

ОТЗЫВ

официального оппонента, кандидата биологических наук Купцова Василия Николаевича, на диссертационную работу Ворониной Екатерины Владимировны «Разработка технологии получения моноклонального антитела к фактору некроза опухолей альфа в целях биофармацевтического производства», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Диссертационная работа Ворониной Екатерины Владимировны посвящена созданию высокопродуктивного стабильного клона-продуцента и технологии его культивирования для синтеза полностью гуманизированного моноклонального антитела адалимумаб - ингибитора фактора некроза опухоли альфа, предназначенного для терапии целого ряда аутоиммунных и хронических воспалительных заболеваний у взрослых и детей со схожей этиологией. Адалимумаб – это препарат №1 на основе моноклональных антител по объемам продаж во всем мире и успешно применяется в клинической практике благодаря ряду преимуществ перед другими аналогами своей группы.

Актуальность рассматриваемый темы не поддается сомнению и определяется в рамках требований Положения о порядке присуждения ученых степеней. Во-первых, следует отметить, что производство генно-инженерных иммунобиологических препаратов – одно из передовых направлений развития промышленной биотехнологии в настоящее время. Во-вторых, разработка технологии получения отечественного жизненно необходимого и важнейшего лекарственного препарата с использованием новых высокотехнологичных подходов является неоспоримо востребованной задачей в рамках реализации стратегии снижения импортозависимости в сфере российского здравоохранения, обеспечивающей необходимый объем гарантированной государством медицинской помощи населению.

Обретение новых практических знаний и рекомендаций в области разработки суспензионного культивирования эукариот в промышленных

масштабах, а также в области оптимизации технологии с целью увеличения количества продукта и его качества однозначно выступает доказательством новизны всей научной разработки. Полученная высокопродуктивная клеточная линия, стабильно продуцирующая моноклональное антитело адалимумаб, депонирована в Национальном биоресурсном центре - Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов, что гарантирует сохранность и регулируемую доступность охарактеризованного продуцента для широкого круга промышленных, исследовательских, контрольных и учебных организаций. Автором впервые получены результаты сравнения эффективности технологии культивирования полученной клеточной линии и качества производимого продукта в трех типах биореакторов с разным перемешиванием, что подтверждено публикациями и представляет чрезвычайный практический интерес в сфере биофармацевтической отрасли в рамках разработки высокоэффективных технологий культивирования суспензионных культур клеток. Особенностью диссертационной работы является разработка оригинальных подходов для оптимизации профиля гликозилирования полученного моноклонального антитела. Автором впервые установлено влияние содержания маннозного гликана Man5 на эффекторные функции моноклонального антитела, а именно показана зависимость между эффективностью связывания антитела с рецептором FcγRIIIa (CD16a) и количеством именно этого гликана в молекуле моноклонального антитела. Кроме того, автором предложены различные схемы оптимизации условий культивирования продуцента для увеличения количества и качества продукта методами сочетания широкого ряда сред и подпиток, что также подтверждено публикациями и является обоснованием научной новизны. Применение данных подходов позволило сформировать перспективную технологию получения моноклонального антитела адалимумаб с высокими производительностью и качеством продукта, сохраняя при этом низкие эксплуатационные затраты, и тем самым обеспечило несомненную практическую значимость диссертационной работы.

Диссертация Ворониной Е.В. написана на 222 страницах печатного текста и содержит введение, обзор литературы, экспериментальную часть, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы, включающий 262 источника, из них 223 зарубежных авторов. Материалы диссертации содержат 21 таблицу и 55 рисунков.

В начале диссертации автор четко определяет проблематику и актуальность исследования, поставленную задачу работы, ее новизну, практическую значимость, достоверность полученных результатов, положения выносимые на защиту, а так же приводит данных о публикации результатов исследования и их апробация.

В диссертации представлен обзор литературных данных, освещающих широкий круг вопросов и проблем, связанных с экспериментальной частью диссертации. Теоретический материал структурирован грамотно. Автор демонстрирует не только глубину анализа работ в рамках касающихся темы вопросов, но и глубину ориентации в периодических изданиях по различной проблематике работы. Начиная с понимания роли фактора некроза опухоли альфа в норме и патологии, Воронина Е.В. рассматривает преимущества и недостатки существующих терапевтических моноклональных антител к ФНО-альфа, приводит обзор современных тенденций в разработке технологий получения биофармацевтических препаратов, которые активно использует в своей работе. Наряду с этим, подробно изучены современные подходы генной инженерии для создания стабильных продуцентов моноклональных антител и основные аспекты оптимизации технологии культивирования суспензионных культур. Кроме того, Ворониной Е.В. описаны существующие режимы и аппаратное оформление процессов культивирования клеток СНО, где автор проводит сравнительный анализ и обоснование выбора своей стратегии разработки технологии в рамках решения задач диссертационной работы.

