



НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»



Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Государственный научно-исследовательский институт  
генетики и селекции промышленных микроорганизмов  
Национального исследовательского центра  
«Курчатowski институт»  
(НИЦ «Курчатowski институт» — ГосНИИгенетика)

1-й Дорожный проезд, д. 1 Москва, 117545  
тел.: (495) 315-37-47, факс: (495) 315-05-01

06.09.19 № 9А400.01.1/334/1

На № \_\_\_\_\_

«Утверждаю»

Директор  
государственного  
учреждения  
научно-исследовательский институт  
генетики и селекции промышленных  
микроорганизмов  
исследовательского  
«Курчатowski институт»»  
Федерального  
бюджетного  
«Государственный  
научно-исследовательский институт  
генетики и селекции промышленных  
микроорганизмов  
Национального  
центра



д.б.н., профессор

А.С. Яненко

2019 г.

**ОТЗЫВ**

ведущей организации 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 темы выполненной работы**

Сложно переоценить масштабы активно проводимых по всему миру доклинических и клинических исследований новых терапевтических белков и пептидов, получаемых генно-инженерными методами. Развитие современной российской фармацевтической промышленности было во многом подстегнуто в ходе реализации программы Фарма-2020, запущенной в 2009 г. И препараты, созданные с использованием геномодифицированных организмов, причем не только дженерики, но и оригинальные препараты занимают значительный сегмент современного биофармацевтического

рынка. Работа Р.С. Есипова является примером развития прикладной биотехнологии при поддержке государственных программ в стенах научного учреждения российской академии наук, что в полной мере соответствует современному вектору развития отрасли. Диссертация Р.С. Есипова носит выраженный научно-прикладной характер и посвящена описанию существующих и созданию новых инновационных технологий получения биофармацевтических лекарственных препаратов пептидной природы, что в полной мере соответствует выбранной специальности «03.01.06. – Биотехнология, в том числе бионанотехнологии». Нужно отметить, что, несмотря на широкое внедрение биотехнологий на основе эукариотических или бесклеточных систем использование прокариотической экспрессионной системы сохраняет высокую рентабельность за счет отсутствия многих производственных сложностей. Достижения в этой области по большей части связаны с внедрением инновационных методологий на уровне downstream и upstream процессов и требуют широких фундаментальных знаний доступных приемов и умения их использовать и комбинировать, что в полной мере продемонстрировал диссертант.

#### **Новизна исследования и полученных результатов и выводов, сформулированных в диссертации**

Предложенная к рассмотрению диссертационная работа является результатом практической реализации новых биотехнологических подходов получения рекомбинантных полипептидов медицинского назначения с использованием классического протеолитического пути и интеин-опосредованного подхода и внедрение полученных результатов в разработку и реализацию промышленных технологий получения активных фармацевтических субстанций.

Необходимо отметить, что в работе наглядно прослеживается путь от идеи до ее реализации. В работе изложены результаты экспериментов по исследованию интеиновых систем, которые предшествовали их практическому использованию. На примере ряда препаратов рассмотрено

становление в целом системы белкового сплайсинга, как одного из перспективных инструментов практической биотехнологии.

На фоне описанных в работе методов получения химически модифицированных рекомбинантных полипептидов инновационной выглядит интеин-опосредованная технология N-концевого ацетилирования *in vivo*. Созданная экспрессионная система, включающая штамм-продуцент и полицистронный вектор, является примером практической реализации тонко контролируемого аппарата прокариотической системы экспрессии.

С точки зрения развития фундаментальной науки в ходе выполнения диссертационной работы автор расширил возможности применения экспрессионных систем на основе интеинов для получения гетерологичных белков и показал возможные трудности и способы их преодоления на ряде конкретных примеров.

### **Общая характеристика диссертационной работы**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 224 страницах и включает 117 рисунков и 11 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 385 источников.

В целом работа представляет собой комплексное исследование, которое включает в себя создание новых векторов, разработку методологических подходов по применению различных экспрессионных систем и создания на их основе биотехнологий получения активных фармацевтических субстанций и готовых лекарственных форм рекомбинантных пептидов медицинского назначения.

