



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@eimb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

15.06.2022 № 12312-2171

На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора
ФБГУН Института молекулярной
биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
кандидат химических наук



Иванов Александр Владимирович
« _____ » 2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН о научно-практической ценности диссертационной работы БАЛАБАШИНА ДМИТРИЯ СЕРГЕЕВИЧА «ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ СЕЛЕКЦИИ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ЛИНИИ СНО, ПРОДУЦИРУЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ-АЛЬФА ЧЕЛОВЕКА», представленную к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – «Биохимия»

Диссертация Д.С. Балабашина посвящена разработке новых подходов к селекции и отбору культур-продуцентов рекомбинантных антител и оптимизации продукции рекомбинантных антител в среду культивирования. В качестве модельного антитела

было взято антитело F10 против фактора некроза опухоли-альфа человека. Антитела против ФНО-а используются для терапии таких заболеваний, как ревматоидный артрит, псориаз, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит, болезнь Крона и других ФНО-а опосредованных заболеваний.

Основными направлениями исследования в диссертации являются оптимизация получения стабильных линий клеток-продуцентов рекомбинантных антител и оптимизация культивирования стабильных линий клеток-продуцентов. Оптимизация осуществляется путём создания в ходе работы бессывороточной среды культивирования с полностью известным составом и с применением подкормки в виде гидролизованных белков неживотного происхождения.

Диссертация имеет стандартную структуру и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, заключения и списка цитируемой литературы. Текст работы изложен на 145 страницах, содержит 33 изображения и 10 таблиц.

Обзор и анализ литературных источников по теме исследования разделён на три основные части, первая из которых посвящена описанию фактора некроза опухоли-альфа, а также антител к нему, перспективам развития сегмента рынка и фармакологическому потенциалу данных антител. Во второй части обзора и анализа литературных источников по теме исследования описываются клеточные линии, наиболее перспективные с точки зрения эффективности в отношении уровня продуктивности антител, а также векторные конструкции, содержащие одну или две цепи антитела в своём составе. В третьей части обзора и анализа литературных источников по теме исследования автор знакомит нас с методами отбора наиболее эффективных продуцентов рекомбинантных белков – селекцией, сортировкой, отбором и ведением с применением подкормки.

Применяемые в работе материалы и методы изложены в соответствующем разделе на 22 страницах. В тексте детально описаны генно-инженерные, молекулярно-биологические, иммунохимические, биохимические методы, а также методы

культивирования линий-продуцентов, использованные автором. Также приведены наименования реактивов и оборудования задействованных в ходе работы.

В разделе «Результаты» разбираются основные результаты, полученные в ходе работы. Данный раздел начинается с глав, в которых описывается получение экспрессионных конструкций для продукции антител против фактора некроза опухоли-альфа человека. После следуют две главы, посвящённые определению эффективности трансфекции, получению стабильных продуцентов на основе биплазмидных конструкций и сравнение основных характеристик культур на основе биплазмидной системы экспрессии. На основании приведённых результатов автором делается вывод о том, что метод произвольного культивирования с низкой плотностью посева при произвольном культивировании позволил добиться наибольшего выхода биосинтеза антител, а при рассмотрении метода культивирования в гидрогелевых микрокапсулах и микрогранулах о том, что продукция клеток CHO DG44, заключенных в полимерные микрокапсулы, превышала уровень продукции белка при суспензионном режиме культивирования в любом из его видов. В разделах «Цитосортировка», «Внутриклеточная экспрессия лёгкой и тяжёлой цепей антитела в культурах S1 и S3», «Разные комбинации экспрессионных плазмид» и «Эффект от увеличения концентрации МТХ свыше 500 нМ» и «Введение дополнительных питательных веществ в ходе культивирования» автором предпринята попытка сортировки клеток по относительному количеству антител, представленному на поверхности мембраны культуры-продуцента и на основании результатов делается два основных вывода:

- 1) применение метода наиболее эффективно для культур клеток, несущих ген лёгкой цепи в составе одной плазмиды с селекционным маркером, представленным в виде гена dhfr;
- 2) после селективного отбора в некоторых случаях возможно повторное обогащение культур с применением метода FACS даже при превышении концентраций селективных агентов выше описанных в литературных источниках.

В группе последующих экспериментальных результатов следует отметить главу «Сравнение биплазмидной и бипромоторной систем экспрессии» в которой автор сравнивает уровни продукции биплазмидной и бипромоторной систем экспрессии и приходит к заключению о перспективности обеих систем и постулирует, что различия в гетерогенности возникают из-за метода селекции культур. Так, в случае культур S1 и S3 селекция велась с использованием двух различных селективных агентов — МТХ и G418, направленных на отбор клеток, содержащих гены лёгкой и тяжёлой цепей антитела против ФНО-а привнесённых отдельными векторами. Напротив, при селекции линий клеток S2, S8, S11 и S13 селекция велась по пути, предполагающим эквимолярное увеличение количества единиц генов легкой и тяжелой цепей данного антитела. На основании приведённых в работе результатов автор приходит к выводу, 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.

В заключительной части автор представляет результаты оптимизации среды культивирования путём создания среды с известным химическим составом на основе среды IMDM с добавлением рекомбинантных белковых препаратов инсулина, трансферрина и человеческого сывороточного альбумина и показывает, что добавление рекомбинантных белков инсулина, трансферрина и человеческого сывороточного альбумина позволяет повысить продуктивность стабильной культуры-производителя рекомбинантных антител на основе клеток линии CHO на 44% по сравнению с используемой комплексной коммерческой добавкой ITS. Разработка методики культивирования линии-производителя для увеличения уровня продукции целевого белка с применением гидролизатов на основе белков гороха и риса, содержащих пептиды с молекулярной массой ниже 5 кДа, привела к

увеличению продуктивности линии на основе клеток СНО в 3.9 и 4.5 раз, соответственно.

По материалам диссертации опубликовано 4 научные статьи в рецензируемых научных журналах. Полученные результаты представлены на 6 конференциях, на основании сделанных разработок зарегистрировано 3 патента РФ, что подтверждает практическую значимость диссертационной работы.

Положительно оценивая работу в целом, можно отметить следующие 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.

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 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.

На основании рассмотрения диссертации и автореферата ведущая организация считает, что 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.

Отзыв обсуждён и одобрен на заседании межлабораторного коллоквиума лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений, лаборатории биохимии вирусных инфекций и лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний 23 декабря 2021 г..



Кочетков Сергей Николаевич, доктор химических наук, специальность 03.01.03 – молекулярная биология, профессор, академик РАН, зав. лабораторией, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН.

e-mail: snk1952@gmail.com