

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 получению и всесторонней биохимической характеристике рекомбинантных гликопротеинов фармацевтического назначения в клетках яичника китайского хомячка (СНО). В работе детально исследованы структурные детерминанты, определяющие эффективность секреции сложных гетеродимерных белков, проведена рациональная оптимизация структуры рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2 и разработан тест суррогатной вирус-нейтрализации, основанный на конкурентном взаимодействии антител с рецептором АПФ2. Актуальность полученных данных несомненна, поскольку они расширяют понимание механизмов котрансляционной транслокации и укладки гликопротеинов, роли сигнальных пептидов в этих процессах и факторов, определяющих профиль гликозилирования рекомбинантных гормонов. Результаты работы также имеют прямое отношение к созданию лекарственных препаратов и диагностических реагентов, востребованных в клинической практике.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Исследование, проведенное Синегубовой М.В., имеет теоретическую значимость, поскольку даёт представление о механизмах, определяющих эффективность секреции гетеродимерных гликопротеиновых гормонов при использовании гетерологичных сигнальных пептидов. Установленный факт идентичности профиля гликозилирования (Z-индекса) полученного хорионического гонадотропина человека таковому у оригинального препарата является важным результатом, показывающим, что разработанная платформа способна обеспечить не просто высокий выход продукта, но и корректный фолдинг и посттрансляционный процессинг молекулы. Практическая значимость подтверждена тем, что разработанный тест суррогатной вирус-нейтрализации нашёл применение в клиническом скрининге, а линия-продуцент RBD SARS-CoV-2 использована в производстве диагностических тестов.

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 разделе «Введение» диссертант кратко описывает область исследований, обсуждает актуальность работы, представлены актуальность работы, описывает состояние исследований на момент начала выполнения диссертационной работы, формулирует цель и задачи исследования, научная новизна полученных результатов, их теоретическая и практическая значимость, излагает методологию и перечисляет методы исследования, перечисляет выносимые на защиту положения, дает информацию о публикации и апробации результатов, свидетельствующих о степени достоверности результатов и раскрывается свой личный вклад в исследование.

В главе «Обзор литературы» рассмотрены ключевые аспекты экспрессии рекомбинантных гликопротеинов в клетках млекопитающих, регуляторные элементы экспрессионных векторов, роль сигнальных пептидов в секреции и современные подходы к очистке терапевтических белков. Обзор даёт достаточно полное представление о состоянии области. Автор действительно емко излагает проблемы различных стадий разработки продуцентов целевых белков в используемой системе.

В главе «Материалы и методы» дано описание используемых методов, материалов и объектов исследования. Раздел включает описание методов молекулярного клонирования, работы с культурами клеток млекопитающих, очистки белков, а также аналитических методик: проточной цитометрии, иммуноферментного анализа, вестерн-блоттинга, ПЦР в реальном времени, поверхностного плазмонного резонанса, ВЭЖХ-анализа гликанов, MALDI-TOF масс-спектрометрии и изоэлектрического фокусирования. Раздел практически исчерпывающий.

В первой части главы «Результаты и обсуждение» представлены данные по оптимизации экспрессионного вектора p1.1 на основе гена EEF1A1 китайского хомячка. На примере модельного белка eGFP диссертантом установлено, что некодирующие участки гена EEF1A1 могут быть в значительной степени удалены без существенной потери стабильности уровня экспрессии. Показано, что плазмиды на основе EEF1A1-промотора более стабильны при длительном культивировании в неселективных условиях, чем плазмиды на основе CMV-промотора. Убедительно продемонстрировано, что долгосрочная

стабильность экспрессии достигается за счёт совместного действия двух элементов: компактной регуляторной области гена EEF1A1 и фрагмента EBVTR.

Далее диссертантом описано получение и структурная оптимизация рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2. Показано, что удаление непарного остатка цистеина Cys538 и прилегающих аминокислот позволило снизить долю ковалентного димера с 31 % до 6 %. На основе оптимизированного антигена и рекомбинантного растворимого АПФ2 разработан тест суррогатной вирус-нейтрализации. Проведено сравнение двух схем анализа, установлено, что схема с иммобилизованным RBD и конъюгатом АПФ2-HRP предпочтительна по стабильности компонентов. Валидация на 73 образцах сывороток реконвалесцентов показала высокую корреляцию с классической вирус-нейтрализацией (коэффициент Спирмена 0,855).

В части, посвящённой гликопротеиновым гормонам, выполнено систематическое исследование влияния гетерологичных сигнальных пептидов на секрецию β -цепей ФСГ, ЛГ, ХГ и ТТГ. Наибольший эффект продемонстрировал сигнальный пептид человеческого сывороточного альбумина. Данные количественной ПЦР-РВ и вестерн-блоттинга доказывают, что прирост продуктивности обусловлен именно эффективностью посттрансляционных событий, а не различной копийностью трансгена. При получении продуцента ХГч диссертантом предложен подход с анализом стехиометрии экспрессии цепей и дополнительной трансфекцией геном дефицитной субъединицы, что позволило вдвое увеличить выход гетеродимера. Комплексный анализ очищенного ХГч методами гель-электрофореза, изоэлектрического фокусирования, ВЭЖХ-анализа N-гликанов и MALDI-TOF масс-спектрометрии продемонстрировал сопоставимость физико-химических свойств и биологической активности полученного гормона с оригинальным препаратом.

