

119121, гор. Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

тел.: (+7/499) 246-69-80, (+7/499) 246-34-66, факс: (+7/499) 245-08-57, эл. почта: inst@ibmc.msk.ru, <http://www.ibmc.msk.ru>
ОКПО 01897373, ОГРН 1027739053792, ИНН/КПП 7704084419 / 770401001, ОКАТО 45286590000

№ 395-2

«13» сентября 2018 г.

«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения
«И- биомедицин
ий институт
Ореховича»
н., академик

«И- биомедицин

Лисица Андрей Валерьевич

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Ворониной Екатерины Владимировны на тему: «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».

Актуальность темы выполненной работы

Диссертация Ворониной Е.В. посвящена разработке опытно-промышленной технологии получения высокоэффективного полностью гуманизированного моноклонального антитела адалимумаб - ингибитора фактора некроза опухоли альфа для лечения ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний.

Установление ведущей роли плеiotропного цитокина фактора некроза опухоли альфа в иммунопатогенезе целого ряда заболеваний явилось основанием для разработки «антицитокиновой» терапии моноклональными антителами с высокой специфичностью. В настоящее время подтверждено, что ингибиторы этого цитокина на

основе моноклональных антител являются высокоэффективными и безопасными препаратами для терапии ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний.

Адалимумаб является одним из современных блокаторов фактора некроза опухоли альфа и сохраняет позиции лидера мирового биофармацевтического рынка уже несколько лет благодаря широкому спектру применению против заболеваний схожей этиологии, сниженной степени иммуногенности и доказанной стабильности эффекта при многолетнем применении. Создание отечественного безопасного и эффективного моноклонального антитела адалимумаб позволит системам здравоохранения уменьшить нагрузку на бюджет, повысить его доступность для большего числа пациентов и сэкономить средства для последующего инвестирования в новые области.

Структура и основное содержание диссертации,

Диссертация имеет стандартную структуру и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка используемой литературы из 262 источников.

Обзор литературы в полной мере освещает вопросы, касающиеся темы исследования, и состоит из шести разделов. Первый посвящен исследованию роли фактора некроза опухоли альфа в норме и патологии. Вторая глава описывает применение существующих терапевтических моноклональных антител к ФНО-альфа для лечения ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний, а также включает обоснование выбора моноклонального антитела для разработки технологии, описанной в диссертации. В третьей главе изложен обзор современных тенденций в разработке технологий получения биофармацевтических препаратов. Следующие два раздела освещают этапы создания стабильной клеточной линии для экспрессии моноклональных антител и основные аспекты оптимизации технологии культивирования. В последней главе литературного обзора автор проводит сравнительный анализ существующих режимов и оборудования для культивирования клеток СНО для производства мАТ.

В главе Материалы и методы подробно описаны все использованные в работе методики. Применяемые методы обоснованы и соответствуют поставленным задачам.

Работа проведена на современном методическом уровне с использованием различных методов генетической и клеточной инженерий, молекулярной биологии и биохимии.

Глава Результаты является основным разделом работы и описывает получение клеточной линии, стабильно продуцирующей мАТ, подбор оптимального сочетания среды и подпитки для культивирования, оптимизацию профиля гликозирования полученного антитела и исследование его биоподобия, масштабирование технологии культивирования клеточной линии для производства антитела адалимумаб и оценку стабильности и экономической эффективности такой технологии. На основании полученных результатов с учетом всех исследованных нюансов была разработана технологическая схема процесса культивирования.

Выводы соответствуют полученным результатам и опираются на экспериментальные данные.

Новизна и достоверность полученных результатов и выводов

Автором впервые проведено сравнение эффективности технологии культивирования суспензионных клеток СНО и качества производимого моноклонального антитела в трех типах биореакторов с механической мешалкой, волновом и орбитальном. Наряду с этим автором разработаны оригинальные подходы для оптимизации профиля гликозилирования и повышения высокоманнозного гликана Man5. Впервые установлена зависимость связывания антитела с рецептором от содержания Man5.

Достоверность полученных результатов, выводов и практических рекомендаций обеспечивается большим числом проведенных экспериментов, адекватностью использованных методов, соответствующих поставленным задачам, корректностью использования системных методов решения поставленных задач, а также обстоятельной аргументацией принятых допущений и ограничений и логичной системой контролей на каждом этапе исследования.

Значимость полученных результатов для науки и производства

В результате научных изысканий автором в сотрудничестве с коллегами создана стабильная клеточная линия на основе суспензионной культуры клеток СНО (клетки яичников китайского хомячка), продуцирующая моноклональное антитело

адалимуаб на уровне $1,9 \pm 0,2$ граммов на литр по разработанной технологии, что подтверждает высокую практическую ценность диссертационной работы и позволяет использовать клеточную линию для рентабельного производства в объемах, требуемых для жизненно необходимого лекарственного средства. Клеточная линия депонирована в крупнейшей национальной сервисной коллекции Российской Федерации - Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика».

