

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.01 ПО ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 19 мая 2022 г. № 5

о присуждении Балабашину Дмитрию Сергеевичу, гражданство Российская Федерация,
ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация «Оптимизация процессов селекции и культивирования клеток линии СНО, продуцирующих рекомбинантные антитела против фактора некроза опухоли-альфа человека» по специальности 1.5.4. Биохимия принята к защите 16 марта 2022 г. (протокол № 4) диссертационным советом 24.1.233.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет Утвержден Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г., с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13 февраля 2013 года № 74/нк, от 10 февраля 2014 года № 55/нк и от 30.09.2015 №1166/нк и 13 марта 2019 года № 222/нк), от 03.06.2021 №561/нк.

Соискатель

Балабашин Дмитрий Сергеевич, 1986 года рождения. В июле 2008 г. окончил государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Удмуртский государственный университет» по специальности «Биология», и в 2008 г. поступил в очную аспирантуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Диссертационная работа соискателя Балабашина Дмитрия Сергеевича на тему «Оптимизация процессов селекции и культивирования клеток линии СНО, продуцирующих рекомбинантные антитела против фактора некроза опухоли-альфа человека» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия выполнена в лаборатории инженерии белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН.

Научные руководители:

Алиев Теймур Кантамирович, кандидат химических наук, н.с. каф. химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова

Долгих Дмитрий Александрович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией инженерии белка ИБХ РАН;

Официальные оппоненты:

Шемякин Игорь Георгиевич, доктор химических наук, профессор, ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, руководитель лаборатории молекулярной биологии, заместитель директора по науке;

Воробьева Надежда Евгеньевна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, старший научный сотрудник, руководитель группы динамики транскрипционных комплексов.

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что доктор биологических наук, профессор **Шемякин Игорь Георгиевич** является одним из ведущих отечественных специалистов в области биотехнологии антител;

тем, что кандидат биологических наук, с.н.с. **Воробьева Надежда Евгеньевна** является одним из ведущих отечественных специалистов в области молекулярных механизмов регуляции транскрипции;

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Балабашина Дмитрия Сергеевича.

Ведущая организация:

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН в своем положительном отзыве, подписанном Кочетковым Сергеем Николаевичем, д.х.н., академиком и утвержденном зам. директора ФБГУН Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН к.б.н. Ивановым Александром Владимировичем, указала, что диссертационная работа Балабашина Дмитрия Сергеевича является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор Балабашин Дмитрий Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук специальности – 1.5.4. Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен с тем, что Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН является признанным отечественным центром изучения молекулярной биологии и биоинженерии. Таким образом, сотрудники ИМБ РАН и, в частности, лаборатория молекулярных основ действия физиологически активных соединений, лаборатория биохимии вирусных инфекций и лаборатория клеточных основ развития злокачественных заболеваний являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой диссертационной работы Балабашина Дмитрия Сергеевича.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

Публикации.

Основные результаты диссертационной работы Балабашина Дмитрия Сергеевича изложены в 4 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1. Балабашин Д. С., Калиберда Е. Н., Смирнов И. В., Мокрушина Ю. А., Бобик Т. В., Алиев Т. К., Долгих Д. А., Кирпичников М. П. Разработка бессывороточных сред на основе оптимальной комбинации рекомбинантных белков-добавок и гидролизатов неживотного происхождения для получения иммуноглобулинов // Прикладная биохимия и микробиология – 2020. - Т. 56, № 5, С. 503-513

2. Balabashin D., Kovalenko E., Toporova V., Aliev T., Panina A., Svirshchevskaya E., Dolgikh D., Kirpichnikov M. Production of anti TNF- α antibodies in eukaryotic cells using different combinations of vectors carrying heavy and light chains. // Cytotechnology. – 2015. – Т. 67(5), С. 761-72. doi: 10.1007/s10616-014-9714-3.
3. Балабашин Д.С., Топорова В.А., Панина А.А., Свирщевская Е.В., Алиев Т.К., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Использование флуоресцентной метки для эффективного клонирования клеточных линий-продуцентов химеризованных антител к ФНО-альфа человека // Естественные и технические науки, издательство Спутник+ (М.), - 2012, № 5, С. 103-109
4. Балабашин Д.С., Зайцева-Зотова Д.С., Топорова В.А., Панина А.А., Марквичева Е.А., Свирщевская Е.В., Алиев Т.К. Способы увеличения продукции рекомбинантных антител в клеточных линиях CHO DG44. Современные проблемы науки и образования // Современные проблемы науки и образования, - 2011 том 5, С. 103-111

По результатам работы было получено 3 патента:

