



**федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и
микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

(ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)

123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

Тел: 8 499-193-30-01
Факс: 8 499-193-61-83

№ _____

<http://www.gamaleya.org>
E-mail: info@gamaleya.org

“УТВЕРЖДАЮ”

Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения «Национальный
исследовательский центр эпидемиологии и
микробиологии имени почетного академика
Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения
Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф.
Гамалеи»)

академик РАН, доктор биологических
наук, профессор
А.Л. Гинцбург



«26» марта 2019 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

ЗВОНОВОЙ Елизаветы Александровны на
тему: «Разработка биотехнологической платформы биосинтеза
функционально активной пролонгированной формы интерферона бета-
1b в бактериальной системе», представленной на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в
том числе бионанотехнологии).

Актуальность темы диссертационной работы

Технологии модификации структуры терапевтических рекомбинантных белков с целью улучшения их фармакологических свойств уже в течение нескольких десятилетий являются предметом пристального внимания ученых не только в прикладных исследованиях, но и с точки зрения фундаментальной науки. В значительной степени это связано с тем, что значительная часть рекомбинантных белков, обладая высоким терапевтическим потенциалом, на практике неспособна продемонстрировать требуемый эффект из-за ограниченной стабильности, высокой иммуногенности и быстрой элиминации из кровотока. На современном этапе большое распространение получили

технологии химической модификации терапевтических белков и пептидов. Данные технологии подтвердили свою эффективность по отношению к разнообразным объектам и стали основой для создания лекарственных средств, так называемого «следующего поколения». Вместе с тем, ученым стали очевидны принципиальные ограничения использования химической модификации, что послужило основой для поиска альтернативных подходов. Верификации одного из таких биотехнологических подходов посвящена диссертационная работа Звоновой Елизаветы Александровны. В качестве объекта в работе выбран хорошо изученный терапевтический рекомбинантный белок интерферон бета-1b человека. При этом, основными задачами диссертанта являлась разработка лабораторной технологии получения модифицированного интерферона бета, обладающего увеличенным временем экспозиции в кровотоке и изучение его физико-химических, биологических и фармакокинетических свойств с использованием современных биологических методов. Таким образом, диссертационная работа представляет собой актуальное исследование, результаты которого будут востребованы в биотехнологической отрасли.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа, изложена на 128 страницах и, в целом, описана по традиционной схеме. Работа включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, представление результатов и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 182 источника, из которых 179 – на иностранном языке.

После краткого введения, в котором определены цель и задачи исследования, проведен анализ доступных литературных источников по тематике изучаемой проблемы.

Обзор литературы (глава I) начинается с детального описания объекта исследования. В разделе 1.1. приведено описание актуальных сведений о структуре и механизме действия интерферона бета человека, системах экспрессии рекомбинантного интерферона бета, а также биологических и терапевтических эффектов лекарственных препаратов на его основе, включая подробный анализ данных клинических исследований. Раздел 1.2 посвящен рассмотрению технологических подходов, направленных на улучшение фармакокинетических характеристик рекомбинантных белков. Материал изложен в историческом аспекте и дает возможность проследить, как развивалось данное направления в научных центрах по всему миру. Автором детально проанализированы все технологические подходы, приведены сильные и слабые стороны каждого из них. В заключительной части обзора приведены обобщающие данные в виде таблицы со сравнением основных параметров всех рассмотренных технологий, что определило и позволило обосновать выбор технологии, использованной в диссертационной работе.

В целом обзор литературы написан хорошим языком, современен и касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы. Следует отметить, что все литературные данные анализируются соискателем квалифицированно и подробно, поэтому цель и задачи, поставленные автором работы, звучат вполне убедительно.

Традиционно после обзора литературы приводится описание материалов и методов исследования (глава II). В этой главе соискателем детально изложены методические особенности и приемы работы. Дано описание генно-инженерных методов, использованных для получения плазмидных векторов для экспрессии целевых молекул, методов культивации штаммов *E. coli*, а также разработанной методики выделения целевого белка. Представлен спектр физико-химических методов по определению молекулярной массы, гидродинамического объема и гомогенности полученного образца модифицированного интерферона бета. Изложены биологические методы по определению биологической активности целевого белка в условиях *in vitro*, а также представлено описание фармакокинетических исследований с использованием лабораторных животных.

Следует отметить вполне удовлетворительную разрешающую способность избранных для работы методов с учетом специфики проводимых исследований.

Глава III посвящена изложению результатов исследования и их обсуждению. Она включает шесть разделов, каждый из которых посвящен отдельной задаче исследования. Экспериментальная часть хорошо спланирована, что позволило решить поставленные в ходе работы задачи.

