

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Синегубовой Марии Валерьевны

«Получение фармацевтически значимых гликопротеинов в клетках яичника китайского хомячка»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальностям 1.5.4. Биохимия, 1.5.6. Биотехнология

Актуальность темы

Диссертационная работа Синегубовой М.В. посвящена созданию промышленно пригодных линий-продуцентов фармацевтически значимых гликопротеинов и масштабированию процессов их выделения и очистки. В работе проведена оптимизация экспрессионного вектора, получены стабильные продуценты рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2 и хорионического гонадотропина человека, а также выполнена комплексная валидация многостадийного процесса очистки рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона человека. Актуальность полученных данных несомненна, поскольку разработка отечественных технологий получения биоаналогичных лекарственных препаратов и диагностических реагентов является одной из приоритетных задач современной биофармацевтики, а успешный трансфер результатов в промышленное производство подтверждает их практическую востребованность.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Исследование, проведенное Синегубовой М.В., имеет практическую значимость, поскольку разработанные в его рамках подходы к балансировке экспрессии субъединиц гетеродимерных белков, конструированию экспрессионных кассет и оптимизации хроматографических процессов носят универсальный характер и могут быть применены для получения других фармацевтически значимых гликопротеинов. Результаты валидации процесса очистки рФСГч были непосредственно перенесены в промышленное производство: на момент написания диссертации выпущено более 60

промышленных партий препарата с воспроизводимыми от серии к серии характеристиками, что является наиболее весомым доказательством практической полезности выполненной работы.

Характеристика разделов работы

Диссертационная работа имеет стандартные разделы: «введение», «обзор литературы», «материалы и методы», «результаты и их обсуждение», «заключение», «выводы» и «список литературы». Работа изложена на 180 страницах и включает 39 рисунков, 14 таблиц, 366 ссылок и 1 приложение.

В главе «Обзор литературы» рассмотрены современные подходы к экспрессии рекомбинантных гликопротеинов в клетках млекопитающих, типы экспрессионных векторов и селекционных систем, особенности биосинтеза и секреции гетеродимерных белков, а также методы выделения и очистки терапевтических гликопротеинов. Обзор даёт достаточно полное представление о состоянии области.

В главе «Материалы и методы» дано описание используемых методов, материалов и объектов исследования. Раздел включает описание методов молекулярного клонирования, культивирования клеток млекопитающих в различных режимах (периодическом и с подпиткой), трансфекции, селекции и амплификации, а также методов хроматографической очистки белков с использованием коммерчески доступных сорбентов. Приведены аналитические методики контроля качества продуктов.

В первой части главы «Результаты и обсуждение» представлены данные по оптимизации экспрессионного вектора p1.1. Диссертантом проведена систематическая работа по минимизации вектора, показано, что укороченный вариант p1.1-Tr2 размером 7,4 т.п.о. сохраняет продуктивность и стабильность на уровне полноразмерной плазмиды. Установлено, что долгосрочная стабильность экспрессии достигается за счёт совместного действия компактной регуляторной области гена EEF1A1 и фрагмента EBVTR. Данная платформа успешно применена для создания продуцентов RBD и ХГч.

Далее диссертантом описано получение и оптимизация рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2. За счёт удаления непарного

цистеина, замены сигнального пептида и двухшаговой геномной амплификации титр белка увеличен до 50 мг/л за 8 дней культивирования. Показано, что переход от сорбента Ni-IDA к Ni-NTA позволил улучшить чистоту продукта на стадии металлохелатной хроматографии. Разработан тест суррогатной вирус-нейтрализации, оптимизированный для рутинного клинического применения.

В части, посвящённой гликопротеиновым гормонам, диссертантом выполнено систематическое сравнение эффективности гетерологичных сигнальных пептидов на секрецию β -цепей ФСГ, ЛГ, ХГ и ТТГ. Показано, что сигнальный пептид человеческого сывороточного альбумина является наиболее универсальным. При получении продуцента ХГч предложен подход с диагностикой стехиометрии цепей и дополнительной трансфекцией геном дефицитной субъединицы со вторым селекционным маркером, что позволило вдвое увеличить выход гетеродимера. Полученная клональная линия S-pTr2-hCG-8 в оптимизированных условиях культивирования с подпиткой обеспечивает титр 123–143 мг/л и сохраняет продуктивность в течение 60 генераций. Установлено, что выбор родительской сублинии CHO (DG44 или S) критически определяет профиль гликозилирования продукта.

