

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации **Пошихонцевой Вероники Юрьевны** «Биосинтез макроциклического поликетиды такролимуса штаммами *Streptomyces tsukubaensis*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнология)

Рост частоты онко- и аутоиммунных заболеваний, дерматозов и т.д. усиливает важность доступности высокоактивных иммуносупрессорных препаратов нового поколения, к числу которых относится такролимус.

В настоящее время получение лекарственных субстанций данного макролида основано на способности определенных природных, мутантных и генетически модифицированных штаммов рода *Streptomyces* осуществлять биосинтез такролимуса. В большинстве случаев промышленным штаммам присущ низкий уровень синтетической активности и высокая фенотипическая изменчивость, также наблюдается образование широкого круга побочных продуктов, деградация целевого соединения, сложность процедуры его выделения из богатой питательной среды с обеспечением необходимой чистоты. Согласно Государственному реестру лекарственных средств на территории Российской Федерации отсутствует производство лекарственной субстанции такролимуса (ЛС), в настоящее время зарегистрированы ЛС производства Индии, Чешской республики и Словении (<https://grls.rosminzdrav.ru>, дата обращения 21.04.2021)

Перечисленное выше обуславливает актуальность диссертационной работы Пошихонцевой В.Ю., которая определила цель исследования – изучение особенностей биосинтеза ценного фармацевтического препарата такролимуса и создание эффективного биотехнологического способа его получения.

При выполнении диссертационного исследования использованы не только классические микробиологические, биохимические подходы, но и современные молекулярные методы, такие как полногеномное секвенирование с аннотацией генома и секвенирование 16s рРНК с последующим филогенетическим анализом.

Научная новизна исследования и полученных выводов, сформулированных в работе, заключается в том, что автором на основе культурально-морфологических, физиолого-биохимических, хемотаксономических особенностей охарактеризованы два новых штамма-продуцента такролимуса, исследована их фенотипическая изменчивость, определены условия селекции высокопродуктивных диссоциантов. Проведен анализ генома штамма *Streptomyces tsukubaensis* ВКМ Ас2618 Д, для которого характерна наиболее высокая биосинтетическая активность, подтверждена его видовая принадлежность. Расшифровка

генома выявила наличие кластера из 26 генов биосинтетического пути такролимуса, идентичного набору генов ряда других штаммов-продуцентов рода *Streptomyces*.

Исследован широкий спектр физических и микробиологических факторов, обеспечивающих максимальный уровень содержания макролида, включая обогащение среды биомассой низших эукариот (дрожжей и мицелиальных грибов), крахмалами различной природы и структур, при нейтральном pH среды, степени аэрации не менее 30%, температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Проблема деградации целевого соединения решена путем ведения процесса в присутствии полимерных сорбентов, что обеспечило 10-ти кратное увеличение содержания целевого продукта.

Практическую значимость имеет разработанная и апробированная по результатам исследования технология получения такролимуса микробиологическим способом в лабораторном биореакторе. Нельзя не отметить, что в основе метода выделения и очистки до кристаллического продукта фармакопейной чистоты лежит оригинальный подход на основе использования селективного сорбента, который характеризуется не только относительной простотой исполнения, но и обеспечивает получение лекарственной субстанции такролимуса с чистотой 99,8%.

Достоверность результатов и сформулированных положений и выводов подтверждена достаточным объемом полученных данных, которые были подвергнуты корректной статистической обработке и подробному анализу. Задачи исследования определены конкретно, сформулированы четко, отражают основные этапы исследования и позволяют достичь поставленной цели. Выводы грамотно сформулированы и адекватны цели и задачам исследования и вытекают из полученных автором материалов.

По теме диссертации опубликовано 7 статей в отечественных и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК. Материалы работы обсуждены на российских и международных конференциях. Получен патент на изобретение.

Автореферат построен по традиционному плану, существенных замечаний по содержанию и оформлению нет. При прочтении возникли некоторые вопросы и рекомендации, не носящие принципиального характера:

1. Поскольку коммерческие наборы тестов API ZYM, использованные диссертантом в работе для выявления биохимических свойств, основаны на метаболической активности микроорганизмов, которая влечет изменение цвета лунок стрипов, то использование таких формулировок как «высокая эстеразная, лейцин-ариламидазная активность» представляется не совсем оправданным, поскольку данные тест-системы являются прежде всего качественными и не позволяют судить об уровне активности ферментов.

2. При отображении основных параметров биосинтеза такролимуса в ферментерах на рис. 16 целесообразно было бы на первой оси ординат указать содержание такролимуса в культуральной среде вместо перемешивания или в подписях к рисунку 16 указать конкретный № ферментации. В представленном варианте оформления рисунка сложно соотнести фактическую концентрацию FK-506, достигнутую в ходе масштабирования технологии.

3. Так как в заключении автор указывает, что «При изучении диссоциации штамма..... выявлены критерии селекции его наиболее активных диссоциантов...», то в тексте автореферата следовало четко описать критерии селекции, что вероятно и было сформулировано в тексте самой диссертации.

Заключение:

Диссертация Пошихонцевой В.Ю. соответствует требованиям ВАК РФ, изложенным в п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ № 335 от 21.04.2016, № 748 от 02.08.2016, № 650 от 29.05.2017, № 1024 от 28.08.2017, № 1168 от 01.10.2018, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Пошихонцева Вероника Юрьевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнология).

Отзыв составлен:

старший научный сотрудник
ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора,
кандидат биологических наук

Егорова Ольга Валерьевна

Подпись Егоровой О.В. заверяю:

Ученый секретарь
ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора,
доктор медицинских наук, профессор

Жукова В.В.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН «ФНЦГ им. Ф.Ф. Эрисмана» Роспотребнадзора)
141014, Московская область, городской округ Мытищи, город Мытищи, ул. Семашко, д. 2
Тел.: +7(495)586-11-44, факс +7(495)582-92-94
e-mail: fnccg@fferisman.ru <http://fferisman.ru>