

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук Елены Игоревны Ярыгиной на диссертационную работу Звоновой Елизаветы Александровны на тему «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

Интерфероны представляют собой важный класс терапевтических белков. В частности, интерферон β -1b (IFN β -1b) обладает выраженным противовоспалительным свойством, а лекарственные препараты на его основе применяют в основном для лечения рассеянного склероза.

Однако, существующие на данный момент методики создания рекомбинантных IFN β -1b, имеют ряд существенных недостатков. Получаемые по описанным в литературе методикам интерфероны обладают недостаточной массой и коротким периодом полураспада, и такие препараты следует вводить в очень больших дозах. Попытки «утяжелить» молекулу при помощи ПЭГилирования *in vitro* также не позволяют получить IFN β -1b без недостатков.

Методика ПАСилирования IFN β -1b *in vivo* успешно апробирована для модификации целого ряда терапевтических белков: рекомбинантный Fab-фрагмент антитела (Трастузумаб) (Mendler et al., 2015); суперагонист интерферона I типа (Naragi et al., 2014); гормон роста человека (соматропин, hGH) (Binder et al., 2012); лептин (Morath et al., 2015); ингибитор C5-комплемента (Kuhn et al., 2016); эритропоэтин (Hedayati et al., 2017). Однако перечисленные препараты не внедрены в практику, так как находятся на различных этапах доклинических испытаний.

Работа Е.А. Звоновой посвящена актуальной проблеме, так как цель своей автор сформулировала следующим образом: «разработка экспериментальных подходов, перспективных для эффективного биосинтеза пролонгированной формы интерферона бета-1b в бактериальной системе экспрессии».

Для достижения поставленной цели перед диссертантом было поставлено 6 задач:

1. Сконструировать рекомбинантные гены, в которых ген IFN β 1b слит с последовательностью PAS, и вектора для экспрессии рекомбинантных генов в бактериях;

2. Подобрать оптимальные условия индуцибельной экспрессии рекомбинантных генов, в том числе и при масштабировании процесса биосинтеза;

3. Разработать методы выделения и очистки функционально активного целевого белка с использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии;

4. Провести сравнительный анализ физико-химических свойств рекомбинантного (IFN β 1b-PAS) и нативного IFN β 1b;

5. Провести сравнительный анализ функциональной активности рекомбинантного (IFN β 1b-PAS) и нативного IFN β 1b *in vitro*;

6. Провести сравнительное исследование фармакокинетических свойств рекомбинантного (IFN β -PAS) и нативного IFN β *in vivo*. Материалы, изложенные в диссертации, подтверждают, что автор справился с поставленными задачами.

Содержание работы

Представленная диссертационная работа построена по традиционному плану: изложена на 128 страницах и состоит из разделов «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Список литературы» и «Приложения». Работа иллюстрирована 8 таблицами и 20 рисунками. Список использованной литературы включает 182 источника, из них 179 на иностранном языке. В приложении представлены результаты секвенирования плазмиды pETm-IFN β 1b-PAS и плазмиды pETm-PAS-IFN β 1b.

В разделе «Введение» автор доказывает актуальность выбранной темы исследования, определяет цель и задачи исследований, формулирует её научную новизну, теоретическую и практическую значимость работы, выдвигает основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту, указывает степень достоверности работы, сообщает необходимые сведения публичных сообщений по теме работы, указывает структуру и объём диссертации.

Следует отметить, что материалы диссертационной работы были достаточно широко представлены научной общественности на конгрессе FEBS 2013 (Санкт Петербург, 2013), молодежном научном форуме «OPEN SCIENCE» (Гатчина, 2016), XXX Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2018), 18-ой научной конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2018).

«Обзор литературы» (глава I) составлен основательно, объективно, диссертант детально проанализировала литературные данные, характеризующие современное состояние вопроса.

В разделе 1.1 **«Интерферон бета – структура и свойства»** дана характеристика IFN β на молекулярном уровне, описаны системы экспрессии IFN β и подходы для оптимизации экспрессии IFN β -1b, механизм действия и биологическая активность интерферона β , в том числе терапевтические эффекты лекарственных препаратов на основе IFN β .