Исследования, проведенные автором, выполнены с применением одноразовых технологий, которые в настоящее время широко используются в процессах производства биопрепаратов, что отвечает современным требованиям биофармацевтического производства. Кроме того, разработка технологии культивирования осуществлялась в соответствии с правилами надлежащей производственной практики, утвержденными приказом Минпромторга России от 14.06.2013 № 916, и отвечает всем современным требованиям качества, предъявляемым к медицинским препаратам на основе рекомбинантных белков.

Разработанная технология будет применена для организации на площадке ООО «Фармапарк» производства моноклонального антитела адалимуаб, которое относится к классу жизненно необходимых лекарственных средств для лечения аутоиммунных заболеваний, в первую очередь ревматоидного артрита.

Выполненные научные исследования и результаты, полученные в настоящей работе, могут быть учтены и использованы в качестве востребованных решений практических задач на этапах разработки технологий производства современных высокоэффективных лекарственных препаратов.

Рекомендации по использованию результатов и выводов

Результаты и выводы диссертации Ворониной Е.В. могут быть использованы как для проведения фундаментальных исследований, так и для разработки новых технологий получения терапевтических рекомбинантных белков на основе культуры клеток яичников китайского хомячка, в частности, для получения моноклональных антител. Полученные результаты целесообразно использовать

научным лабораториям и группам, а также биотехнологическим компаниям, занимающимся разработкой и производством рекомбинантных препаратов.

Препарат, созданный на основе субстанции мАТ адалимумаб, получаемой по разработанной технологии, является высокоэффективным биоаналогом для лечения ревматоидного артрита и других аутоиммунных заболеваний, что было доказано *in vitro* и *in vivo*. Полученный биоаналог не уступает по качеству оригинальному, обладая при этом гораздо меньшей стоимостью, может быть рекомендован для клинических исследований для последующего широкого применения в медицинской практике.

Замечания и общая оценка диссертации

К недочетам диссертации можно отнести следующее:

1) В п.2 выводов изложены общеизвестные вещи, которые не являются результатами диссертанта, при этом первое предложение в п.4 дублирует п.2. Логично было бы переформулировать п.2 с упоминанием экспериментальных данных автора относительно влияния Man5 на эффекторные свойства антитела.

2) В диссертации при сравнении показателей процентного содержания гликана Man5 и EC_{50} для производимого и оригинального антител, для оригинального антитела в разных местах приведены разные цифры. Та же ошибка присутствует и на стр. 14 и 15 автореферата.

3) В главе про исследование биоподобия антитела кратко упоминаются доклинические исследования токсичности и эффективности полученного антитела на яванских макаках и трансгенных мышах, однако остается непонятным, кем проводились эти исследования.

Вместе с тем, стоит отметить, что указанные замечания не снижают ценности диссертационной работы, не влияют на основные результаты работы и носят рекомендательный характер.

Оценивая работу в целом, можно отметить, что её структура отличается ясной логикой, материал хорошо структурирован, экспериментальная часть чётко соотносится с целями и задачами, выводы обоснованы и полностью соответствуют полученным результатам. Основные выводы исследования опубликованы и докладывались на

российских и международных научных конференциях. По теме диссертационной работы опубликовано 9 научных работ, из которых две статьи в изданиях, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий (перечень ВАК), статья в зарубежном журнале, индексируемом в Web of Science и Scopus, и шесть публикаций, цитируемых в базе РИНЦ. Автореферат и печатные работы полностью отражают основные положения диссертации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Ворониной Екатерины Владимировны на тему: «Разработка технологии получения моноклонального антитела к фактору некроза опухолей альфа в целях биофармацевтического производства», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология», является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой по актуальной теме, которая содержит новые научные результаты и имеет существенное значение для современной биотехнологии и медицины.

По актуальности, методическому уровню, и научно-практической значимости полученных результатов диссертационная работа Ворониной Екатерины Владимировны отвечает требованиям п. 9 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24.09.2013 года с изменениями № 335 от 21 апреля 2016 г., а ее автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Отзыв заслушан и утвержден на протеемном семинаре Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (протокол № 13-18 от 13.09 2018 г)

Ведущий научный сотрудник
лаборатории медицинской протеомики ИБМХ,
кандидат биологических наук

Воронько О.Е.

