

Отзыв официального оппонента

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»

Рекомбинантное моноклональное антитело (мАТ) адалимумаб является селективным иммунодепрессантом. Адалимумаб селективно связывается с фактором некроза опухоли альфа (ФНО-альфа) и нейтрализует его биологические функции за счет блокады взаимодействия этого цитокина с поверхностными клеточными р55 и р75 рецепторами. Повышенные уровни ФНО обнаруживают в синовиальной жидкости у больных ревматоидным артритом, псориатическим артритом и анкилозирующим спондилитом. ФНО играет важную роль в развитии патологического воспаления и разрушения суставной ткани, характерных для этих заболеваний. Адалимумаб модулирует также биологические ответные реакции, которые индуцируются или регулируются ФНО, включая изменения уровней молекул адгезии, вызывающих миграцию лейкоцитов.

Применение больных ревматоидным артритом адалимумаба вызывает быстрое снижение уровней острофазных показателей воспаления. Кроме того, отмечается снижение сывороточной активности матриксных металлопротеиназ (ММР-1 и ММР-3), вызывающих ремоделирование тканей, которое лежит в основе разрушения хряща. В России мАТ адалимумаб успешно применяется с 2006 года и входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов.

Истечение срока патентной защиты оригинального мАТ адалимумаб открыло возможность развитию рынка его аналогов. Разработка технологии получения отечественного биоаналога полностью гуманизированного мАТ адалимумаб в целях биофармацевтического производства предоставит возможность снизить стоимость, решить проблему импортозамещения и повысить его доступность для большего числа пациентов. Таким образом, задача получения биоаналога адалимумаба необычайно актуальна.

Цель диссертационной работы Екатерины Владимировны заключалась в разработке опытно-промышленной технологии получения мАТ адалимумаб на основе эукариотической линии клеток СНО.

Для достижения поставленной цели диссертант обозначил **8 задач**, в которые входило: создание клеточной линии, стабильно экспрессирующей мАТ адалимумаб; установление характеристик качества мАТ адалимумаб; осуществление скрининга сред и подпиток в рамках оптимизации условий культивирования для достижения максимальной продуктивности; оценка значимости различий качественных характеристик биоподобного и оригинального мАТ адалимумаб; осуществление масштабирования разработанной технологии в биореакторах разных типов; проведение трёх установочных серий культивирования в оптимизированных условиях для подтверждения стабильности и воспроизводимости процесса; подтверждение биоподобия мАТ адалимумаб, получаемого по разработанной технологии; оценка экономической эффективности разработанной технологии.

Научная новизна. Создана стабильная клеточная линия на основе СНО, продуцирующая МАТ адалимумаб и депонирована во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИгенетика». Впервые проведено сравнение эффективности технологии культивирования суспензионных клеток СНО и качества производимого моноклонального антитела в трех типах биореакторов (с механической мешалкой, волновом и орбитальном). Разработаны оригинальные подходы для оптимизации профиля гликозилирования полученного моноклонального антитела. Впервые проведена оценка эффективности связывания антитела с рецептором FcγRIIIA (CD16a) в зависимости от содержания маннозного гликана.

Практическая значимость. Выполненные научные исследования и полученные результаты в настоящей работе могут быть учтены и использованы в качестве востребованных решений практических задач на этапах разработки технологий производства современных высокоэффективных лекарственных препаратов. Разработанная технология будет применена для организации производства моноклонального антитела адалимумаб на площадке ООО «Фармапарк», относящегося к классу жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств и используемого для лечения аутоиммунных заболеваний, в первую очередь ревматоидного артрита.

Диссертация состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Текст изложен на 222 страницах, сопровождается 55 рисунками и 21 таблицами. Список литературы включает 262 публикаций. Работа написана по традиционному плану, изложение достаточно четкое и последовательное.

Обзор литературы, изложенный на 52 страницах, включает анализ отечественных и иностранных источников. В обзоре изложены как фундаментальные сведения, так и проблемы практического применения, это делает его интересным и насыщенным. Обзор литературы состоит из шести разделов. В первом диссертант подробно описал роль фактора некроза опухоли альфа в организме человека и его участие в различных воспалительных процессах, во втором подробно рассказал о моноклональных антителах к ФНО-альфа в лечении ревматоидного артрита и других заболеваний и применение в клинике, обосновав важность разработки отечественного аналога полностью гуманизированного МАТ адалимумаб. Далее соискатель описал современные тенденции в разработке технологий получения биофармацевтических препаратов и подробно разобрал этапы создания стабильной клеточной линии для экспрессии моноклональных антител, уделяя пристальное внимание основным аспектам оптимизации технологии культивирования и аппаратурному обеспечению процессов культивирования клеток СНО для производства моноклональных антител. В целом литературный обзор охватывает необходимый и достаточный для понимания проблемы круг вопросов.