Содержание главы «Материалы и методы» свидетельствует о высоком методическом уровне работы, которая выполнена с применением современных молекулярно-генетических, микробиологических, биохимических и

культуральных методов, которые изложены подробно, что говорит об их легкой воспроизводимости.

Глава «Результаты исследований» состоит из шести разделов, в которых последовательно изложены результаты, полученные на каждом этапе работы. Глава представляет большой массив интересных и во многом приоритетных научных данных, однако диссертационная работа не свободна от недостатков. На мой взгляд, изложение статистической составляющей проведено в недостаточном объеме и несколько упрощено. Автором были проделаны длительные рутинные эксперименты в рамках селекции клонов-продуцентов, в подтверждение чего легко найти в диссертации описание сравнительного анализа полученных результатов, сведенных в таблицы, но без адекватной многофакторной статистической оценки. Отсутствие таковой вызвало сложности восприятия логики автора на некоторых промежуточных этапах селекции клонов. Несмотря на это, одна из основных задач, а именно получение хорошо масштабируемой стабильной и высокопродуктивной клеточной линии, была успешно решена.

Важно отметить актуальную и значимую с практической точки зрения часть работы Ворониной Е.В., посвященной определению и оптимизации качественных характеристик продукта, моделируемых на этапах культивирования. Автором были предложены эффективные схемы коррекции маннозных гликанов и степени галактозилирования в молекуле моноклонального антитела адалимумаб, что может послужить востребованным решением практических задач на этапах разработки технологий производства современных высокоэффективных лекарственных препаратов на основе моноклональных антител.

Наряду с вышеуказанным стоит отметить, что в диссертационной работе не отражена важная часть разработки технологии получения биофармацевтического продукта, а именно выделение, очистка и получение готовой лекарственной формы моноклонального антитела адалимумаб. В

результате чего, можно сказать, что тема диссертации выбрана не очень удачно, так как автор предлагает технологическую схему, которая заканчивается на этапе «Передача КЖ на стадию хроматографической очистки». Однако в автореферате в разделе «Материалы и методы» можно найти краткое описание неупомянутой в диссертации части получения готовой лекарственной формы моноклонального антитела из культуральной жидкости.

В целом, автором показано, что разработанная технология культивирования позволяет осуществлять стабильное промышленное производство биоаналога моноклонального антитела адалимумаб с полноценными иммунобиологическими свойствами, обеспечивая его безопасное и эффективное применение в объемах, требуемых в роли жизненно необходимого лекарственного средства.

Подводя итоги, представленная к защите диссертация заслуженно может считаться удачным примером решения практических биотехнологических задач. Достоверность полученных данных подтверждается широкой апробацией результатов экспериментов на международных научно-практических конференциях и публикацией научных статей в российских и зарубежном журналах, освещающих содержание диссертации. Цели и задачи исследования, сформулированные автором, были вполне достигнуты.

Диссертация и автореферат Ворониной Екатерины Владимировны на тему: «Разработка технологии получения моноклонального антитела к фактору некроза опухолей альфа в целях биофармацевтического производства» полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям, и представляют теоретическую и практическую ценность для биотехнологической промышленности, а автор Воронина Екатерина Владимировна показала себя способным и профессионально состоявшимся научным исследователем и заслуживает присуждения ученой степени

кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Заместитель исполнительного директора
по разработке и производству АФС
АО «Биохимик», к.б.н.
20 сентября 2018