В Диссертационный совет Д.217.013.01 при
Федеральном государственном бюджетном
учреждении Государственный научно-
исследовательский институт генетики и
селекции промышленных микроорганизмов
Национального исследовательского центра
"Курчатовский институт»

Сведения о ведущей организации

по диссертации Ворониной Екатерины Владимировны на тему: «Разработка технологии получения моноклонального антитела к фактору некроза опухолей альфа в целях биофармацевтического производства», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Официальное полное наименование организации	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»
Сокращенное название:	ИБМХ
Организационно-правовая форма	ФГБНУ
Ведомственная принадлежность	Минобрнауки России
Почтовый индекс и адрес организации	119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8
Официальный сайт организации	http://www.ibmc.msk.ru
Телефоны организации	+7 (499) 246-69-80, +7 (499) 246-34-66
Факс	+7 (499) 245-08-57
Электронная почта	inst@ibmc.msk.ru
Директор	д.б.н., академик Лисица Андрей Валерьевич

Список основных публикаций сотрудников ведущей организации в рецензируемых журналах по теме исследования за последние 5 лет

1. Lobas A.A., Pyatnitskiy M.A., Chernobrovkin A.L., Ilina I.Y., Karpov D.S., Solovyeva E.M., Kuznetsova K.G., Ivanov M.V., Lyssuk E.Y., Kliuchnikova A.A., Voronko O.E., Larin S.S., Zubarev R.A., Gorshkov M.V., Moshkovskii S.A. Proteogenomics of Malignant Melanoma Cell Lines: The Effect of Stringency of Exome Data Filtering on Variant Peptide Identification in Shotgun Proteomics // J Proteome Res. – 2018. – V. 17(5). – P. 1801-1811.
2. Dmitrieva-Zdorova E.V., Gabaeva M.V., Seregin Y.A., Bodoev N.V., Voronko O.E. PDCD1 pd-1.3 polymorphism and allergic bronchial asthma in russian and buryat patients // Journal of Asthma. – 2017. – Т. 54. – № 1. – С. 46-52.
3. Шарафетдинов Х.Х., Юдочкин А.В., Плотникова О.А., Пилипенко В.В., Алексеева Р.И., Сенцова Т.Б., Воронько О.Е. Исследование полиморфного маркера ala54thr гена fabp2 у женщин репродуктивного возраста // Вопросы диетологии. – 2017. – Т. 7. – № 4. – С. 5-10.

4. Лушова А.А., Бязрова М.Г., Прилипов А.Г., Садыкова Г.К., Копылов Т.А., Филатов А.В. Новое поколение методов получения человеческих моноклональных антител // Молекулярная биология. — 2017. — Т. 51. — № 6. — С. 899-906.
5. Дыгай А.М., Семченко В.В., Лебедев И.Н., Ерениев С.И., Степанов С.С., Леонтьев В.К., Ярыгин К.Н., Жданов В.В., Петровский Ф.И., Байматов В.Н., Назаренко М.С., Николаев Н.А. Регенеративная биология и медицина. Коллективная монография / Москва - Омск - Томск - Ханты-Мансийск, 2017. Книга Клеточные технологии в клинической медицине
6. Арчаков А.И., Ипатова О.М., Лисица А.В., Мошковский С.А. Безопасные лекарства: миф или реальность // Вестник Российской академии наук. — 2016. — Т. 86. — № 6. — С. 519.
7. Соболев Б.Н., Веселовский А.В., Поройков В.В. Предсказание посттрансляционных модификаций в белках: основные направления и методы // Успехи химии. — 2014. — Т. 83. — № 2. — С. 143-154.
8. Колесанова Е.Ф., Фарафонова Т.Е., Алёшина Е.Ю., Пындык Н.В., Веремьева М.В., Новосильная А.В., Коваленко М.И., Шалак В.Ф., Негруцкий Б.С. Получение моноспецифичных антител против изоформы 2 фактора элонгации трансляции 1a (eef1a2) // Биомедицинская химия. — 2014. — Т. 60. — № 1. — С. 51-62.
9. Юдочкин А.В., Шарафетдинов Х.Х., Плотникова О.А., Сенцова Т.Б., Ворожко И.В., Воронько О.Е. Клинико-генетические особенности метаболического синдрома у женщин репродуктивного возраста // Вопросы питания. — 2014. — Т. 83. — № S3. — С. 130.
10. Дениева М.И., Дворянкова Е.В., Корсунская И.М., Миннибаев М.Т., Воронько О.Е. Анализ влияния полиморфных маркеров с(-1055)t и r130q гена ил-13 на развитие псориазического артрита // Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. — 2013. — Т. 8. — № 2 (25). — С. 7-9.
11. Дениева М.И., Дворянкова Е.В., Корсунская И.М., Воронько О.Е. Роль рецепторов иммунного ответа в развитии псориаза // Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. — 2013. — Т. 8. — № 4 (27). — С. 15-19.
12. Трифонова О.П., Ильин В.А., Колкер Е.В., Лисица А.В. "Большие данные" в биологии и медицине Acta Naturae (русскаяязычная версия). 2013. Т. 5. № 3 (18). С. 14-17.

Ученый секретарь
Федерального государственного
бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский
институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича»
к.х.н.

врачебной косметологии. — 2013. — Т. 8. — № 4 (27). — С. 15-19.

Карпова Елена Анатольевна