

## 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).

Несмотря на растущий интерес фармацевтических компаний к развитию биотехнологий на основе эукариот и активному применению клеточных линий для получения новых препаратов, представляющих собой, как правило, антитела или гликозилированные сложноорганизованные гормоны, получение полипептидов в прокариотических системах экспрессии остается актуальным, в первую очередь из-за низкой себестоимости процессов и простоты их реализации. Многие ограничения, свойственные гетерологичному биосинтезу в *E. coli* успешно преодолеваются за счет новых методологических подходов на всех стадиях биосинтеза. Применение новых экспрессионных векторов и современных штаммов-носителей *E. coli* может кардинально изменить эффективность экспрессии гетерологичного гена. Развитие подходов к получению пептидных биофармацевтических препаратов является важной областью биотехнологии, а решение множества методологических и технологических трудностей остается крайне актуальной проблемой. Именно достижению этой цели и посвящена диссертация. Выбранный автором подход по применению, и главное, внедрению в реальное биофармацевтическое производство инжин-опосредованных технологий для получения пептидов медицинского применения является актуальным и востребованным как научным, так и промышленным сообществом.

Автором был проведен фундаментальный обзор литературных источников в области получения рекомбинантных полипептидов, в том числе и технологий белкового сплайсинга, на основе которого автор диссертации

смог успешно разработать новые методологические подходы к получению пептидных препаратов, а также успешно внедрить полученные технологии в пилотное промышленное производство.

Рассматриваемая диссертация построена по традиционному плану и включает обзор литературных источников, описание материалов и методов, результаты и их обсуждение, выводы и список цитированной литературы, включающий в себя 385 источников. Объем работы составил 224 страницы, в том числе 117 рисунков и 11 таблиц. Текст диссертации написан хорошим литературным языком, в повествовании соблюдается четкая логика, что делает текст легким для чтения.

В обзоре литературы рассмотрены основные подходы по созданию биотехнологии получения рекомбинантных гетерологичных белков в прокариотической системе экспрессии. Первая часть литературного обзора посвящена рассмотрению генно-инженерных конструкций с различными регуляторными элементами. Автором рассмотрены их преимущества и недостатки, области применения всего многообразия промоторов и регуляторных последовательностей, которые применяются в современных плазмидных векторах. Вторая часть литературного обзора раскрывает возможности применения различных белков-партнеров в составе гибридных белков для решения задач растворимости, рефолдинга, хроматографической очистки и тд. Особенное практическое значение для получения полипептидов медицинского назначения имеют изложенные автором подходы к удалению вспомогательных последовательностей: использование сайт-специфичных протеаз или создание гибридных белков на основе интеинов. Автором детально рассмотрен механизм белкового сплайсинга, а также возможности применения интеинов для создания автокаталитически отщепляющихся аффинных меток. В третьей части обзора рассмотрено множество существующих штаммов-носителей *E. coli*, используемых в настоящее время для создания продуцентов рекомбинантных полипептидов. Проведена классификация существующего генно-инженерного и

микробиологического инструментария по применимости для решения проблем, сопутствующих созданию технологий получения белков путем экспрессии в *E. coli*: предотвращение протеолиза *in vivo*, проведение необходимых посттрансляционных модификаций, увеличение уровня экспрессии и правильного рефолдинга целевого белка, решение проблемы частоты встречаемости кодонов нуклеотидной последовательности пептида при гетерологической экспрессии. Таким образом, автором был проанализирован и систематизирован огромный объем литературной информации, посвященный современным биотехнологическим инструментам, доступным при разработке технологий получения рекомбинантных пептидов.

В практической части диссертации автору удалось наглядно продемонстрировать применение существующей фундаментальной базы для решения актуальных проблем создания биотехнологии медицинских препаратов на основе пептидов. В диссертации Р.С. Есиповым представлена не только разработка подходов для получения активных фармацевтических субстанций пептидной природы, но и проведено сравнение использованных принципиально разных схем.

Практическую часть рассматриваемой диссертации можно разделить на два логических блока: инновации в методологии получения пептидов и собственно промышленные технологии. В первом блоке автор предлагает новые перспективные подходы для получения рекомбинантных пептидов, основанные на явлении белкового сплайсинга для решения ряда биотехнологических проблем: выделения, корректного рефолдинга целевого белка и проведения посттрансляционных модификаций. Во втором блоке автор продемонстрировал применимость предложенных подходов для решения реальных биотехнологических задач, успешно разработав промышленные технологии получения медицински значимых пептидных препаратов, что является безусловно одной из ключевых заслуг автора диссертации.

