

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Игнатъева Георгия Михайловича на диссертацию **Тимоновой Софьи Сергеевны** «Создание высокопродуктивных моноклональных клеточных линий, экспрессирующих активные рекомбинантные лизосомальные ферменты арилсульфатазу В и идуронат-2-сульфатазу», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Актуальность темы

Мукополисахаридоз (МПС) – группа орфанных генетических заболеваний, вызванных отсутствием или неправильным функционированием лизосомальных ферментов, необходимых для расщепления гликозаминогликанов (ГАГ) (мукополисахаридов). Каждый тип МПС характеризуется дефицитом лизосомального фермента, дисфункция которого влияет на один из этапов деградации ГАГ в клетке. Это приводит к постепенному накоплению нерасщепленных продуктов метаболизма в тканях и органах. Все виды МПС наследуются по аутосомно–рецессивному типу, кроме МПС II. МПС II наследуется по X–сцепленному рецессивному типу. Вследствие мутации гена IDS происходит недостаточность лизосомального фермента идуронат-2-сульфатазы (I2S). Дисфункция данного фермента приводит к накоплению гликозамингликанов в тканях и органах. МПС II является наиболее распространённой формой заболевания. МПС VI типа наследуется по аутосомно-рецессивному типу, и вызван нарушением функции фермента арилсульфатазы В (ASB). Дисфункция гена ARSB проявляется в накоплении преимущественно дерматансульфата в лизосомах, что постепенно приводит к задержке роста, выраженным скелетным деформациям, патологиям сердечно-сосудистой системы. Стандартное лечение мукополисахаридоза как II так и VI типов, утверждённое Минздравом Российской Федерации, предусматривает использование

ферментной заместительной терапии импортными препаратами «Элапраза» (Elaprase®, Shire, США) и «Наглазим» (Naglazyme®, BioMarin, США) .

Таким образом разработка технологии получения моноклональных клеточных линий-продуцентов активных рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы, и оптимизацию условий их культивирования является важным этапом получения собственных препаратов для лечения мукополисахаридоза, а значит – импортозамещения и лекарственной безопасности страны.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций обеспечена анализом имеющейся по теме диссертации литературы, молекулярно-биологических, биотехнологических, статистических методов и репрезентативным числом проведенных исследований.

Все изложенное позволяет считать результаты диссертационного исследования достоверными, а выводы обоснованными, соответствующими поставленным задачам.

Научная новизна

При выполнении работы впервые в РФ созданы стабильные высокопродуктивные моноклональные клеточные линии-продуценты: рекомбинантного лизосомального фермента арилсульфатазы и рекомбинантного лизосомального фермента идуронат-2-сульфатазы. Полученные продуценты культивируют в суспензионных условиях. Методология и подходы, использованные при выполнении работы, а именно связанные с созданием биофармацевтических препаратов на основе СНО, могут быть применены при разработке других биотехнологических процессов производства рекомбинантных белков медицинского назначения, в частности, в получении любых других ферментов подкласса сульфатаз.

Практическая значимость

На основании разработанного способа получения клеточных линий-продуцентов рекомбинантного лизосомального фермента арилсульфатазы В выдан патент на изобретение RU2020107533А «Клетка, продуцирующая с

высокой эффективностью активный белок арилсульфатазу В, и способ получения этой клетки».

Полученные клоны-продуценты рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы использованы в организации производства лекарственных препаратов для ферментной заместительной терапии против МПС II и VI типов. Результаты работы включены в Паспорт главного банка клеток и в опытно-промышленный регламент ОПР №89761464-88-21 для производства фармацевтической субстанции на основе идуронат-2-сульфатазы.

