога. Все мы биотехнологи рассматриваем очень ограниченный круг объектов, и есть та группа объектов, с которыми и я очень часто сталкивался и только, когда к ним подходил и думал об их решении, я думал, что нет, никогда я этим не буду заниматься. И это именно тот круг объектов, которым занимался Роман Станиславович, это пептиды размером от 30 до 100 аминокислотных остатков. Основные проблемы пептидного синтеза заключаются в том, что это очень дорогой процесс, а генно-инженерных подходов для экспрессии практически не существует. Потому что все стандартные подходы основаны либо на аутентичном, либо на гибридном синтезе. Аутентичный синтез для этих пептидов невозможен, поскольку эти пептиды небольшого размера и не стабильны при экспрессии в бактериях, а гибридный синтез сопряжен с колоссальными технологическими проблемами, такими как правильный фолдинг гибридного белка, расщепление протеазой, что сразу накладывает целый ряд больших затрат, и эти пептиды оказываются в так называемой серой зоне. В одном случае – дорого, в другом случае – очень проблемно и тоже дорого, а сами пептиды должны быть маленькими и необычайно дешевыми. И я хотел бы отметить, что диссертант создал цельную технологическую платформу. Потому что, как мы всегда, когда сталкиваемся с объектами и знаем, что есть эффект контекста, тем не менее, можно сказать о цельном технологическом решении, создании цельной технологической платформы для экспрессии именно таких, крайне неудобных пептидов размером 30 – 100 аминокислотных остатков. И фактически в этой диссертации соискатель продемонстрировал, как он эту платформу создавал и, в конечном счете, реализовал на целом ряде объектов. Это так кажется, когда Роман Станиславович говорит, как это все изящно происходит, но сам как биотехнолог, я знаю какие колоссальные проблемы возникают при этом. И это основная проблема стыка науки и биотехнологии, которой занимался Роман Станиславович, некая долина смерти, которую ему удалось преодолеть. Все мы знаем, что на одном конце этой долины стоит научная разработка, на другом - стоит биотехнологический продукт. Одно дело увидеть какое-то искрение и полосочку в электрофореze, совершенно другое дело создать технологию, в которой продукт производится в граммовых количествах с десятилитрового ферментера и особенно в нашей стране в настоящий момент это необычайно сложно и важно. Но то, что меня потрясло и в общем очень порадовало – это то, что автор продемонстрировал на модели создание продуцента тимозина $\beta 4$. Сначала он продемонстрировал, как это делается традиционным образом, то есть получил

гибридный белок и расщепил с помощью специфической протеиназы и провел ацилирование уксусным ангидридом, что получилось в высшей степени замечательно, то есть все выходы, что меня потрясло, находились в диапазоне 90-80%, и конечный продукт удалось получить с выходом фактически 1 грамм с десятилитрового ферментера. Это совершенно замечательные цифры. Это демонстрация традиционной технологии. Но все мы знаем, какие колоссальные технологические проблемы возникают, даже не технологические, а юридические, при взаимоотношении с милицией, при работе с этим соединением, поскольку он используется для, мягко говоря, и других целей. И автор создал совершенно замечательную, другую, технологию, в которой все происходит «по шучьему велению, моему хотению». И в этом замечательное достижение разработки, где он сделал слитный белок тимозина $\beta 4$ с интеином гиразой, создал полицистронную матрицу, в которой во второй рамке входила аланиновая ацетилаза *E.coli*, и в этой модели он наблюдал экспрессию тимозина $\beta 4$. Здесь все и впрямь происходило, как в русской сказке, формилметионин сам отщеплялся с эффективностью 90%, N-ацетилаза ацетилировала N-концевой серин с эффективностью 93%, а после того, как этот продукт выделяли, он сам спонтанно гидролизировался с помощью тиольных агентов опять же с эффективностью 90%. Это, по-моему, реализация русской мечты, о которой все мы читали в сказке, а тут она вот реализовалась. Понятно, что это не сказка, а это результат очень хороших как фундаментальных знаний, которыми владеет Роман Станиславович, так и создание с помощью этих знаний замечательных технологий. В заключение хочу сказать, что соискателем были разработаны технологии получения готовых лекарственных форм и массы других лекарственных препаратов, это довесок к такой колоссальной разработке по тимозину. Есть определенные недостатки в написании, как в замученных опечатках, так и некоторых логических перестановок. Но все эти замечания не изменяют общей положительной оценки диссертации, все сделано на очень хорошем уровне, а главное, что сделана не только научная разработка, но и ее биотехнологическая реализация. На основании вышеизложенного мне тоже хотелось бы произнести сакральные фразы, которые, несомненно, являются объективными. Считаю, что диссертационное исследование Романа Станиславовича на тему «Методология биотехнологического получения рекомбинантных пептидов медицинского назначения» выполнено на высоком уровне и полностью соответствует по актуальности, научной новизне, объему, практической значимости полученных результатов, требованиям, установленным пунктами 9-14 положения о присуждении ученых степеней, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии). Спасибо за внимание.