В первую очередь следует отметить инновационную методологию получения рекомбинантных пептидов тимозина  $\alpha 1$  и  $\beta 4$  человека. Особенностью данных пептидов является наличие ацилированного N-концевого серина. Присутствие данной модификации имеет существенное влияние для биологической активности данных пептидов и их стабильности. Биотехнологическое получение пептидов без посттрансляционной модификации и их дальнейшее химическое ацилирование не позволяет добиться высокого выхода продукта: лимитирующей стадией является ацилирование уксусным ангидридом. Оригинальность методики, предложенной автором, заключается в элегантном решении двух технологических проблем: удалении N-концевого формилметионина и ацилирование N-концевого серина на этапе культивирования штамма-продуцента. Этого удалось достичь благодаря созданию полицистронной генетической конструкции, включающей геном целевого пептида и N-ацилтрансферазы *E. coli*, и подбору штамма-носителя, при культивировании которого эти 2 процесса протекают с наибольшей эффективностью.

Другим перспективным подходом, предложенным Р.С. Есиповым, является использование интеиновых систем для получения целевых полипептидов, содержащих экстремально высокое содержание цистеинов в своем составе. Данный подход был наглядно продемонстрирован на примере семикратно тандемноповторяющейся последовательности окситоциноиллизина, 7-членного пептида с одной дисульфидной связью. При этом первым остатком, следующим за интеином, является N-концевой Cys окситоцина, что имело большое значение для расщепления гибридного белка. Процесс солюбилизации тел включения был сопряжен с сульфитолизом экстрагированного гибридного белка. Данная модификация по остаткам цистеина позволила избежать агрегации белка на этапе рефолдинга и значительно повысить выход целевого продукта.

Нельзя не отметить, что существующая технология интеин-опосредованного расщепления гибридных белков была в значительной

степени доработана автором и адаптирована для эффективного получения полипептидов далеко не в лабораторных масштабах. Основной модификацией первоначальной методики является концепция сопряженного рефолдинга интеинового домена и целевого пептида в составе гибридного белка с образованием правильно-замкнутых дисульфидных связей. Впервые предложенный на примере эпидермального фактора роста человека, данный подход в дальнейшем был успешно применен для разработки технологий получения целого ряда пептидов с большим количеством дисульфидных связей.

К числу достоинств представленной работы стоит отнести правильное построение экспериментальной части – по используемым технологиям. За счет этого на примере нескольких объектов прослеживается реализация изначальной идеи и ее доработка в ходе дальнейшего практического использования. В частности, тимозин  $\alpha 1$  является тем объектом, на котором оттестированы практически все описанные методики: и интеино-опосредованное выделение, и использование протеазы вируса табачной мозаики, и ацилирование *in vivo*.

Невозможно не отметить раздел экспериментальной части диссертации Р.С. Есипова, посвященный созданию промышленных технологий получения ряда пептидов медицинского назначения: тимозина  $\alpha 1$ , тимозина  $\beta 4$ , глюкагон, аналогов гирудина, оксинтомодулина, модифицированных фрагментов фактора дифференцировки пигментного эпителия и тумстатина, анальгетических полипептидов АРНС-3 и РТ-1. Автором подробно описано масштабирование лабораторной методики выделения каждого из объектов и решение возникших при этом технологических трудностей. Автору безусловно удалось продемонстрировать применимость собственных инновационных разработок для решения актуальных проблем промышленной биотехнологии. Среди перечисленных полипептидов отдельной строкой стоят глюкагон и модифицированный оксинтомодулин. Для них были разработаны технологии

готовых лекарственных форм «Глюкоран» и «Оксинтолонг», соответственно, созданы регистрационные досье в Минздравсоцразвития РФ, что фактически открывает возможность проведения полномасштабных клинических исследований.

В заключение, можно утверждать, что диссертация Р.С. Есипова отражает огромный массив успешно выполненной теоретической и практической работы в области промышленной биотехнологии и отвечает всем требованиям по актуальности научной проблемы, практической значимости и масштабу успешно проделанной работы. Материалы, представленные в данной диссертации послужили основой для 22 научных публикаций в отечественных и зарубежных журналах, 13 патентов РФ и 34 докладов на российских и международных научных конференциях.

Безусловно, диссертация Романа Станиславовича Есипова соответствует критериям, установленным в «Положении 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).

Главный научный сотрудник  
ФГБУН Института молекулярной  
биологии им. В.А. Энгельгардта РАН  
член-корреспондент РАН



С.Н. Кочетков

119991, Москва, ул. Вавилова, д.32

Тел.: +7(499)135-23-11. E-mail: [kochet@imib.ru](mailto:kochet@imib.ru)

*Подпись С.Н. Кочетков*  
*Ученый секретарь*  
*Бочаров В.А.*