По отработанной технологии проведена наработка серий фармацевтических субстанций биоаналогов идуронат-2-сульфатазы и арилсульфатазы В для доклинических и клинических испытаний

Оценка содержания диссертации, ее завершенности, подтверждение публикаций автора

Диссертация построена по традиционной схеме, изложена на 141 странице, состоит из введения, главы литературного обзора, Основной части – включающей главу методология и методы исследования, главу «Разработка моноклональных клеточных линий и технологии их культивирования для промышленного производства рекомбинантного активного фермента идуронат-2-сульфатазы», главу «Получение моноклональных клеточных линий рекомбинантного фермента арилсульфатазы В», главу «Разработка высокопродуктивных моноклональных клеточных линий, коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин генерирующий ферменты и технологии их культивирования для промышленного производства рекомбинантного активного фермента арилсульфатазы В», главу «Исследование стабильности экспрессионных и ростовых характеристик клонов-продуцентов идуронат-2-сульфатазы и арилсульфатазы В», Заключение, Выводов, Рекомендаций по использованию результатов диссертационного исследования, Терминов, приложения, списка литературы и благодарностей.

Работа иллюстрирована 15 таблицами, 33 рисунками. Список литературы включает 154 источника, все иностранные.

В общей характеристике работы обоснована актуальность темы исследования, определены цель, задачи диссертационной работы, методология проведенного исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту, научная новизна и практическая значимость работы, описана апробация результатов исследования, их внедрение.

В Обзоре научной литературы представлен анализ современной научной литературы отражающий характеристику мукополисахаридоза, отдельно мукополисахаридоз II и VI типов, способы терапии, описание технологий производства рекомбинантных белков, прежде всего - клеточных линий-продуцентов. Отдельный раздел Литературного обзора посвящен разработке стабильных моноклональных клеточных линий-продуцентов рекомбинантных белков на основе клеточной линии СНО.

Обзор хорошо и доступно представляет анализ имеющейся научной литературы по теме диссертации, в нем присутствует авторская оценка материалов и их связь с результатами, полученным непосредственно самим автором. Проведенный автором анализ имеющейся по теме диссертации литературы подтверждает ее актуальность.

Глава методология и методы исследования написан четко и информативно. Стиль подачи информации свидетельствует о том, что автор полностью владеет методами, которые описывает. В разделе представлены использованные автором материалы, клеточные линии, растворы и питательные среды, использованное оборудование. Методы описаны достаточно подробно и могут быть воспроизведены.

Раздел результатов собственных исследований представлен четырьмя главами. Одна из них (Глава 3) содержит результаты разработки моноклональных клеточных линий и технологии их культивирования для промышленного производства рекомбинантного активного фермента индуран-2-сульфатазы. В главе убедительно и наглядно представлены

исследования получения высокопродуктивных моноклональных клеточные линии рекомбинантного фермента идуронат-2-сульфатазы на основе суспензионной культуры клеток СНО. Подобраны и обоснованы условия культивирования, позволяющие получить высокую продуктивность - до 300 мг/л активного фермента. Удельная активность целевого фермента сопоставима с рекомбинантным коммерчески доступным препаратом идурсульфазы «Элапраза». Полученные клеточные линии-продуценты могут быть использованы в дальнейшей разработке технологии производства лекарственного препарата на основе рекомбинантной идуронат-2-сульфатазы для ферментозаместительной терапии мукополисахаридоза II типа. Результаты работы опубликованы в статье.

Глава 4 содержит результаты получения моноклональных клеточных линий рекомбинантного фермента арилсульфатазы В. В главе представлены результаты получения моноклональных клеточные линии рекомбинантного фермента арилсульфатазы В на основе суспензионной клеточной линии СНО. Подобраны и обоснованы условия культивирования, позволяющие получить высокую продуктивность. Показано, что добавление в ростовую среду сульфата меди положительно влияет на продуцентов арилсульфатазы В, значительно повышая выход целевого фермента. Проведена котрансфекция клеточных линий-продуцентов арилсульфатазы В генетической конструкцией, кодирующей формилглицин генерирующий фермент. Полученные результаты позволят решить проблему низкого выхода рекомбинантной лизосомальной сульфатазы и будут способствовать разработке высокопродуктивной клеточной линии-продуцента фермента арилсульфатазы В.