В разделе 1.2 описаны технологии улучшения фармакокинетических характеристик рекомбинантных терапевтических белков, такие как технология ПЭГилирования, применение рекомбинантных полипептидных ПЭГ-миметиков, гликозилирование, технология белок-белкового слияния.

В главе II **«Материалы и методы»**, представлены методы молекулярного клонирования, экспрессии рекомбинантных белков и фракционирования биомассы, выделения IFN β 1b-PAS из биомассы *E.coli*, физико-химическая характеристика препарата, а также методики определения антипролиферативной активности рекомбинантного IFN β 1b-PAS и фармакокинетики IFN β 1b-PAS200 при внутривенном, подкожном и внутримышечном введении на модельных животных.

В главе III **«Результаты и обсуждение»** в разделе 3.1 **«Дизайн молекулы IFN β -1b-PAS и конструирование экспрессионных векторов»** автором описаны результаты определения оптимального сайта присоединения последовательности ПАС к молекуле IFN β -1b. Сделано заключение, что N- и C-концевые области белка сближены и доступны для добавления ПАС-полипептида, содержащего 200 остатков Pro, Ala, и Ser, таким образом показана возможность формирования молекул, в целом, сохраняющих структурные мотивы нативного IFN β -1b.

В итоге диссертантом получено два варианта модифицированного интерферона бета для сравнительных экспериментов по экспрессии целевых белков в бактериальных штаммах: PAS-IFN β 1b и IFN β 1b-PAS. Это позволило на следующем этапе, используя плазмиду pET32(a+) (Novagen, США), сконструировать целевые плазмиды pETm-PAS-IFN β 1b и pETm-IFN β 1b-PAS.

Звонова Е.А. провела большую работу по сравнительной экспрессии вариантов ПАСилированного IFN β -1b в штаммах BL21 (DE3), Origami2 (DE3) и Shuffle T7 *E.coli*. В итоге оказалось, что в штамме Origami (DE3) продукция PAS-IFN β 1b достоверно выше, по сравнению со штаммами BL21 (DE3) и SHuffle T7, и штаммы BL21 (DE3) и Origami (DE3), но не SHuffle T7, обеспечивают высокий уровень экспрессии IFN β 1b-PAS. В связи с этим для

дальнейшей работы диссертант отобрала вариант IFN β 1b-PAS как наиболее перспективный.

Сравнение уровня продукции IFN β 1b-PAS в штаммах BL21 (DE3) и Origami2 (DE3) показало, что наиболее эффективная продукция IFN β 1b-PAS проходит в штамме BL21 (DE3) при температуре инкубации 30°C в течение 5 часов.

На следующем этапе Елизавета Александровна проводила работу по выделению и очистке экспрессируемого IFN β 1b-PAS. Показано, что максимальная сорбция целевого белка IFN β 1b-PAS отмечена на SP Sepharose с предколонкой Q Sepharose.

При изучении рекомбинантного IFN β 1b-PAS методом аналитической гель-эксклюзионной хроматографии (SEC) на носителе TSKgel G3000 автор выявила существенное увеличение гидродинамического радиуса. Одновременно с этим, корректность молекулярной массы и моодисперсный состав белка подтверждены масс спектрометрическим методом nanoLC-MS: молекулярная масса составила 36599 кДа.

Биологическую активность IFN β 1b-PAS *in vitro* диссертант оценивала в сравнении с коммерческим препаратом IFN β -1b (Betaferon, Bayer Schering Pharma AG, ФРГ) в антипролиферативном дозозависимом тесте с использованием клеточной линии лимфомы Биркитт человека (Daudi) – полученное значение IC₅₀ (0,271 нг/мл) в два раза ниже, чем для коммерческого IFN β -1b (0,524 нг/мл). Полученные данные позволили Звоновой Е.А. сделать вывод об отсутствии значимого негативного влияния ПАС-мотива на биологическую активность IFN β 1b.

Важным этапом диссертационной работы было определение стабильности и растворимости IFN β 1b-PAS. Автор в сравнительных исследованиях экспрессии IFN β 1b-PAS варианта показала наличие высокого процента продукции IFN β 1b-PAS в растворимой фракции при экспрессии в *E.coli*. Срок хранения данного препарата в PBS буфере, pH 7.4 составил 22 месяца при -20°C.

