

**Отзыв официального оппонента на диссертацию на соискание степени кандидата биологических наук Балабашина Дмитрия Сергеевича на тему: «Оптимизация процессов селекции и культивирования клеток линии СНО, продуцирующих рекомбинантные антитела против фактора некроза опухоли-альфа человека» по специальности 1.5.4. Биохимия**

Исходя из вышеизложенного не вызывает сомнения актуальность темы диссертационной работы Д.С. Балабашина, направленной на оптимизацию процессов селекции и культивирования клеток-продуцентов рекомбинантного антитела против фактора некроза опухоли-альфа человека. Подготовленная Д.С. Балабашиным диссертация отражает достижение поставленной цели. Полученные результаты свидетельствуют об успешном решении всех поставленных задач с использованием комплекса современных биотехнологических методов и подходов, а также об их эффективности.

Работа Д.С. Балабашина построена по традиционной схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы (179 источников). Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, содержит 33 рисунка и 10 таблиц.

Во вводной части обосновывается актуальность решаемой задачи, даётся общая оценка степени разработанности темы исследования, устанавливается цель и задачи работы, даются итоговые оценки его научной новизны и практической значимости, формулируются выносимые на защиту положения.

Обзор литературы характеризует особенности фактора некроза опухоли-альфа человека и его значение в патогенезе заболеваний. Последовательно описываются существующие методы селекции и отбора линий клеток, стабильно продуцирующих антитела в среду культивирования. Также уделено внимание структурам плазмид и их составу в части количества генов цепей антитела, включенного в состав плазмид, что что подводит к пониманию структуры экспериментальной части работы.

Анализ литературы произведён на высоком уровне и даёт адекватное представление и степени проработки проблемы предшественниками, нерешенных

задачах и существующем методическом инструментарии. Рассмотрено значительное число публикаций, включая результаты исследований последних лет. В целом литературный обзор свидетельствует о высокой квалификации Д.С. Балабашина как специалиста в области биохимии.

В разделе «Материалы и методы» представлены методики, оборудование и материалы, использованные при проведении работ. Д.С. Балабашиным освоены методы синтеза олигонуклеотидов, получения плазмидных конструкций, выделения и очистки плазмидных конструкций, методы трансфекции культуры клеток, метод ведения культуры, методы селекции и отбора культуры-продуцента, методы культивирования для получения препаративных количеств рекомбинантных антител, методы подкормки культуры, методы выделения белков методом аффинной хроматографии. Данный набор методов полностью соответствует задачам исследования. Подробное описание методик обеспечивает однозначную интерпретацию полученных результатов. В целом раздел отражает высокую экспериментальную квалификацию соискателя.

Раздел «Результаты» демонстрирует полноту проведённого исследования, успешность решения всех поставленных задач. Диссертантом проведено конструирование 6 вариантов плазмидных конструкций, несущих гены лёгкой и/или тяжёлой цепей антитела против фактора некроза опухоли-альфа человека. Получены первичные трансфектанты, проведены селекция химическими агентами и отбор культур по уровню продуктивности двумя способами, произведено сравнение продуктивности линий, полученных с использованием различных вариантов плазмидных конструкций и разработаны методы подкормки культуры.

Диссертант использует в работе корректно выбранные методические решения. Измерения проведены корректно, в необходимом количестве повторностей, сопровождаются адекватными контрольными экспериментами. В связи с этим не вызывает сомнения **обоснованность и достоверность** формулируемых положений, выводов и рекомендаций.

**Фундаментальное значение** полученных результатов определяется выбором и успешным применением комплекса современных методов для получения и характеристики стабильных линий-продуцентов рекомбинантных антител.

Методические решения, реализованные в работе, могут быть востребованы при разработке других линий-продуцентов рекомбинантных антител и других белковых препаратов.

**Научно-практическая значимость** разработки определяется созданием эффективной методики получения стабильных продуцентов, её подтверждённой эффективностью на примере создания эффективных линий-продуцентов химеризованного антитела F10 против Фактора Некроза Опухоли-альфа человека.

Диссертационная работа Д.С. Балабашина полностью оригинальна описывает новые, полученные автором результаты, значимые для развития биохимии.

Основные положения и выводы диссертационного исследования опубликованы в 10 работах, включая 4 статьи в журналах из перечня ВАК, 6 докладов на международных конференциях. Также получено 3 патента на изобретение. Все закономерности и выводы, выносимые на защиту в полной мере отражены в публикациях и представлены профессиональному сообществу.

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, описанный 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 также 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 ее.

Вышеизложенные соображения носят частный и дискуссионный характер, не влияют на обоснованность положений диссертации, выносимых на защиту, не умаляют значимости диссертационного исследования и не снижают его положительную оценку. Работа Дмитрия Сергеевича Балабашина «Оптимизация процессов селекции и культивирования клеток линии СНО, продуцирующих рекомбинантные антитела против фактора некроза опухоли-альфа человека» по актуальности темы, объёму проведённых исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов, является законченным самостоятельным исследованием высокого теоретического и экспериментального уровня. Соискателем выполнена научно-квалификационная работа, в которой содержится решение задачи, имеющей важное значение для развития биохимии, - проведена разработка методов повышения продуктивности рекомбинантных белков в клетках линии-продуцента на основе клеток линии млекопитающих.

Диссертация отвечает требованиям, установленным ВАК к работам подобного рода. соответствует критериям, изложенным в п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» утверждённым правительством РФ 24.09.2013 г. №842 и профилю диссертационного совета 24.1.233.01 на базе Федерального государственного учреждения Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. Работа отвечает всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Таким образом, соискатель Дмитрий Сергеевич Балабашин заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент

Доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе  
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,

Шемякин Игорь Георгиевич



Дата

Контактные данные

Тел. +7 (4967) 360060; e-mail: [shemyakin@obolensk.org](mailto:shemyakin@obolensk.org)

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:  
1.5.11 Микробиология

Адрес места работы: Территория «Квартал А», д. 24, р.п. Оболенск, г.о. Серпухов,  
Московская область, 142279. ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора,

Тел. 8 (496) 7360010; e-mail: [info@obolensk.ru](mailto:info@obolensk.ru)

«Подпись сотрудника ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии  
Роспотребнадзора» удостоверяю

Ученый секретарь, доктор биологических наук. Тел.: +7 (4967) 36-00-17, E-mail:  
[kolombet@obolensk.org](mailto:kolombet@obolensk.org)

Дата 14.04.2022

М.П.



Л. В. Коломбет