Первый раздел (3.1.) посвящен анализу трехмерной структуры молекулы интерферона бета-1b и планированию сайтов для присоединения ПАС-полипептида. Используемые методы *in silico* предсказания 3D-структур полипептидов, позволили идентифицировать два сайта для присоединения ПАС, которые были использованы в дальнейшем для создания генно-инженерных конструкций. Далее в разделе описано создание экспрессионных векторов, автором представлена наглядная схема последовательных стадий конструирования (рис.10). Для подтверждения корректности сборки векторных конструкций приведены результаты секвенирования по Сэнгеру.

Следующий раздел (3.2.), посвящен получению бактериальных продуцентов целевых белков и разработке методики их культивирования. На первых этапах исследования отмечена существенная разница между уровнем экспрессии двух вариантов модифицированного интерферона бета, которая впоследствии позволила отобрать конечный вариант целевой молекулы. Представляются интересными результаты серии экспериментов по подбору температурных условий культивации, в рамках которой исследовалась локализация экспрессируемого белка. В частности, понижение температуры культивации штамма Origami2(DE3) до 22°C приводило к повышению накопления белка в растворимой форме в цитоплазме. С другой стороны, наибольший выход целевого продукта наблюдался в штамме BL21(DE3) при температуре культивации 30°C с накоплением белка преимущественно в тельцах включения. Данные условия были выбраны как оптимальные для выделения, поскольку позволяют отделить белки *E. coli* на самых ранних этапах путем отделения телец включения.

В разделе 3.3. описана методика выделения IFN β 1b-PAS. Отмечено отсутствие сорбции белка на носителях, которые традиционно используют для хроматографической очистки интерферонов бета. Вследствие этого разработана методика очистки, позволившая получить образец белка высокой степени чистоты.

Раздел 3.4 посвящен анализу физико-химических свойств и биологической активности IFN β 1b-PAS. С использованием методов электрофореза в полиакриламидном геле и аналитической гель-эксклюзионной хроматографии установлено, что целевой белок обладает характеристиками глобулярного белка значительно большей молекулярной массы, чем расчетная молекулярная масса IFN β 1b-PAS. Автором выдвинута резонная гипотеза об увеличении гидродинамического объема целевой молекулы, которая успешно подтвердилась с помощью хромато-масс-спектрометрического определения корректной молекулярной массы. Биологическая активность целевого белка, измеренная *in vitro* с применением стандартного метода оценки активности препаратов интерферона бета, оказалась сопоставимой для IFN β 1b-PAS и коммерческого препарата Бетаферон. Более того, определение IC₅₀ позволило установить, что целевой белок почти в 2 раза (0,271 против 0,524 нг/мг) превосходит немодифицированный интерферон бета по активности.

В разделе 3.5. представлены результаты изучения стабильности IFN β 1b-PAS при длительном хранении. Показано, что ПАС-полипептид оказывает существенное стабилизирующее влияние на интерферон бета, благодаря которому целевой белок сохраняет свою стабильность в фосфатно-солевом буфере без внесения дополнительных компонентов.

Раздел 3.6. состоит из двух подразделов и включает результаты исследования фармакокинетических свойств целевой молекулы при введении крысам. Установлено значимое увеличение времени циркуляции и экспозиции IFN β 1b-PAS в системном кровотоке при внутривенном введении и сопоставимая биодоступность при подкожном и внутримышечном введении.

В разделе «Выводы» Елизавета Александровна Звонова хорошо обобщила полученные экспериментальные данные, обосновала основные положения работы, отметила возможность практического использования полученных результатов.

Оценка оформления диссертационной работы

Диссертационная работа Е.А. Звоновой, в целом, написана хорошим профессиональным языком, все экспериментальные данные представлены на 20 рисунках и в 8 таблицах.

Степень новизны результатов научных исследований.

В результате выполнения работы автором получен ряд новых данных, способных послужить основой для промышленной биотехнологической платформы биосинтеза интерферона бета-1b с улучшенными характеристиками. Так, впервые получена модифицированная форма интерферона бета-1b с присоединенным полипептидом ПАС, что позволило улучшить фармакокинетические свойства рекомбинантного интерферона бета. Кроме того, разработана лабораторная технология получения молекулы. Впервые показано что добавление ПАС-полипептида существенно увеличивает гидродинамический объем молекулы и, вследствие этого, увеличивает период полувыведения препарата. Установлено, что добавление неструктурированного полипептида не оказывает негативного влияния на биологическую активность интерферона бета при его присоединении в С-концевую область.

