

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Звоновой Елизаветы Александровны

«Разработка биотехнологической платформы биосинтеза функционально активной пролонгированной формы интерферона бета-1b в бактериальной системе», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы.

В настоящее время для лечения многих патофизиологических состояний человека в качестве эффективных препаратов используются терапевтические рекомбинантные белки и пептиды, синтезируемые в различных системах экспрессии. Особенно актуальным представляется производство рекомбинантных белков человека, аналоги которых чрезвычайно трудно или практически невозможно синтезировать химически. Со времени применения в медицинской практике первого рекомбинантного белка инсулина в начале 90-х годов прошлого столетия, количество таких белков неуклонно растет и включает моноклональные антитела, факторы свертывания крови, факторы роста - гранулоцитарный колониестимулирующий фактор роста, макрофагальный колониестимулирующий фактор, эпидермальный фактор роста, фактор роста тромбоцитов, фактор роста фибробластов, цитокины и многие другие. Однако при тестировании созданных рекомбинантных белков и пептидов на модели теплокровных в некоторых случаях становится очевидным, что они не способны обеспечить ожидаемый терапевтический эффект по ряду причин, связанных с их особенностями, такими как относительно быстрое выведение из кровяного русла, токсичность, иммуногенность, протеолитическая нестабильность и другие. В связи с этим, для улучшения физико-химических и фармакокинетических характеристик рекомбинантных терапевтических белков необходимо проводить дополнительные исследования и разработки по их оптимизации. Именно этому вопросу и посвящена диссертационная работа Е.А.Звоновой, цель которой состояла в оптимизации фармакокинетических характеристик препарата интерферона бета-1b, синтезируемого в бактериальной системе экспрессии. В качестве основной диссертантом использована стратегия, основанная на увеличении гидродинамического объема молекулы рекомбинантного белка, а именно – использование технологии получения ПЭГ-миметиков.

Таким образом, представленная диссертационная работа Звоновой Елизаветы Александровны является актуальной, поскольку она посвящена решению серьезной научной и прикладной задачи, связанной с разработкой биотехнологической платформы биосинтеза функционально активной пролонгированной формы интерферона бета-1b в бактериальной системе экспрессии.

В работе описаны стратегии конструирования белковой молекулы, слитой с последовательностью ПАС, а также условия получения рекомбинантного белка, в том числе и при масштабировании процесса его биосинтеза. Уделено пристальное внимание разработке методов выделения и очистки рекомбинантного целевого белка, а также анализу его физико-химических и фармакокинетических характеристик по сравнению с нативным аналогом.

Научная новизна и практическая значимость исследования и полученных результатов.

Научная новизна диссертационной работы Звоновой Е.А. определяется тем, что диссертантом впервые разработаны экспериментальные подходы для эффективного биосинтеза в бактериальной системе экспрессии (*E.coli*) рекомбинантного интерферона бета-1b, представляющего собой гибридную молекулу, состоящую из собственно целевого белка и неструктурированного белкового биополимера (ПАС). Оригинальность работы заключается в том, что при проектировании целевой белковой молекулы использованы различные методы компьютерного моделирования, позволившие предсказать некоторые важные характеристики создаваемой белковой молекулы с улучшенными фармакокинетическими показателями.

Для разработки экспериментальных подходов эффективного биосинтеза пролонгированной формы рекомбинантного интерферона бета-1b, синтезируемого в бактериальной системе экспрессии (*E.coli*), диссертантом создана серия генетических конструкций, включающих модифицированные нуклеотидные последовательности, кодирующие целевой белок и неструктурированный белковый полимер ПАС, а также серия векторов для экспрессии созданных рекомбинантных генов в бактериальной системе. Разработаны оптимальные условия

индуцибельной экспрессии созданных целевых генов, подобраны оптимальные условия при масштабировании процесса биосинтеза исследуемого целевого белка.

Важной частью оппонируемой диссертационной работы является раздел работ, связанный с выделением рекомбинантных белков из биомассы и их очисткой. На данном этапе автором применены современные методы высокоэффективной жидкостной хроматографии. В результате проведенных исследований диссертантом разработана схема выделения и очистки целевого рекомбинантного белка, представленного функционально-активным образцом с чистотой более 90% и незначительным содержанием эндотоксинов. С применением современных методов анализа диссертантом убедительно показано, что включение ПАС-последовательности к целевой белковой молекуле существенно увеличивает ее гидродинамический радиус.