А. Купцов

Подпись В. Н. Купцова заверяю

Саша
за

М. В. /
сид

СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по кандидатской диссертации Ворониной Екатерины Владимировны «Разработка технологии получения моноклонального антитела к фактору некроза опухоли альфа в целях биофармацевтического производства», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, звание	Основные работы
Купцов Василий Николаевич	РФ	Заместитель исполнительного директора по разработке и производству АФС АО «Биохимик», г. Саранск	Кандидат биологических наук	1. Купцов В.Н., Горкун Т.А., Борисов Н.В., Борисова Т.Ю., Шматченко Н.А., Степанов А.В. Оценка качества трипсина, используемого при производстве генноинженерного инсулина человека // Московский международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития". Мат. науч. конф. – М.: ООО «Экспо-биохим-технологии». – 2005 г. 2. Купцов В.Н., Горкун Т.А., Борисова Т.Ю., Шматченко Н.А., Честухина Г.Г., Степанов А.В. Разработка критериев оценки качества трипсина, используемого в биотехнологическом производстве // Международная конференция «Наука-бизнес-образование» «Биотехнология-Биомедицина-Окружающая среда»: Мат. науч. конф. – г. Пушкино. – 2005 г. – С. 27-28. 3. Купцов В.Н., Горкун Т.А., Борисов Н.В., Борисова Т.Ю., Шматченко Н.А., Байдусь А.Н., Степанов А.В. Оценка влияния физикохимических факторов и состава буферных растворов на выход инсулина человека. // Московский международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития". Мат. науч. конф. – М.: ООО «Экспо-биохим-технологии». – 2005 г. – С. 110. 4. Купцов В.Н., Байдусь А.Н., Шматченко Н.А., Борисов Н.В., Горкун Т.А., Борисова Т.Ю., Степанов А.В. Оптимизация условий ферментативного гидролиза при производстве генно-инженерного инсулина человека // Биотехнология. – 2006. – № 4. – С.27-32.

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, звание	Основные работы
				5. Купцов В.Н., Горкун Т.А., Шматченко Н.А., Байдусь А.Н., Степанов А.В. Оптимизация условий стадии хроматографической очистки диаргинининсулина при производстве генноинженерного инсулина человека // Международная конференция «Наука-бизнес-образование» «Биотехнология-Биомедицина-Окружающая среда»: Мат. науч. конф. – г. Пушкино. – 2005 г. – С. 85-87. 6. Шматченко В.В., Шматченко Н.А., Байдусь А.Н., Купцов В.Н., Ноздрин В.Н., Степанов А.В. Рекомбинантная плазмидная ДНК рHINS11, кодирующая гибридный белок - предшественник инсулина человека, клетка Escherichia coli, трансформированная рекомбинантной плазмидной ДНК рHINS11, штамм бактерий Escherichia coli JM109/рHINS11 - продуцент гибридного белка - предшественника инсулина человека, и способ получения инсулина человека. Заявка на патент РФ № 2006137635/13, 25.10.2006. Номер публикации патента 2354702. 7. Корженевский Д.А., Купцов В.Н., Митянина В.А., Селищева А.А., Савельев С.В., Калашникова Т.Ю. Идентификация молекулярных видов церамидов эритроцитов методами высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии и tandemной масс-спектрометрии. // Масс-спектрометрия. – 2010. – Т. 7. – №3. – С. 188-192. 8. Korzhenevskii D.A., Kuptsov V.N., Mityagina V.A., Selishcheva A.A., Savetiev S.V. and Kalashnikova T.Yu. Identification of the Individual Molecular Species of Ceramides Derived from Human Erythrocytes using HPLC/MS and HPLC/MS/MS. // J. Anal. Chem. – V.66. – №13. – P. 1270.

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, звание	Основные работы
				9. Митянина В.А., Кушпов В.Н., Савельев С.В., Швеи В.И., Селищева А.А.. Липидный состав эритроцитов детей на разных стадиях заболевания диабетом 1-го типа. // Биомедицинская химия. – 2012. – Т. 58. – №1. – С. 95-103. 10. Митянина (Акмурина) В.А., Кушпов В.Н., Селищева А.А., Савельев С.В., Швеи В.И. Получение профили молекулярных фракций церамидов из эритроцитарной мембраны методом взжж с масс-спектрометрическим детектированием // Международный симпозиум ASOC «Успехи науки в области органической химии»: - Мат. науч. конф. – Мисхор, Украина. – 2010. – С. 143. 11. Сорокина С. Ю., Кушпов В. Н., Урбан Ю. Н., Фокин А. В., Поарков С. В., Иванков М. Ю., Мельников А. И., Куликов А. М. Базы данных как инструмент анализа больших массивов данных о взаимодействиях молекулярно-биологических объектов Известия РАН // Серия биологическая № 3. – 2013. – С. 261-272. 12. Кушпов В.Н., Ефимова И.С., Белякова О.В., Иванов А.В. Способ одновременного определения примесей этилендиаминтетрауксусной кислоты, диметилсульфооксида и п-этилмаленимида в фармацевтических субстанциях методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Патент №2621645 от 22.03.2016 г.

Заместитель исполнительного директора

по разработке и производству АФС АО "Биохимик"
430030, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Васенко, 15а
Тел. +7 (8342) 38 03 68 доб.3305
e-mail v.kursov@biohimic.ru

К.б.н. Кушпов В.Н.

Согласен

*Савельев Н.В. /
Мисхорский*