Иванов Вадим Тихонович

Спасибо за отзыв, Владимир Глебович. Есть ли желание отвечать на замечания, написанные в отзыве. Нет необходимости, правильно я понимаю. Я согласен, спасибо. Переходим к общей дискуссии. Кто хотел бы поделиться соображениями по поводу, как голосовать. Лев Давыдович, прошу.

Румш Лев Давыдович

Уважаемые коллеги, так как я представлял эту работу на нашем семинаре белково-пептидных технологий, тоже не могу не сказать слова об этой замечательной работе. Тут никакой критики нет, я полностью согласен с самим докладом, с тем, что говорили оппоненты и сейчас хороший термин прозвучал. Называется работа создание методологии, концепция, создание платформы. Абсолютно модный термин. Диссертант достаточно скромный, он не взял этот термин «создание платформы». На самом деле очень сложно реализовать в производстве то, что сделано на лабораторном столе. Мне тоже пришлось поработать на заводе после окончания института, и я себе отлично представляю, что такое проводить эксперименты в лаборатории, а потом это в десятках килограмм сделать в цехе, это совсем другая работа. Поэтому, большая диссертация. Я посмотрел раздел методов. Написано все, если кому-то интересно, повторю, все четко изложено. Поэтому я поздравляю диссертанта, я голосую, конечно, «за» и призываю всех это сделать. Я думаю, так все и сделают.

Иванов Вадим Тихонович

Спасибо. Кто еще хотел бы поделиться соображениями? У всех созрело убеждение как действовать. По-видимому, последнее верно. И тогда я имею возможность дать слово диссертанту, чтобы завершить обсуждение.

Есипов Роман Станиславович

Если я понимаю так, что это то самое заключительное слово, которое можно сказать. Эта работа, которую я сегодня докладывал, безусловно, сделана очень большим коллективом авторов. Безусловно, всем людям, которые работали со мной при реализации тех задач, о которых я говорил ранее, я очень признателен. И, тем не менее, поскольку не очень часто можно сказать людям слова благодарности, я бы хотел сказать многим людям лично. В первую очередь, я хочу поблагодарить многоуважаемых оппонентов, за их труд, что они нашли время очень внимательно прочитать мою диссертацию и обратили внимание на то, что я предполагал, что они озвучили при таком большом уважаемом собрании. За что я им очень-очень глубоко признателен. Я благодарен научному руководителю, с которым я работаю уже очень много лет, это академик Анатолий Иванович Мирошников. Я пришел сюда со студенческой скамьи и все время, что я работаю в институте, работал в лаборатории биотехнологии. Анатолий Иванович был руководителем моей кандидатской работы, а сейчас научным консультантом моей диссертационной работы. Спасибо ему большое. Как я уже говорил, эта работа была сделана