Значительный интерес представляет часть работы, в которой приведены результаты исследований по изучению физико-химических и фармакокинетических характеристик полученного рекомбинантного белка, модифицированного присоединением неструктурированного белкового биополимера ПАС. Установлено, что модификация целевой белковой молекулы присоединением ПАС-последовательности увеличивает ее стабильность и положительно сказывается на биологической активности, что подтверждается экспериментами *in vitro*. В серии экспериментов *in vitro* также убедительно продемонстрировано, что добавление к целевой белковой молекуле интерферона бета-1b приводит к двукратному увеличению периода его полувыведения, что положительно сказывается на его фармакокинетических свойствах.

Полученные результаты могут быть полезны исследователям, работающим в области конструирования рекомбинантных белков медицинского назначения.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов. Во Введении диссертантом убедительно обоснована актуальность исследования, четко сформулированы цели и задачи, а также положения, выносимые на защиту. Основной раздел диссертации содержит описание полученных результатов исследования и их обсуждение. Написан хорошо, материал изложен логично, достаточно иллюстрирован. Обсуждение результатов проведено грамотно. Обоснованность полученных результатов обеспечена применением современной научно-методической базы, с использованием высокотехнологичных методов исследования и сертифицированного оборудования, при постановке экспериментов использовались адекватные контроли.

Достоверность результатов работы не вызывает сомнений. Сделанные выводы строго базируются на полученных результатах исследования и полностью им соответствуют.

По материалам диссертации представлено семь работ, три из которых представлены в журналах, входящих в список ВАК. Работа прошла апробацию на ряде российских и международных конференциях.

Структура и объем работы. Диссертация построена по традиционной схеме: состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа хорошо иллюстрирована, логически выстроена и четко изложена. Работа изложена на 128 страницах машинописного текста, включает 20 рисунков, 8 таблиц и Приложение. К диссертационной работе приложен список публикаций, включающий 182 источника, 179 из которых зарубежные.

Замечания.

В качестве замечаний следует отметить следующее:

1. Диссертантом мало уделено внимания анализу имеющихся сведений об использовании различных систем экспрессии для синтеза рекомбинантного интерферона бета-1b. Так, например, синтез рекомбинантного интерферона 1b человека в эукариотической системе экспрессии (клетки табака), отличной от клеток животных, также требует некоторой модификации целевой молекулы (Xu J, Tan L, Goodrum KJ, Kieliszewski MJ (2007) High-yields and extended serum half-life of human interferon 2b expressed in tobacco cells as arabinogalactan-protein fusions. *Biotechnol Bioeng* 97:997–1008. doi: 10.1002/bit.21407). Включение материалов в главу «Обзор литературы» с более детальным описанием систем экспрессии для наработки анализируемого целевого белка дал бы более глубокое представление о возможностях синтеза исследуемого рекомбинантного белка.
2. Имеются некоторые замечания, касающиеся отсутствия единообразия в обозначении целевой белковой молекулы, а также неструктурированного белкового биополимера (ПАС и PAS),

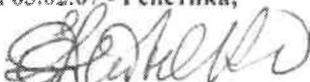
отсутствии значений температуры плавления для приведенных последовательностей олигонуклеотидов, отсутствии обозначений сайтов для эндонуклеаз рестрикции (Рисунок 10).

3. Полученный диссертантом результат, касающийся увеличения биологической активности модифицированной формы интерферона бета-1b (IFN β 1b-PAS), представляет несомненный интерес, в связи с чем возникает вопрос о причинах увеличения его активности по сравнению с не модифицированной формой.

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней.

В целом, диссертационная работа оставляет очень хорошее впечатление. Указанные незначительные недостатки не умаляют достоинств выполненной работы. Таким образом, считаю, что диссертационная работа Звоновой Елизаветы Александровны «Разработка биотехнологической платформы биосинтеза функционально активной пролонгированной формы интерферона бета-1b в бактериальной системе», полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Звонова Елизавета Александровна, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Дейнеко Елена Викторовна,
зав. лабораторией биониженерии растений,
доктор биологических наук по специальности 03.02.07 - Генетика,
профессор

 /Дейнеко Е.В./

Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН»
пр-т академика Лаврентьева, 10, 630090, Новосибирск
+7-913-740-8108
эл.почта: deineko@bionet.nsc.ru
28 марта 2019 г.

Подпись д.б.н., проф. Дейнеко Е.В. заверяю:

Орлова Галина Владимировна
Ученый секретарь
ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН»
кандидат биологических наук



/Орлова Г.В./