Диссертант также провела сравнительное исследование фармакокинетики IFN β 1b-PAS200 и препарата рекомбинантный IFN β 1b (Инфибета®) при однократном внутривенном введении в организм крыс. На основании полученных данных ею рассчитаны основные фармакокинетические параметры. Показано достоверное увеличение экспозиции целевого белка в системном кровотоке, что приводит к 2-кратному увеличению периода полувыведения с 1,08 ч до 2,03 ч, а также к 4-кратному уменьшению системного клиренса с 0,0291 (л/ч)/кг до 0,0071 (л/ч)/кг.

Биодоступность IFN β 1b-PAS200 Звонова Е.А. изучала на крысах при внутримышечном и подкожном способах введения препарата. Автор утверждает, что, несмотря на увеличение гидродинамического радиуса, добавление ПАС-полипептида не оказывает значимого влияния на биодоступность интерферона бета.

В заключение диссертант заявляет, что использование технологии ПАСилирования позволяет улучшить как биотехнологические, так и терапевтически важные характеристики IFN β 1b. Добавление ПАС-последовательности (200 а.о.) к IFN β 1b не только увеличивает растворимость, стабильность и биологическую активность IFN β -1b, но и положительным образом сказывается на ключевых фармакокинетических характеристиках, в частности, на времени экспозиции белка в системном кровотоке.

Научная новизна

Впервые разработаны экспериментальные подходы для эффективного биосинтеза в *E.coli* рекомбинантного интерферона бета-1b, слитого с неструктурированным белковым биополимером ПАС. Показано, что добавление ПАС-полипептида размером 200 аминокислот приводит к существенному увеличению гидродинамического радиуса молекулы, улучшает его стабильность и фармакокинетические свойства, не оказывая серьезного влияния на биологическую активность *in vitro*.

Практическая значимость работы состоит в том, что предложенная схема культивации и выделения IFN β 1b-PAS может послужить основой для разработки промышленного регламента производства лекарственного препарата интерферона бета пролонгированного действия.

Завершается диссертация шестью выводами, которые основаны на результатах выполненной работы.

В автореферате и семи опубликованных статьях отражено основное содержание работы.

Не смотря на высокую оценку работы, при ознакомлении с ее содержимым возникли вопросы и пожелания:

1. Отсутствует расшифровка аббревиатуры ПАС и PAS. Следовало бы использовать в тексте что-то одно.

2. На стр. 83-85 штаммы *E.coli* обозначены как BL21(DE3), Origami(DE3) и SHuffle T7 либо BL21(DE3), Origami2(DE3) и Shuffle. Почему обозначения разные? Какие верные?

3. Каков предполагаемый экономический эффект от внедрения разработанного препарата IFN β 1b-PAS?

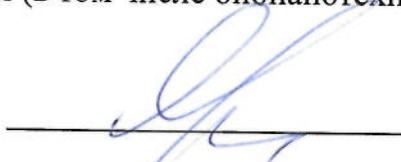
4. В тексте встречаются опечатки и неудачные выражения, огрехи форматирования.

Однако перечисленные выше вопросы и замечания не снижают положительной оценки настоящей работы.

Работа Звоновой Е.А. – научно-исследовательский труд, выполненный по чёткому плану на высоком методическом уровне с использованием самых современных методов, на большом экспериментальном материале, в нём отражены все основные аспекты изучаемой проблемы.

Таким образом, по актуальности проблемы, глубине её проработки, методическому уровню, научно-практической ценности полученных результатов, завершённости исследований и общему вкладу в теорию и практику работа Звоновой Елизаветы Александровны полностью отвечает требованиям и критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

профессор кафедры радиобиологии и
вирусологии имени академиков А.Д. Белова и В.Н. Сюрин
федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»,
доктор биологических наук,
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)



Елена Игоревна Ярыгина

Адрес: 109472, Россия, г. Москва, ул. Академика Скрябина, 23, тел.: 8 (495) 377-91-17, E-mail: jarigina@mail.ru

Подпись Е.И. Ярыгиной удостоверяю:
Учёный секретарь учёного совета федерального
государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Московская государственная академия
ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»
кандидат сельскохозяйственных наук




Сергей Сергеевич Маркин