Перехожу к характеристике собственно результатов соискателя. Их изложение начинается с описания **материалов и методов**, использованных в работе. Этот раздел дает представление о высоком современном методическом уровне работы. Автор успешно сочетает разнообразные химические, биохимические, молекулярно-биологические и биотехнологические подходы по культивированию культуры клеток СНО для решения поставленных задач. Следует подчеркнуть, что введение каждого нового метода в работу не было излишеством и не представляло собой погоню за распространением арсенала

современных методов, а явилось неизбежным логическим следствием решения конкретных научных задач.

Результаты и обсуждение. Данная работа посвящена получению и разработке процесса культивирования эукариотической клеточной линии биосимилярного МАТ адалимумаб. Для экспрессии антитела диссертантом была выбрана клеточная линия CHO-DG44, как хорошо изученная и наиболее широко применяемая в мире для производства гликозилированных рекомбинантных белков.

При создании векторов использовался классический подход генной инженерии. Для селекции клонов-продуцентов были использованы две стратегии отбора и амплификации. При первой стратегии отбор минипулов осуществляли методом предельных разведений с их последующей амплификацией и субклонированием. Однако культивирование выбранных клонов показало, что все клоны росли очень медленно и имели склонность к агрегации.

При второй стратегии амплифицировали общий пул трансфецированных клеток с последующим отбором клонов методом предельных разведений. Этот подход позволил существенно сократить время по сравнению с первым. Соискателю удалось амплифицировать пул с сохранением ростовых характеристик. В конечном счете было получено 7 перспективных клонов-продуцентов. Далее диссертант, используя разнообразие коммерческих сред, адаптировал клоны-продуценты на линейку сред с разным составом и сравнил их ростовые характеристики и продуктивность, как в коротких циклах продукции, так и в рамках длительного культивирования с подпитками. В результате был отобран клон №26 (CHO-DHFR-ADMB26), обладающий способностью расти в условиях высокой плотности при длительном культивировании и обеспечивающий синтез моноклонального антитела адалимумаб около 1 г/л.

С целью повышения эффективности процесса культивирования соискателем был проведён ряд исследований влияния состава коммерческих доступных сред и подпиток на культуральные характеристики и продуктивность полученной клеточной линии. В результате скрининга различных комбинаций сред и подпиток удалось повысить уровень продукции клеточной линии почти в 1,5 раза до 1,6 г/л, что уже совсем неплохо для перспективного продуцента.

В результате исследования качества полученного продукта было подтверждено, что одной из важных характеристик, корректировку которой можно осуществить на этапе разработки технологии культивирования, является профиль гликозилирования, определяющий как эффекторные функции молекулы, так и ее фармакокинетику. Было проведено исследование профиля гликанов оригинального препарата и разрабатываемого антитела. В результате сравнения профилей гликанов биоаналога и оригинального препарата было показано, что использование комбинации среды Dynamis и комплексной подпитки ActiCHO Feed A/B обеспечивает максимальный выход и обеспечивает довольно близкое содержание гликозилированных форм. Однако более детальное исследование показало, что имеется существенное отличие по содержанию минорного нефукозилированного гликана Man5. Так как нефукозилированные гликаны вносят существенный вклад в связывание антитела с Fc-рецептором третьего типа (FcγRIIIA) на поверхности макрофагов и натуральных киллеров, перед диссертантом встала непростая и малоизученная проблема по оптимизации состава гликанов полученного МАТ адалимумаб с целью достижения близкого к оригинальному по содержанию целевой гликоформы

Man5. Рекомендуемые в литературе агенты, такие как антибиотик монензин, хлорид марганца, глюкозамин, хлорид натрия, повышающие долю маннозных гликанов, оказались неэффективными и только ухудшали культуральные характеристики. Однако, внесение 60 мМ сахарозы по определенной схеме привело к желаемому результату, который обеспечил нужный по содержанию уровень гликоформы Man5 и позволил сохранить культуральные характеристики и продуктивность клеточной линии.

Достижение оптимального галактозилирования биоподобного антитела было достигнуто оригинальным приемом, состоящим в варьировании пропорций сред Dynamis с ActiCHO в разных соотношениях. Таким образом, использование данного подхода наряду с внесением сахарозы с целью повышения доли Man5 позволило соискателю добиться желаемого профиля гликозилирования в соответствии с оригинальным антителом в рамках его изменчивости. Именно в реализации этого раздела проявился экспериментаторский талант Екатерины Владимировны, которой удалось, анализируя литературные данные, а также собственные наблюдения и результаты, решить столь непростую задачу в контексте собственного объекта разработки.

