

## ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук Воробьевой Надежды Евгеньевны на диссертационную работу Балабашина Дмитрия Сергеевича «Оптимизация процессов селекции и культивирования клеток линии СНО, продуцирующих рекомбинантные антитела против фактора некроза опухоли-альфа человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия

### **Актуальность темы исследования**

Диссертационная работа Балабашина Дмитрия Сергеевича посвящена оптимизации процессов селекции клеток линии СНО, продуцирующих рекомбинантные антитела. В настоящее время лекарственные препараты на основе рекомбинантных антител прочно вошли в протоколы лечения многих заболеваний. В частности, без использования данного класса лекарственных препаратов невозможно представить себе лечение тяжелых форм онкологических и аутоиммунных заболеваний. К сожалению, до сих пор рекомбинантные антитела остаются сравнительно дорогим препаратом. Для большинства пациентов лечение препаратами рекомбинантных антител возможно только с использованием государственной финансовой поддержки. Так как некоторые препараты антител были разработаны давно и для них уже истек срок действия патентов, рекомбинантные антитела в настоящее время являются крайне перспективным направлением разработки препаратов-дженериков.

Приведенная мной выше информация наглядно демонстрирует насколько перспективной темой является направление исследований по возможности оптимизации экспрессии рекомбинантных препаратов антител. Повышение эффективности экспрессии рекомбинантных антител даст возможность снизить себестоимость ранее разработанных препаратов данного типа, а также снизит затраты на разработку новых.

Стоит отметить, что ценность диссертационной работы Балабашина Дмитрия состоит именно в сравнительном анализе подходов для выведения клеточных линий, продуцирующих рекомбинантные антитела, а также условий для экспрессии целевого белка. Свой анализ Дмитрий проводил на клеточной линии СНО, продуцирующей химерные антитела к фактору некроза опухолей человека (ФНО). Данные антитела являются крайне популярным лекарственным препаратом, их производство уже реализовано в Российской Федерации (Инфликсимаб). В связи с этим, выведение экспрессионных линий данных антител вряд ли может быть самостоятельной целью для диссертационной работы. Однако, использование клеточных линий, экспрессирующих ранее охарактеризованные антитела, является вполне адекватной стратегией для проведения исследований условий экспрессии. Которая и была использована Дмитрием в ходе выполнения диссертационной работы.

Балабашиным Дмитрием были созданы несколько видов экспрессионных конструкций для продукции химерных антител к ФНО в клетках СНО. Экспрессия препарата антител, содержащих в своем составе два типа полипептидов требует аккуратного проектирования экспрессионных конструкций, которое позволит продуцировать требуемые субъединицы в

эквиволярном соотношении. Дмитрием были использованы разные типы стратегий для экспрессии легких и тяжелых субъединиц антител – работа с биплазмидными и бипромоторными конструкциями. Стоит отметить, что оба подхода оказались приемлемыми для экспрессии антител в модельной системе, использованной Дмитрием для работы.

Отдельно стоит отметить работу Дмитрия по созданию добавок, способствующих эффективной продукции антител в бессывороточных средах. Использование бессывороточных сред в ходе экспрессии рекомбинантных лекарственных белков является производственной необходимостью, так как позволяет существенно снизить затраты на очистку экспрессированных препаратов. В тоже время, стоимость бустирующих добавок иностранных производителей является крайне высокой и существенно удорожает себестоимость экспрессии рекомбинантных антител. Роль Дмитрия в разработке питательных бустирующих добавок подтверждена получением патентов на изобретения, в которых Дмитрий является соавтором.

### **Структура диссертации**

Диссертационная работа Балабашина Дмитрия построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов, методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы.

Введение содержит научную и практическую значимость работы. Следует отметить, что данный раздел больше похож на описание результатов исследования и недостаточно хорошо вписывает в имеющийся контекст результаты диссертационной работы. Положения, выносимые на защиту, в целом сформулированы корректно, соответствуют заявленным целям, хотя лучше было бы их сформулировать более конкретно. Достоверность полученных результатов подтверждена публикациями автора в научных журналах и оформленными патентами. Результаты, полученные автором, были представлены им на многих конференциях.