Заключительный блок посвящён валидации процесса очистки рФСГч. На уменьшенных лабораторных моделях определены динамическая ёмкость связывания и оптимальные времена контакта для пяти хроматографических сорбентов, доказана сохранность их свойств в течение 40 циклов эксплуатации. Детально исследована динамика утечки камелидных мини-антител с иммуноаффинного сорбента и показано их эффективное удаление на последующих стадиях. Результаты масштабирования подтверждены данными выпускающего контроля качества промышленных партий.

В разделах «Заключение» и «Выводы» в краткой форме представлены основные итоги диссертационной работы. Построение диссертационной работы логично, осмысленно.

Имеются несколько замечаний:

1. Для процесса очистки рФСГч оптимизация проведена на уменьшенных моделях с масштабированием от 1:50 до 1:700. Однако в работе не представлено прямого сравнения профилей элюции или показателей чистоты продукта для лабораторного и промышленного масштабов. Подтверждалась ли эквивалентность уменьшенной модели и промышленного процесса?

2. При оценке стабильности продуктивности клональных линий-продуцентов ХГч диссертант отмечает, что клон 18 продемонстрировал пятикратное падение продуктивности за 60 дней, однако возможные механизмы такой нестабильности не обсуждаются. Проводился ли анализ числа копий трансгена или состояния хроматина в нестабильных клонах, что позволило бы сформулировать критерии раннего отбора стабильных продуцентов?

3. Какие контроли были использованы при проведении цитометрического анализа, оценивалась ли жизнеспособность клеток, и учитывались ли при интерпретации результатов показатели средней интенсивности флуоресценции? Как исключалась возможность ложноположительного сигнала, связанного с гибелью клеток или изменением их аутофлуоресценции?

4. Каким образом вы оценивали влияние инженерной модификации векторной конструкции p1.1-Tr2 на биохимические свойства и гомогенность экспрессируемого белка, и какие параметры считали определяющими для выбора оптимального варианта?

5. Можно ли утверждать, что именно инженерная модификация векторной платформы p1.1-Tr2, а не только условия селекции и клонирования, является определяющим фактором наблюдаемой стабильности экспрессии и уровня синтеза целевого белка, и какие данные позволяют отделить вклад конструкции от вклада клеточного контекста и позиции интеграции?

Работа заслуживает высокой оценки, все выносимые на защиту положения обоснованы. Исследования проведены на высоком уровне с использованием широкого арсенала методов, экспериментальные результаты

подробно изложены и разумно интерпретированы. Выводы чётко сформулированы. Полученные результаты вносят значительный вклад в развитие технологий получения рекомбинантных гликопротеинов и масштабирования процессов их очистки.

Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертационной работы. Материалы диссертации были апробированы на конференциях, опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых Web of Science и Scopus, защищены патентом.

Заключение

Диссертационная работа Синегубовой Марии Валерьевны «Получение фармацевтически значимых гликопротеинов в клетках яичника китайского хомячка», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.4. Биохимия, 1.5.6. Биотехнология, полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а её автор, Синегубова М.В., заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.4. Биохимия, 1.5.6. Биотехнология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ПМБ)

142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», д. 24. firstova@obolensk.org, тел.: + 79099682723

«25» 2026 г.


Фирстова Виктория Валерьевна

Я, Фирстова Виктория Валерьевна, настоящим даю согласие на размещение моих персональных данных на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН и в Федеральной информационной системе

государственной научной аттестации, включение их в аттестационное дело
соискателя и дальнейшую обработку.

«25» мая 2026 г.



Фирстова В.В.

Подпись Фирстовой В.В. заверяю:

Ученый секретарь

ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора

доктор биологических наук



Коломбет Л.В.

«25» мая 2026 г.