В Главе 5 представлены результаты получения высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов рекомбинантного фермента арилсульфатазы В, коэкспрессирующие целевой фермент арилсульфатазу В и вспомогательный формилглицин генерирующий фермент. Результаты демонстрируют технологические подходы позволившие увеличить выход

активного фермента арилсульфатазы В. Полученный клон–продуцент и разработанные условия культивирования могут быть использованы для производства лекарственного препарата для ферментозаместительной терапии против мукополисахаридоза VI типа. Результаты работы отражены в публикации и полученном патенте.

Глава 6 посвящена исследованию стабильности экспрессионных и ростовых характеристик клонов-продуцентов идуронат-2-сульфатазы и арилсульфатазы В. Полученные результаты крайне важны для производства рекомбинантных препаратов. Результаты свидетельствуют о том, что ростовые и продукционные показатели остаются стабильными на протяжении 60-ти генераций.

Заключение диссертационной работы основано на обсуждении результатов изучаемой проблемы в контексте с имеющимися в литературе данными. Выводы, сделанные автором в итоге проведенной работы, полностью основываются на представленном материале.

Степень достоверности и апробация результатов этой комплексной работы не вызывает сомнений. Все полученные в ходе исследования экспериментальные данные хорошо представлены – по материалам диссертационного исследования получен патент РФ и опубликовано 3 научных работы, все - в журналах, рекомендованных ВАК. Материалы работы были представлены на двух научных конференциях. Автореферат и опубликованные работы в полной мере отражают содержание диссертации, поставленные цели и задачи.

Вопросы и замечания

Оценивая представленную работу в целом положительно есть ряд вопросов, которые требуют уточнения:

1. Описывая актуальность проблемы, автор в таблице 2 указывает число больных МПС II и VI типов в РФ и затраты на этих больных. Поскольку в Списке литературы нет ссылок на российских авторов, необходимо пояснить источник этих данных.

2. В описании использованных материалов желательно было указать источник получения рестриктаз.
3. Раздел 1.5. в Главе 1: Литературный обзор, безусловно, имеет авторский стиль, только три ссылки на источники. Этот раздел был бы более уместен в результатах собственных исследований, тем более, что соискатель очень хорошо изложил технологию разработки линий клеток-продуцентов рекомбинантных белков.

Тем не менее, сделанные замечания не носят принципиального характера и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Тимоновой Софьи Сергеевны «Создание высокопродуктивных моноклональных клеточных линий, экспрессирующих активные рекомбинантные лизосомальные ферменты арилсульфатазу в и идуронат-2-сульфатазу», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой, на основе выполненных автором исследований, решена задача получения стабильных высокопродуктивных моноклональных клеточных линий-продуцентов рекомбинантного лизосомального фермента арилсульфатазы В и рекомбинантного лизосомального фермента идуронат-2-сульфатазы, важная для Биологической отрасли науки. С использованием полученных автором продуцентов разработана технология суспензионного культивирования продуцентов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы для последующего использования в промышленном производстве.

Диссертация и автореферат полностью соответствуют критериям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017

№ 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сама автор, Тимонова Софья Сергеевна, по совокупности представленных ею материалов, актуальности темы выполненной диссертации, научно-практической значимости и ценности полученных результатов, личному вкладу, достойна присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент: доктор медицинских наук, профессор старший научный сотрудник
Федерального бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»,

Игнатьев Георгий Михайлович

Почтовый адрес: 105064, Российская Федерация, г. Москва, Малый Казенный переулок дом 5а

e-mail: marburgman@mail.ru

Подпись д.м.н., профессора Г.М. Игнатьева заверяю

Директор ФБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН

20.09.2022



Свитич Оксана Анатольевна