Обзор литературы состоит из 11 небольших разделов, каждый из которых содержит предпосылки для отдельных задач диссертационной работы. Стоит отметить, что обзор литературы дает достаточно подробное описание стратегий, близких к тем, которые были использованы в диссертационной работе. Однако, он дает недостаточный литературный контекст – мало внимания уделено анализу выбранных подходов по сравнению с альтернативными методиками. В частности, отсутствует сравнительная характеристика различных клеточных линий, экспрессионных векторов и регуляторных элементов (промоторов) для продукции рекомбинантных антител. В данной диссертации присутствие главы, сравнивающей эффективность работы экспрессионных промоторов в клетках СНО, было бы крайне уместно. Литературный обзор было бы легче воспринимать, если бы в нем было представлено больше графического материала. Особенно недостаток графического материала ощущается при описании различных видов экспрессионных конструкций.

Глава «Методы» содержит подробное описание использованных в работе методик. Протоколы достаточно подробны и могут быть воспроизведены. Стоит отметить, что происхождение некоторых реагентов указано недостаточно подробно. В частности, отсутствует указание на происхождение вторичных антител, которые использовались в

работе для анализа при помощи ИФА и цитометрии. Так как, в данном случае, при помощи антител характеризовалась продуктивность клеточной линии, то есть была получена существенная часть результатов работы, то необходимо максимально точно описывать их происхождение (производитель, номер в каталоге, номер клона и желательно ссылку на характеризующий их литературный источник). В противном случае специфичность используемых антител должна быть охарактеризована в ходе работы.

Глава «Результаты» изложена достаточно подробно и хорошо проиллюстрирована. Хотелось бы отметить недостаточную аккуратность в составлении подписей к рисункам. Во многих случаях они недостаточно подробны (например, в Рисунке 1 полностью отсутствует расшифровка обозначений, использованных в рисунке). Некоторые части – клонирование экспрессионных конструкций и большая часть описания автоматической селекции экспрессионных клонов – были бы более уместны в разделе «Методы», чем в разделе «Результаты». Некоторые подразделы «Результатов» не содержат достаточного описания материалов исследования – в частности, в подразделах 4.13 и 4.14 нигде не указано какая линия клеток была использована в экспериментах.

Глава «Обсуждение» суммирует результаты представленной диссертационной работы и интегрирует полученные в ходе исследования результаты в литературный контекст. Стоит отметить, что описание автоматической селекции экспрессионных клонов и здесь представлено излишне подробно, в ущерб другим частям «Обсуждения».

В ходе изучения диссертационной работы Балабашина Дмитрия возникает ряд замечаний к представленным результатам и их обсуждению:

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 плаزمидных системах 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 обоих 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 MTX) привести к утере конструкции с тяжелой цепью в линии S1 на первых этапах селекции? Не пробовали ли вы проводить альтернативный вариант последовательной селекции G418 -> MTX? 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 MTX. Подтвердите пожалуйста или опровергните данную догадку. Данное замечание 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.

Ряд менее значимых замечаний:

1. 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.
2. 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.
3. 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
4. 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?

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным ВАК к диссертациям на соискание степени кандидата биологических наук. Соответствует критериям, изложенным в п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» утверждённым правительством РФ 24.09.2013 г. №842 (с изменениями на 11 сентября 2021 г.) 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.

Диссертация Дмитрия Сергеевича Балабашина представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, выполненную автором на высоком экспериментальном уровне. Таким образом, соискатель Дмитрий Сергеевич Балабашин заслуживает

присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

старший научный сотрудник

*В.В.У.*

Воробьева Надежда Евгеньевна

руководитель группы динамики транскрипционных комплексов

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института биологии гена Российской академии наук

кандидат биологических наук

*22.04.22.*

Контактные данные:

Тел: +7 (926) 279 0219

E-mail: vorobyeva@genebiology.ru

Подпись сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биологии гена Российской академии наук Воробьевой Н.Е. удостоверяю:

Ученый секретарь

Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки

Института биологии гена Российской академии наук

Доктор биологических наук



*[Handwritten signature]*  
Набирочкина Елена Николаевна