После трудоёмких исследований, посвященных созданию технологии получения антитела заданного профиля качества в малом объеме диссертант исследовал масштабируемость технологии в разных типах биореакторов. Масштабирование осуществляли в стеклянном биореакторе с механическим перемешиванием, а также в биореакторе волнового типа с использованием одноразовых мешков. Было показано, что культивирование клона-продуцента в реакторе волнового типа обеспечивает более благоприятные условия и позволяет достичь максимальные титры и качество продукта. Был также оптимизирован температурный режим. Это позволило повысить эффективность процесса до промышленного уровня в 1,9 г/л. Таким образом, диссертантом предложена технология культивирования клеточной линии, продуцирующей моноклональное антитело адалимумаб, в биореакторе волнового типа с использованием одноразовых мешков, что соответствует современным требованиям производства биофармацевтических препаратов. Проведены 3 установочные серии культивирования продуцента в мешке объемом 50 л на волновом биореакторе. Результаты проведенных испытаний подтвердили стабильность процесса культивирования как по динамике роста клеточной массы, так и по продуктивности.

На заключительном этапе работы была отработана технология удаления клеток продуцента и стерилизующая фильтрация культуральной жидкости. Расчёт экономических показателей подтвердил рентабельность процесса. Разработанная технология суспензионного культивирования может быть внедрена на производственную площадку ООО «Фармапарк».

В рамках выполненной работы была проведена оценка биоподобия мАТ адалимумаб в сравнении с оригинальным, а именно характеристика профиля гликозилирования, состава заряженных изоформ, а также анализ биологической активности на проявление способности ингибировать токсичное влияние ФНО-альфа на чувствительной клеточной линии. Было показано, что разработанная технология получения биоаналога моноклонального антитела адалимумаб позволяет осуществлять стабильное промышленное производство надлежащего качества с полноценными иммунобиологическими свойствами, обеспечивая его безопасное и эффективное

применение в объемах, требуемых в роли жизненно необходимого лекарственного средства.

Биоаналог успешно прошел доклинические исследования сравнительной токсичности при многократном подкожном введении с изучением токсикокинетики, иммуногенности и местнораздражающего действия в сравнении с референтным препаратом Хумира (Веттер Фарма, Германия) на яванских макаках и на модели артрита на трансгенных мышах Tg197, и рекомендован для проведения клинических исследований.

Таким образом, Екатерине Владимировне удалось удачно преодолеть «Долину смерти», ожидающую каждую научную разработку, провести трудоемкие исследования и сделать качественный биотехнологический продукт. Это нечасто случается в нашей научной действительности.

Эту диссертацию я бы хотел рекомендовать как учебное пособие по тяжёлому научному и биотехнологическому труду, сочетающему метод проб и ошибок с глубоким анализом полученных результатов. Екатерина Владимировна пыталась разобраться в неудачах и найти причину. Это необычайно ценно. Систематизация ошибок и их понимание позволило ей понять их причину и оптимизировать последующие эксперименты. Высокая технологичность созданного процесса основано не на волшебном слове, а на глубоких фундаментальных знаниях и хорошем техническом исполнении. Выполненные научные исследования и полученные результаты в настоящей работе, несомненно, должны быть учтены и использованы в качестве востребованных решений практических задач на этапах разработки технологий производства современных высокоэффективных лекарственных препаратов.

Работа написана грамотным русским языком, материал изложен просто и доступно. Несмотря на хорошее впечатление о работе, имеются некоторые замечания. В работе слабо проведено обсуждение результатов, в литературном обзоре отсутствует заключительная глава, в которой формулируются цели и задачи для данного исследования. Однако все это не снижает общего благоприятного впечатления от работы.

Отмеченные замечания не изменяют общей положительной оценки диссертации. В целом, экспериментальный материал, полученный в настоящей работе, и сделанные на его основе выводы, весьма интересны. Решена научная задача, которая является заметным шагом вперед на пути к созданию эукариотических продуцентов моноклональных антител и имеет практическое значение для медицины. Качество полученного материала и важность основных выводов заслуживает самой высокой оценки. Достоверность полученных результатов сомнений не вызывает.

Аннотация диссертации Е. В. Ворониной удовлетворяет требованиям ВАК России и в полной мере отражает ее наиболее существенные положения и выводы. Ключевые результаты работы Е. В. Ворониной адекватно отражены в опубликованных печатных работах. Апробация работы проведена на высоком уровне, результаты обсуждались на многочисленных Всероссийских и Международных конференциях, конгрессах и симпозиумах. Диссертация отвечает паспорту специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология» по пункту п.п. 5.8.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационное исследование Е. В. Ворониной «Разработка технологии получения моноклонального антитела к фактору некроза опухолей альфа в целях биофармацевтического производства» выполнено на

высоком уровне и полностью соответствует по актуальности, научной новизне, объёму и практической значимости полученных результатов требованиям, установленным пунктами 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней» (учреждённого Постановлением Правительства РФ 24 сентября 2013 г. № 842), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а его автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент

Лунин Владимир Глебович

заведующий лаборатории биологически

активных наноструктур,

доктор биологических наук,

федеральное государственное бюджетное

учреждение «Научно-исследовательский

центр эпидемиологии и микробиологии

имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»

Министерства здравоохранения

Российской Федерации

123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.18

lunin1955@gmail.com +7 (916) 144-2264, +7 (499) 193-3001

Подпись В.Г.Лунина заверя

Учёный секретарь ФГБУ

Кожевникова Л.К.