Литературный обзор покрывает широкий спектр современных подходов по получению рекомбинантных полипептидов в прокариотической системе экспрессии и состоит из трех значимых частей. В первой части обзора описаны наиболее успешно применяемые в лабораторной и производственной практике экспрессионные векторные системы для

биосинтеза целевых белков в *E.coli*. Подробно показаны основные направления развития по созданию новых векторных систем с использованием, помимо классических индукторов, новых регуляторных элементов транскрипции, индуцирующих биосинтез за счет сдвига температур или изменения рН. Второй раздел посвящен применению вспомогательных последовательностей, входящих в состав гибридных белков и выполняющих самые разные функции, а также способов их удаления, что особенно важно для получения белков и пептидов медицинского назначения. Большой раздел отведен описанию использования интеин-содержащих конструкций и системам очистки рекомбинантных белков на их основе, что значительно облегчает дальнейшее понимание целей и задач, решаемых в рамках данной работы. Третий раздел, наиболее интересный для практического использования, посвящен систематизации арсенала многочисленных коммерческих штаммов *E.coli* в зависимости от решаемой задачи, где на конкретных примерах показан алгоритм их применения.

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 ИБХ РАН.

В разделе «Результаты и обсуждение» для каждого объекта в полной мере приведена цепочка итерационных шагов при разработке лабораторных технологий их выделения. Показаны «узкие места» в первоначальных версиях методик, без обхода которых невозможно было бы их успешное масштабирование до препаративных объемов.

Диссертационная работа хорошо структурирована. Во многом результаты, приведенные в экспериментальных разделах, являются следствием хорошего знания того технологического многообразия, что изложен в литературном обзоре.

Материалы диссертационной работы опубликованы в 22 статьях в международных и отечественных научных журналах, получено 13 патентов

РФ. Результаты диссертационной работы были представлены на 34 российских и международных научных симпозиумах и конференциях.

### **Личный вклад соискателя**

На пути достижения поставленных целей при непосредственном участии диссертанта проводился выбор объектов исследования, планировались эксперименты и анализировались полученные результаты. Диссертантом были организованы доклинические исследования ряда полученных фармацевтических субстанций, а также опытно-промышленное производство по разработанным технологическим регламентам.

### **Практическая ценность полученных автором диссертации результатов**

Результаты проведенных исследований легли в основу опытно-промышленных технологических регламентов на получение ряда активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов с различным терапевтическим действием. В диссертации практически для всех исследуемых препаратов подробно описан путь от создания лабораторной методики до оптимизированной и масштабированной технологии производства опытных партий активных фармацевтических субстанций, необходимых для проведения доклинических исследований в рамках государственных контрактов Минпромторга РФ. Наглядным доказательством практической ценности диссертации является создание на основе технологии получения рекомбинантного глюкагона человека опытно-промышленного регламента получения АФС и промышленного регламента производства готовой лекарственной формы – «Глюкоран, глюкагон рекомбинантный, человеческий генноинженерный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 1 МЕ». Полученные результаты доклинических исследований этого препарата, входящего в перечень Жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов и применяющегося при тяжелых гипогликемических состояниях больных сахарным диабетом, позволили

создать регистрационное досье в Минздравсоцразвития РФ и получить разрешение для проведения дальнейших клинических испытаний.

### **Замечания к работе**

Изложенные в диссертационной работе результаты и выводы подкреплены большим количеством экспериментальных данных и не вызывают сомнений. В работе встречаются орфографические ошибки и стилистические неточности.

- 1) Предложение на с. 161 логически не закончено: «Оптимальную концентрацию растворенного кислорода (рO<sub>2</sub>) поддерживали, скорость вращения мешалки.»
- 2) На с. 166 написано: «Очистку глюкагона от примесных белков, не выпавшего в осадок,...»
- 3) 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.

При этом сделанные замечания не умаляют достоинств диссертации.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Есипова Р. С. «Методология биотехнологического получения рекомбинантных пептидов медицинского назначения», представленной на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности «03.01.06. – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» является завершенным научно-квалификационным исследованием, результаты которого легли в основу создания биотехнологий получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов, предназначенных для приготовления готовых лекарственных форм.

