

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет»



Н.И. Прокопов

2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет»

Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Москва, о научно-практической значимости диссертации Тимоновой Софьи Сергеевны, выполненной на тему: «Создание высокопродуктивных моноклональных клеточных линий, экспрессирующих активные рекомбинантные лизосомальные ферменты арилсульфатазу В и идуронат-2-сульфатазу», на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология

Актуальность темы диссертации

Мукополисахаридоз (МПС) – группа орфанных генетических заболеваний, вызванных отсутствием или неправильным функционированием лизосомальных ферментов, необходимых для расщепления гликозаминогликанов. В случае заболевания МПС II и МПС VI типов в организме наблюдается недостаточность лизосомальных ферментов идуронат-2-сульфатазы и арилсульфатазы В. МПС II является наиболее распространённой формой. Дисфункция работы данных ферментов проявляется накоплением преимущественно дерматансульфата в лизосомах, что постепенно приводит к задержке роста, выраженным скелетным деформациям, патологиям сердечно-сосудистой системы и т. п.

К настоящему моменту в РФ нет собственных биопрепаратов на основе рекомбинантных лизосомальных ферментов идуронат-2-сульфатазы и арилсульфатазы В, которые могли бы быть использованы для лечения пациентов с данным диагнозом в ферменто-заместительной терапии МПС II и МПС VI типов. Препараты «Наглазим» (Naglazyme®, BioMarin, США) и «Элапраза» (Elaprase®, Shire, США) недоступны на территории РФ.

Создание отечественных биофармацевтических препаратов является актуальной задачей для фарминдустрии в РФ. Разработка препаратов для ФЗТ МПС II и VI типов позволит: обеспечить пациентов высококачественным доступным препаратом; существенно снизить нагрузку на федеральный бюджет, который закупает импортные препараты «Наглазим» и «Элапраза» для больных МПС II, VI; получить высокотехнологичные отечественные рекомбинантные биопрепараты ферментов идуронат-2-сульфатазы и арилсульфатазы В на основе клеточной линии млекопитающих СНО без использования белков животного происхождения.

Научная новизна исследования

В ходе работы диссертантом Тимоновой С.С. созданы стабильные высокопродуктивные моноклональные клеточные линии-продуценты рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В за счет коэкспрессии вспомогательного формилглицин генерирующего фермента и идуронат-2-сульфатазы; разработана технология суспензионного культивирования продуцентов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы для последующего использования в промышленном производстве; Продуктивность клеточных линий-продуцентов варьирует от 300 до 400 мг/л активных ферментов.

Значимость полученных результатов для науки и практической деятельности

В ходе выполнения диссертационной работы Тимоновой С.С. были получены клоны-продуценты рекомбинантных лизосомальных ферментов

арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы использованные в организации производства лекарственных препаратов для ферментной заместительной терапии МПС II и VI типов:

1. Данные, полученные в ходе исследований, включены в Паспорт главного банка клеток и в опытно-промышленный регламент ОПР №9761464-88-21 для производства фармацевтической субстанции на основе идуронат-2-сульфатазы.

2. Разработанная технология получения и культивирования продуцентов идуронат-2-сульфатазы и арилсульфатазы В, потенциальных биоаналогов препаратов «Наглазим» и «Элапраза», использована при наработке серий фармацевтических субстанций для проведения доклинических и клинических испытаний.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов диссертации

Методологической базой исследования Тимоновой С.С. являлись работы в области молекулярной и клеточной биологии, разработке и оптимизации условий культивирования клеточных линий-продуцентов, особенности строения лизосомальных ферментов и т.д.

В работе использованы молекулярные методы – создание экспрессионных векторов, несущих гены целевых ферментов ARSB, SUMF1, IDS; измерение уровня мРНК гена ARSB нормализованного на уровень генов домашнего хозяйства с помощью ПЦР в реальном времени; биотехнологические методы – работа с культурами клеток на основе линии CHO, проведение трансфекций, получение моноклональных клеточных линий продуцентов целевых ферментов, проведение оптимизации условий культивирования линий продуцентов, работа с роботизированными системами для получения клеточных линий продуцентов в формате минибиореакторов, изучение стабильности ростовых и продукционных характеристик промышленных клонов-продуцентов; биохимические, физико-химические и иммунохимические методы – проведение иммуноферментного анализа для

определения концентрации рекомбинантного целевого белка в культуральной жидкости, проведение электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и 2-меркаптоэтанола, вестерн-блот и дот-блот анализы, хроматографическая очистка целевых ферментов, определение специфической активности полученных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы;

Результаты, полученные в ходе исследования, должным образом зарегистрированы и статистически обработаны.