Научная и практическая значимость результатов

Диссертационная работа Елизаветы Александровны Звоновой совмещает в себе фундаментальность исследований и их практическую значимость. Полученные соискателем результаты важны для развития фундаментальных представлений о молекулярно-биологических механизмах функционирования терапевтических белков в системном кровотоке, а также возможностях регуляции продолжительности их циркуляции, в том числе с помощью, так называемых неструктурированных полипептидов. С практической точки, полученные данные по *in vitro* и *in vivo* характеристике препарата, а также показанное отсутствие негативного влияния на биологическую активность интерферона, могут быть использованы для создания лекарственных препаратов пролонгированного действия на основе рекомбинантных IFN β 1b. Научные положения исследований рекомендуется использовать в качестве учебного материала по дисциплинам: биотехнология, генетическая инженерия, молекулярная биология.

Обоснованность и вероятность заключительных выводов и рекомендации

Использование для исследований репрезентативной выборки образцов, применение классических микробиологических, биохимических и современных молекулярно-генетических и физико-химических методов подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе Е.А.Звоновой, а также выносимых на защиту выводов и положений.

Результаты диссертации рекомендуются для использования в научно-исследовательских учреждениях биотехнологического и образовательного профиля, занимающихся изучением способов модификации терапевтических белков, разработкой технологий культивации и выделения рекомбинантных белков для фундаментальных и практических исследований с получением коммерческой прибыли, а также и в

преподавательском процессе при чтении спецкурсов по генетике, биотехнологии и молекулярной биологии.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты исследований по диссертации Е.А. Звоновой опубликованы в 8 работах (в том числе 3 статьях в журналах, рекомендованных ВАК России). Результаты исследований апробированы на Российских и Международных конференциях. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

При критическом рассмотрении диссертационной работы возник ряд вопросов и замечаний:

1. В главе «Обзор литературы» приведено крайне мало сведений о системах экспрессии рекомбинантного интерферона бета. Поскольку значительная часть работы посвящена именно разработке системы экспрессии, обзор только выиграл бы, если бы данный предмет был раскрыт более детально.
2. В главе «Результаты и обсуждение» приведены последовательности олигонуклеотидов для сайт-специфического мутагенеза, но не указана температура плавления праймеров и программа ПЦР.
3. На рисунке 10 при схематическом изображении промежуточных конструкций рAPG-N и рAPG-C не указана локализация сайтов эндонуклеаз рестрикции *NdeI* и *NotI*, использованных для получения соответствующих фрагментов-вставок ДНК.
4. В тексте присутствует ряд неточностей в обозначении целевой молекулы: IFN β 1b-PAS, IFN β 1b-PAS200, IFN- β 1b-PAS.
5. Вызывает большой интерес полученные результаты измерения биологической активности *in vitro*. Чем может быть вызвано увеличение активности IFN β 1b-PAS по сравнению с немодифицированным интерфероном бета? Планируются ли дальнейшие исследования механизма действия данного феномена?
6. Представляется целесообразным более детальное изучение биологической активности целевой молекулы с использованием *in vitro* и *in vivo* тест-систем.

Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной работы, выполненной, в целом, на высоком научном и методическом уровне, и оставляющей хорошее впечатление.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Результаты представленной к защите диссертации свидетельствуют о высокой квалификации ее автора – Елизаветы Александровны Звоновой. Очевидно, что автором проделана большая работа. Все части исследования осуществлены и изложены в последовательности, отражающей логику реализации конечной цели всей работы – разработать технологию получения модифицированного интерферона бета-1b и изучить его физико-химические, биологические и фармакокинетические свойства. Диссертантом использованы современные и классические методы молекулярной биологии, биохимии и микробиологии. Е.А. Звонова в достаточной степени эрудированна, хорошо знакома с литературой по теме диссертации. Список использованной литературы составляет 182 работы, большинство из которых на английском языке. Следует отметить правильность выбранной стратегии исследования и высокий уровень исполнения, что положительно

характеризует самого исследователя. Все вышеизложенное свидетельствует о соответствии соискателя Е.А. Звоновой ученой степени, на которую она претендует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Звоновой Елизаветы Александровны на тему «Разработка биотехнологической платформы биосинтеза функционально активной пролонгированной формы интерферона бета-1b в бактериальной системе» является законченной научно-исследовательской работой, имеющей научно-практическое значение для решения вопросов в области биотехнологии. По актуальности темы, новизне результатов, их теоретической и практической значимости диссертационная работа соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Считаем, что автор Звонова Елизавета Александровна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории трансляционной биомедицины Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи») от «12» марта 2019 г., протокол № 1.

Руководитель лаборатории трансляционной биомедицины
НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи,
кандидат биологических наук

26 марта 2019

Подписано и завершено:

А. Макарян

Ткачук Артём Петрович



НАЧАЛЬНИК
ОТДЕЛА КАДРОВ
СЕКУНОВА
НАТАЛЬЯ ВЛАДИМИРОВНА

Н.В. Секунова