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

К диссертации имеется ряд вопросов, большинство из которых является не критикой, но научной дискуссией:

- 1) В разделе 3.5.5 приведены данные о подборе оптимальных условий культивирования клеток, продуцирующих ХГч. В частности, анализировались различные культуральные среды, подпитки, температура культивирования). Проводилась ли сходная оптимизация для продуцентов других белков, и если нет, то почему?

- 2) В целом, в работе нет четкого анализа влияния культуральных сред/подпиток и обоснования выбора использованных сред.
- a) При этом в обзоре литературы автор говорит о влиянии уровней глюкозы и галактозы как минимум на статус гликозилирования белков, и важности сред в принципе. Можно ли на основании экспериментальных данных сделать выводы о роли определенных нутриентов в обеспечении высокоэффективной наработки белков в клетках CHO? Есть ли данные о том, какие компоненты среды активно поглощаются и истощаются при наработке белков? Возможно, их истощение может лимитировать наработку.
 - b) Обзор литературы, стр. 25. Уже упомянутое выше обсуждение влияния галактозы на статус гликозилирования рекомбинантных белков: нет ли данных, связан ли эффект с переключением метаболического статуса клеток с гликолиза на окислительное фосфорилирование, или имела место просто доступность самих вариантов углеводов?
 - c) Там же упоминается добавление ряда аминокислот, включая цистеин. Вообще импортируемой формой цистеина является его димер - цистин. Интересно, что его импорт обычно сопряжен с экспортом глутамата, который образуется из глутамина (глутаминализ). В диссертационной работе же использовали глутаминсинтазу как маркер селекции. Может ли по мнению диссертанта такая система приводить к истощению пула цистеина (и как следствие глутатиона), что может оказывать влияние на продукцию целевого белка?
 - d) Подраздел обзора литературы 1.2.1 «Разработка и оптимизация культуральных сред» представляется избыточно лаконичным и лишенным важных деталей.
 - e) В обзоре литературы говорится, что при недостаточности кислорода может быть чрезмерное закисление культуральной среды лактатом. Работы в области метаболомики последних 10 лет демонстрируют, что лактат в организме активно поглощается клетками различных органов для синтеза пирувата. А есть ли такие данные для клеток CHO, и может ли лактат выступать в качестве «источника углерода» для цикла Кребса?
 - f) В оглавлении говорится, что подраздел 2.5.5 Экспериментальной части должен содержать методики измерения глюкозы и лактата, однако сам раздел говорит лишь об измерении глюкозы.
- 3) При обсуждении правил работы с патогенами в диссертации говорится о международной системе уровней BSL. Целесообразным было бы упомянуть и российскую классификацию групп патогенности микроорганизмов (ПБА), которая является обратной BSL.

- 4) В диссертации автор противопоставляет разработанную систему количественного анализа нейтрализующих антител к рецептор-связывающему домену шипоподобного белка вируса SARS-CoV-2, основанную на иммуоферментном анализе, работе с инфекционным вирусом. Наверное, стоило бы упомянуть и альтернативные системы, основанные на псевдотипированных лентивирусах, которые активно применяются в области, в том числе в России.
- 5) Необходимо аккуратнее и подробнее описать статистику в подписи к рисунку 15.
- 6) Экспериментальная часть
 - a) Данный раздел был бы абсолютно полным, если бы автор привел методику получения компетентных клеток.
 - b) Многократно используемая формула «Na-PO₄» является некорректной с химической точки зрения. Наверное, автору стоило бы писать вместо нее «натрий-фосфатный буфер».
- 7) В тексте присутствуют крайне малочисленные опечатки, напр., при использовании линии клеток СНО с 1897 года.

Вместе с тем, указанные замечания и вопросы являются техническими и касаются продолжения данного направления исследований. Как следствие, не умаляют высокой значимости диссертационного исследования. 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 существенно расширяют представление о механизмах секреции гетеродимерных гликопротеинов, роли сигнальных пептидов в котрансляционной транслокации и структурных детерминантах, определяющих антигенную специфичность рекомбинантных белков.

Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертационной работы. Материалы диссертации были апробированы на конференциях, опубликованы в шести рецензируемых научных изданиях, индексируемых Web of Science и Scopus. В пяти из них диссертант является первым автором, что говорит о его вкладе в работу.

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, заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук» (ИМБ РАН)

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32, стр. 1

aivanov@yandex.ru

+7-925-068-3630

«02» июня 2026 г.



Иванов Александр Владимирович

Я, Иванов Александр Владимирович, 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.

«02» июня 2026 г.



Иванов Александр Владимирович

Подпись д.б.н. Иванова Александра Владимировича удостоверяю.

Ученый секретарь ИМБ РАН

К.ф.-м.н.

«02» июня 2026 г.



Коновалова Елизавета Владимировна