Ч.Ф.Гамалеи" Минздрава России

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
Лунин Владимир Глебович	РФ	Заведующий лаборатории биологически активных наноструктур НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития, г. Москва	д. б. н.	1. Tkachuk A.P., Gushchin V.A., Potapov V.D., Demidenko A.V., Lunin V.G., Gintsburg A.L. Multi-subunit BCG booster vaccine GamTBvac: Assessment of immunogenicity and protective efficacy in murine and guinea pig TB models // PLoS One. – 2017. – V. 12(4). – P. 1-16. doi: 10.1371/journal.pone.0176784. ECollection 2017 2. Voronina O.L., Kunda M.S., Aksenova E.I., Semenov A.N., Ryzhova N.N., Lunin V.G., Gintsburg A.L. Mosaic structure of Mycobacterium bovis BCG genomes as a representation of phage sequences' mobility // BMC Genomics. – 2016. – V. 17(Suppl 14). – P. 211-230. doi: 10.1186/s12864-016-3355-1 3. Ershova A.S., Gra O.A., Lyaschuk A.M., Grunina T.M., Tkachuk A.P., Bartov M.S., Savina D.M., Sergienko O.V., Galushkina Z.M., Gudov V.P., Kozlovskaya L.I., Kholodilov I.S., Gmyl L.V., Karganova G.G., Lunin V.G., Karyagina A.S., Gintsburg A.L. Recombinant domains III of Tick-Borne Encephalitis Virus envelope protein in combination with dextran and CpGs cause immune response and partial protectiveness against TBE virus infection in mice // BMC Infectious Diseases. – 2016. – V. 16. – P. 533-544 doi: 10.1186/s12879-016-1884-5 4. Korneeva V.A., Trubetskov M.M., Korshunova A.V., Lushchekina S.V., Kolyadko V.N., Sergienko O.V., Lunin V.G., Pantelev M.A., Ataulakhanov F. I. Interactions outside the proteinase-binding loop contribute significantly to the inhibition of activated coagulation factor XII by its canonical inhibitor from corn // J Biol Chem. – 2014. – 289(20). – P. 14109-14120. doi: 10.1074/jbc.M114.553735

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, звание	Основные работы
				5. Voronina O.L., Kunda M.S., Aksenova E.I., Ryzhova N.N., Semenov A.N., Petrov E.M., Didenko L.V., Lunin V.G., Ananyina Y.V., Gintsburg A.L. The characteristics of ubiquitous and unique <i>Leptospira</i> strains from the collection of Russian centre for leptospirosis // Biomed Res Int. – 2014. doi: 10.1155/2014/649034 6. Ershova A.S., Karyagina A.S., Vasiliev M.O., Lyashchuk A.M., Lunin V.G., Spirin S.A., Alexeevski A.V. Solitary restriction endonucleases in prokaryotic genomes // Nucleic Acids Res. – 2012. – V. 40(20). – P. 10107-10115. doi: 10.1093/nar/gks853 7. Velikodvorskaya G.A., Tikhonova T.V., Gurvits I.D., Karyagina A.S., Lavrova N.V., Sergienko O.V., Tashlitskii V.N., Lunina N.A. Lunin V.G. Chimeric lactase capable of spontaneous and strong immobilization on cellulose and development of continuous-flow system for lactose hydrolysis at high temperatures // Applied and Environmental Microbiology. – 2010. – V. 76. – № 24. – P. 8071-8075. doi: 10.1128/AEM.01517-10 8. Gilyazova D.G., Rosenkranz A.A., Gulak P.V., Lunin V.G., Sergienko O.V., Khrantsov Y.V., Timofeyev K.N., Grin M.A., Mironov A.F., Rubin A.B., Georgiev G.P., Sobolev A.S. Targeting cancer cells by novel engineered modular transporters // Cancer Res. – 2006. – Vol. 66(21). – P. 10534-10540. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2393

доктор биологических наук Лунин В.Г.

ФГБУ «Научно-исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии имени
почетного академика Н.Ф. Гамалеи»

123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д.18

lunin1955@gmail.com +7 (916) 144-2264, +7 (499) 193-3001

Учёный секретарь ФГБУ "НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи" Минздрава России