1. Композиция на основе гидролизата белка гороха для повышения специфической продуктивности клеточных линий продуцентов и способ её получения. Патент РФ на изобретение №2741088
2. Композиция на основе гидролизата белка подсолнечника для повышения специфической продуктивности клеточных линий продуцентов и способ её получения. Патент РФ на изобретение №2741086
3. Рекомбинантная плазмидная ДНК, кодирующая химерное антитело против фактора некроза опухоли альфа человека, линия эукариотических клеток-продуцент химерного антитела и способ получения химерного антитела. Патент РФ на изобретение №2555533

Результаты работы также были представлены на 6 международных конференциях (и опубликованы в материалах этих конференций) в частности:

Гены & Клетки XIV (СПб, 2019), Международный форум "Биотехнологии: состояние и перспективы развития. Науки о жизни" (Москва, 2018), Спецвыпуск Acta Naturae (Москва, 2017), The 7th PEGS Europe Protein & Antibody Engineering Summit (Lisbon, Portugal, 2015), XXV Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, Россия, 2013), XXIII Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, Россия, 2011).

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора **Шемякина Игоря Георгиевича** (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания:

1. Хотя автор приводит на рисунке 17Г (стр. 80) электрофоретическое исследование полученного препарата рекомбинантных антител, он не пытается определить чистоту полученных препаратов, также не производит сравнения между двумя препаратами. Какие примесные компоненты присутствуют в препаратах, почему их влияние не освещено.
2. При подготовке обзора литературы достаточно обосновано применение антител против ФНО-а человека, однако была бы полезна их систематическая сравнительная характеристика по условиям наработки, нейтрализующей активности, уровне продуктивности в культуре-продуценте и рекомендуемые для применения дозировки.
3. На рисунках 29, 30 и 32 автору следовало бы упорядочить столбцы диаграмм по возрастанию уровня продуктивности культур, как это было сделано на диаграммах рисунка 28.
4. При вероятном повторении результатов данные представленные в работе являются избыточными. Так таблица 5, содержащая концентрации стоковых растворов компонентов создаваемой среды и следующая за ней таблица 6 с количествами компонентов, добавляемыми на 1 литр среды могут быть легко исключены из работы без потери ценности.
5. Рис. 3 на с. 59 можно было бы выполнить в виде круговых плазмидных карт, с указанием задействованных сайтов рестрикции. Такого графического материала было бы достаточно, чтобы легче понимать ход работы, описанных в п. 3.1 и 3.2 раздела «Материалы и методы».
6. С.48 В случае культур потомков культуры S3 на последнем этапе культивирования производили увеличение концентрации селективного антибиотика G418 для увеличения количества копий гена тяжёлой цепи в геноме клеток линии. Насколько увеличили концентрацию G418? По тексту использовали только концентрацию 500 мкг/мл и не увеличивали её.

Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук **Воробьёвой Надежды Евгеньевны** (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

1. Отсутствие графического материала в некоторых подразделах результатов препятствует качественному восприятию текста. В частности, в первых подразделах результатов очень не хватает схем, иллюстрирующих тактику запланированных экспериментов (какие наборы плазмид и как будут трансфицированы, как будет проводиться селекция, какими методами будет проводиться анализ). В финале результатов данную схему можно было бы представить еще раз с указанием продуктивности клеточных линий, полученных на разных этапах. Было бы хорошо, чтобы диссертант включил такие схемы в свой доклад, это бы способствовало восприятию материалов диссертации. Стоит отметить, что такие схемы принесли бы большую пользу разделу «Результаты», чем Рисунки 1 и 3, которые было бы лучше привести в разделе «Методы».

2. Существенные вопросы возникают при обсуждении диссертантом результатов экспрессии, полученных с использованием биплазмидных и бипромоторной систем. Дело в том, что структура би- и моно-промоторных векторов значительно отличается. В первую очередь тем, что в биплазмидной системе был использован один и тот же CMV промотор для экспрессии легких и тяжелых цепей, в то время как в бипромоторной системе были использованы разные промоторы. Учитывая значительные структурные различия в плаزمидах проводить прямое сравнение эффективности биплазмидных и бипромоторных тактик на представленном экспериментальном материале нельзя. Для такого рода сравнения и выводов необходимо проведение более аккуратных контрольных экспериментов (например, использование разных промоторов в биплазмидной системе). У меня нет претензий к выводу 3, если его расценивать, как оценку эффективности двух конкретных систем в данных конкретных условиях. Но более общее обсуждение относительно эффективности биплазмидных и бипромоторных систем в тексте диссертации выглядит необоснованным.