большим коллективом авторов и в первую очередь я хочу поблагодарить сотрудников лаборатории биотехнологии. Это наш взрослый состав лаборатории - Муравьева Татьяна Игоревна, Чупова Лариса, которым я очень признателен за совместную работу. И более молодому поколению, Василию Николаевичу Степаненко, Ксении Бейраховой, Марии Андреевне Костроминой, Дмитрию Макарову, это те люди, которые разрабатывали со мной эти технологии в лаборатории. Я хочу сказать слова благодарности очень многим сотрудникам опытного биотехнологического производства. В первую очередь, на тот момент руководителю отдела контроля качества Шибановой Елене, цеху готовой лекарственной формы Наталье Викторовне Сизовой. И хочу вспомнить очень моего близкого друга и человека, с которым я прошел очень многие эти проекты и более того, в котором я был уверен как в самом себе, это Татьяна Ивановна Костромина, которая была начальником цеха экспериментальной ферментации. Хочу поблагодарить сотрудников лаборатории биологических испытаний в лице Аркадия Николаевича Мурашова, с которым нас связывают не только производственные, но и искренние дружеские отношения. И также сотрудников отдела центральной клинической больницы РАН и сотрудников кафедры офтальмологии факультета фундаментальной медицины под руководством академика Ткачука. Хочу поблагодарить свою семью, которая ожидала моей защиты, оказывала мне всяческую поддержку при выполнении работы, особенно в те сложные девяностые годы, за что я им очень признателен. И, в частности, своей жене, Ларисе, которая тоже присутствует в этом зале. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович

Ну что же, нам остается последний этап голосования. Созрело предложение по составу счетной комиссии, которую оглашу в простом варианте, без регалий имен и отчеств: Смирнов, Мурашов и Олейников. Есть ли какие другие предложения, может отводы, самоотводы. Не вижу. Прошу голосовать за данный состав счетной комиссии. Кто «за»? Кто «против»? Счетная комиссия избрана и перед тем, как объявлять перерыв, я бы хотел еще предварительно, пока еще не голосуя, обсудить проект заключения о завершении голосования. Есть ли какие пожелания по коррекции, по изменению того проекта, который получился. Николай Владимирович, традиционно имеет свои соображения.

Бовин Николай Владимирович

Я хотел сказать, что от раза к разу качество этого документа растет и, тем не менее, если мы посмотрим на страницу 5, второй абзац, который начинается со слов «диссертационный совет отмечает что...» и потом после это «что» идет копия из выводов диссертации. Я считаю, что это не правильное сочетание «диссертационный совет отмечает», а дальше идут слова диссертанта. Эти слова надо чуть-чуть перефразировать, чтобы не было копия.

Иванов Вадим Тихонович

Если авторы этого проекта о заключении согласны, то я предлагаю нам всем решать, что доработаем в рабочем порядке проект заключения с Вашим участием, Николай Владимирович. Не против?

Хорошо. Еще замечания, да?

Румш Лев Давыдович

Небольшое замечание. На 3 странице на диссертацию получен отзыв «Костров С.Н», он все-таки Сергей Викторович. Опечатка.

Иванов Вадим Тихонович

Опечаточка.

Румш Лев Давыдович

Надо поправить.

Иванов Вадим Тихонович

Это принимается без обсуждения. Давайте, если мы готовы к голосованию по проекту заключения, который предстоит. Если нет замечаний, то объявляю короткий перерыв на голосование. По-видимому, не надо расходиться, а терпеливо ждать, как работает счетная комиссия.

(Проходит тайное голосование)

Иванов Вадим Тихонович

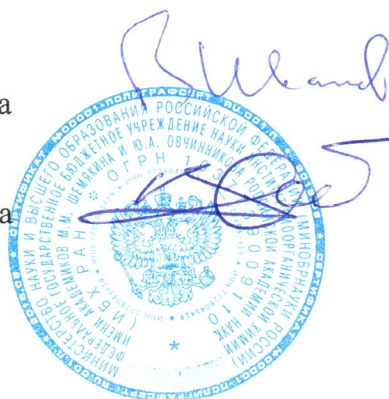
Счетная комиссия закончила свою работу. Прошу занять места. Давайте в рабочем варианте, познакомимся с тем, как мы проголосовали.

Олейников Владимир Александрович

При рассмотрении диссертации Романа Станиславовича Есипова, присутствовало на заседании 24 члена диссертационного совета, роздано бюллетеней 24, и оказалось в урне 24, «за» 24. Против, воздержавшихся нет.

Председатель
диссертационного совета

Ученый секретарь
диссертационного совета



академик РАН, д.х.н. Иванов В.Т

д.физ.-мат.н. Олейников В.А