Оценка структуры, содержания, соответствия требованиям, предъявляемым к диссертациям

Диссертация содержит следующие основные разделы: Введение, Обзор литературы, Описание материалов и методов, Результаты исследований и их обсуждение, Заключение, Выводы и Список цитируемой литературы, включающий 154 англоязычных источника. Диссертация изложена на 141 страницах машинописного текста и содержит 15 таблиц и 33 рисунка.

По теме диссертации опубликовано 4 научные работы, в том числе 3 - в журнале, рекомендованном ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, и 1 патент на изобретение.

Содержание работы соответствует теме диссертации, выводы согласуются с поставленными задачами, содержание автореферата соответствует положениям диссертации.

Рекомендации по использованию результатов диссертации

Разработанные стабильные моноклональные клеточные линии и технология их культивирования могут быть использованы на производстве для получения фармацевтической субстанции рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы для терапии против МПС II и VI типов. Способ получения продуцентов с помощью коэкспрессии основного и вспомогательных белков можно использовать при разработке рекомбинантных иных белковых препаратов.

Вопросы и замечания к диссертационной работе:

1. Некоторые рисунки или графики представлены в плохом качестве, например, стр.67, рис. 15 - Уровень OD и pH во время культивирования на роботизированной системе минибореакторов ambr® 15 cell culture Ambr Tap Biosystems.

2. Обзор литературы содержит разделы, которые не используются и не обсуждаются в работе, например, стр. 21 - Функция маннозо-6-фосфатных остатков у лизосомальных ферментов подкласса сульфатаз

3. Не ясно на каком оборудовании был получен финальный промышленный клон продуцент арилсульфатазы В на роботизированной системе Clone Pix или Cell Metrik. Существует ли разница при использовании того или иного оборудования.

Отмеченные замечания и вопросы в целом не влияют на положительную оценку диссертационной работы, имеющую важное прикладное значение для разработки лекарственных средств.

Заключение

Диссертационная работа Тимоновой Софьи Сергеевны «Создание высокопродуктивных моноклональных клеточных линий, экспрессирующих активные рекомбинантные лизосомальные ферменты арилсульфатазу В и идуронат-2-сульфатазу» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной для отечественного здравоохранения задачи – разработка высокопродуктивных моноклональных клеточных линий-продуцентов активных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы для получения белковых лекарственных препаратов.

По актуальности избранной темы, объему и методическому уровню проведенных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов данная работа соответствует требованиям пунктов 9-10 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ от 24.04.2016 г. № 335,

от 02.06.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Тимонова Софья Сергеевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология.

Отзыв и диссертационная работа Тимоновой Софьи Сергеевны рассмотрены, обсуждены и одобрены на заседании кафедры биотехнологии и промышленной фармации РТУ МИРЭА, протокол № 13 от «27» июня 2022 г. На заседании присутствовало 14 чел. В обсуждении приняли участие: проф. Кедик С.А., проф. Костров С.В., проф. Демидюк И.В., доц. Кириллова Ю.Г., доц. Шаталов Д.О., доц. Грамматикова Н.Э., доц. Пшеничникова А.Б., доц. Панов А.В., доц. Матвеев А.В.

Доктор химических наук, профессор РАН

И.В. Демидюк

Секретарь кафедры биотехнологии и промышленной фармации,
доцент, кандидат химических наук

Н.С. Шастина

Подписи Демидюка И.В. и Шестиной Н.С. заверяю
Начальник отдела Управления кадров



В.В. Сазикова

Сведения о ведущей организации:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Адрес: 119454, Москва, Пр-т Вернадского, 78

Тел.: +7(499) 215 65 65 доб. 1140

Электронная почта: mirea@mirea.ru

Сайт: <http://www.mirea.ru>