3. При выведении культур с биплазмидными векторами, содержащими разные гены устойчивости, оказалось, что финальная культура содержит существенную часть клеток, несущих только одну плазмиду (в линии S1 экспрессия легкой цепи существенно превышает уровень экспрессии тяжелой)? Или на самом деле в геноме присутствуют две плазмиды, а есть проблема именно с экспрессией и секрецией тяжелой цепи? Проводилась ли проверка присутствия обеих плазмид в отдельных клонах устойчивой финальной культуры (например, при помощи ПЦР). Или хотя бы в финальных мультиклональных культурах S1 и S3. Представьте пожалуйста результаты в докладе.

4. Не могла ли последовательность селекции культур с биплазмидными векторами (G418, а затем МТХ) привести к утере конструкции с тяжелой цепью в линии S1 на первых этапах селекции? Не пробовали ли вы проводить альтернативный вариант последовательной селекции G418 -> МТХ? Это бы помогло сделать выводы об эффективности выбранных стратегий

5. Интересно, что продуктивность клеток исходной S3 растет в процессе продвижения к концу диссертации (возможно в последних рисунках имеется в виду линии сортированных S3 клеток)? Если так, тогда Рисунок 18 имеет неправильные обозначения. Даже если так – все равно продуктивность S3 линии растет по ходу диссертации почти в 3 раза (в таблице 3 она 24,5 мкг/мл, в рисунке 10 больше 30 мкг/мл, в первом абзаце подраздела 4.4 фигурирует 64 мкг/мл). Проанализировав Рисунок 17в я догадываюсь, что, вероятно, более ранние эксперименты проводились на разных этапах селекции линии S3, то есть на фоне разных концентраций МТХ. Подтвердите пожалуйста или опровергните данную догадку. Данное замечания еще раз демонстрирует насколько необходима для данной диссертации схема проведенных экспериментов с приведенными показателями продуктивности линий на разных этапах (и указанием методов, которыми проводилась оценка продуктивности в данный конкретный момент).

6. В диссертации присутствует существенное количество выводов и рассуждений относительно копийности плазмид в клеточных линиях. Это можно понять, так как это важная информация, необходимая для оценки эффективности выбора стратегии повышения продуктивности экспрессионных клеточных линий. В тоже время не было сделано ни одной прямой экспериментальной оценки копийности плазмид в разных линиях и разных клонах чтобы эти выводы подтвердить или опровергнуть. Проводились ли такие измерения? Если нет, то все представленные косвенные выводы относительно количества копий разных плазмид на основе количества продуцируемого белка должны быть сделаны гораздо более аккуратно, с обсуждением альтернативных вариантов событий.

7. В ходе обсуждения результатов, представленных на Рисунке 32 - не очень понятно было ли внесено одинаковое количество гидролизатов в среду для культивирования (в одинаковой концентрации) или нет. Если разное, то нельзя проводить прямое сравнение использования разных гидролизатов и делать соответствующие сравнительные выводы об использовании таких гидролизатов.

8. В подразделе 2.3 написано «Белки, продуцируемые клеточными линиями на основе СНО, корректно гликозилированы и имеют правильную конформацию» и

приведена ссылка на единственную работу 1995 года. Данное замечание некорректно, так как адекватность гликозилирования обычно подтверждается для каждого экспрессируемого белка экспериментально.

9. В Рисунке 5 отсутствует фотография, которая иллюстрировала бы общее количество клеток (например, при помощи красителя DAPI). Ее отсутствие не позволяет оценить эффективность трансфекции. Просьба в докладе добавить данную фотографию.

10. На рисунке 23 впервые появляется культура S11. Никаких объяснений - что это такое и откуда она взялась нет. Поясните пожалуйста. Интересно, что этого не написано нигде в результатах. Только косвенно по разделу методов можно установить, что речь идет о линии, содержащей бипромоторную плазмиду

11. В «Обсуждении» присутствует следующий вывод «Наши исследования подтверждают данные полученные Zuberbuhler и др. в части процентного содержания окрашенных клеток и в части, касающейся прямой связи между уровнем окраски культуры клеток и уровнем продукции дочерней культуры, полученной из выделенной популяции». Поясните пожалуйста к какому эксперименту это относится? Имеются ли аккуратные контроли, чтобы делать такие выводы?

Отзыв ведущей организации **Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН** (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

1. Избыточность описания в разделе «результаты и обсуждение» процесса создания экспрессионных кассет и плазмид, часть из которого можно было бы перенести в соответствующие части раздела «Материала и методы».

2. Не на всех графиках указан доверительный интервал, в частности рис. 26, 28.

3. Список литературы оформлен не по ГОСТ, в списке литературы некоторые источники фигурируют несколько раз, в частности ссылками 101 и 107 Д.С. Балабашин ссылается на одну и ту же статью, также ссылками 14 и 58, 83 и 89.

На автореферат поступили положительные отзывы от:

Филатова Александра Васильевича, доктора биологических наук, профессора, заведующего Лабораторией иммунохимии ФГБУ "ГНЦ Институт иммунологии" ФМБА России. Замечаний нет;

Станишевского Ярослава Михайловича, доктора биологических наук, профессора, директор Института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН

(ИБХТН), Директор Научно-образовательного центра «Нанотехнологии» ИБХТН РУДН, институт биохимической технологии и нанотехнологии (ИБХТН). Замечаний нет.

Дашинимаев Эрдэм Баирович, кандидат биологических наук, с.н.с. Центра высокоточного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины, РНИМУ им. Н.И. Пирогова. В отзыве присутствуют следующие замечания: ряд погрешностей при оформлении работы, так, например, все поясняющие подписи на рисунке №7 слишком мелкие, чтобы хоть что-то можно было прочитать, а на рисунке №11 вообще отсутствуют поясняющие подписи, какие кривые соответствуют каким культурам.

В дискуссии приняли участие: Бовин Н.В., Попов В.О., Варламов В.П., Дзантиев Б.Б., Савицкий А.П., Звягильская Р.А.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты**:

1. Созданы две пары конструкций (биплазмидная и бипромоторная) для экспрессии химерных антител к фактору некроза опухоли-альфа в культуре эукариотических клеток СНО DG44, дефицитной по гену дигидрофолатредуктазы *dhfr*.
2. На основе созданных биплазмидных и бипромоторных конструкций получены линии клеток, стабильно экспрессирующие рекомбинантные антитела к фактору некроза опухоли-альфа, оптимизирована стратегия получения и культивирования стабильных продуцентов рекомбинантных антител.
3. Установлено, что на ранних этапах получения стабильной клеточной линии сравнимый уровень продуктивности культуры может быть достигнут при использовании как биплазмидной, так и бипромоторной систем экспрессии. Для достижения высокого уровня продуктивности при концентрации селективного агента метотрексата более 500 нМ оптимальным является использование биплазмидной конструкции, в том числе в сочетании с проведением цитосортировки родительской культуры и клонального отбора.
4. Добавление рекомбинантных белков инсулина, трансферрина и человеческого сывороточного альбумина позволило повысить продуктивность стабильной культуры-продуцента рекомбинантных антител на основе клеток линии СНО на 44% по сравнению с используемой комплексной коммерческой добавкой ITS.

5. Внесение в разработанную среду гидролизатов белков гороха и риса, содержащих пептиды с молекулярной массой ниже 5 кДа, позволило увеличить продуктивность линии на основе клеток СНО в 3,9 и 4,5 раза, соответственно.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что в рамках выполнения работы разработана бипромоторная конструкция для экспрессии рекомбинантных антител в клетках млекопитающих, проведено сравнение эффективности двух вариантов биплазмидной и двух вариантов бипромоторных экспрессионных конструкций, а также их сравнение между собой, разработана эффективная методика культивирования стабильных продуцентов на примере продуцента химерного антитела F10 против фактора некроза опухоли-альфа человека, разработана бессывороточная среда культивирования на основе белков, полученных из неживотных источников, разработана эффективная схема подкормки культуры клеток-продуцентов на основе произведенного гидролизата белков неживотного происхождения.

Практическая значимость работы заключается в том, что обнаруженные в ходе работы закономерности изменения продуктивности клеточных культур стабильных продуцентов рекомбинантных белков важны для понимания оптимальных стратегий селекции и культивирования клеток линии СНО, продуцирующих рекомбинантные антитела. Методики получения, селекции, отбора, ведения и подкормки культур-продуцентов могут быть использованы в дальнейшем для создания стабильных линий-продуцентов белковых препаратов биомедицинского назначения.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

Личный вклад соискателя состоит:

- в получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке публикаций по выполненной работе.

Заключение

Диссертация соискателя Балабашина Д.С. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого набора современных методов, взаимосвязанностью выводов и результатов, а также публикациями в рецензируемых журналах (4 статей) и 3 патентов. Таким образом, из представленных материалов следует, что данная работа выполнена на высоком методическом уровне и содержит решение научной задачи, имеющей важное практическое значение для развития биохимии и биотехнологии получения рекомбинантных иммуноглобулинов в стабильных клеточных линиях-продуцентах.

На заседании 19 мая 2022 года диссертационный совет принял решение присудить Балабашину Дмитрию Сергеевичу ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 10 докторов биологических наук, 8 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета 24.1.233.01.

«За» присуждение ученой степени – 18,

«Против» – 1,

Недействительных бюллетеней – нет.

Председатель

диссертационного совета

ФИЦ биотехнологии РАН

академик

Ученый секретарь диссертационного совета

ФИЦ биотехнологии РАН

кандидат биологических наук



В.О.Попов

А.Ф.Орловский

19 мая 2022 г.