

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук
(ИБГ РАН)

Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334

Тел.: (499)135-60-89, (499)135-98-84 Факс: (499)135-41-05

e-mail: info@genebiology.ru; <http://www.genebiology.ru>

ОКПО 00244660 ОГРН 1027739618037 ИНН/ КПП 7736020369/773601001

21 мая 2026

№ 12318 - 99

На №

от



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИБГ РАН

академик РАН Георгиев П.Г.

ОТЗЫВ

ведущей организации 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 выполненной работы

Создание высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов рекомбинантных гликопротеинов составляет сегодня одну из центральных задач биофармацевтической отрасли. Особенную остроту эта проблема приобрела в период пандемии COVID-19, когда возникла колоссальная потребность в диагностических реагентах и терапевтических молекулах, производимых в беспрецедентных масштабах и с гарантированно воспроизводимым качеством. Именно на решение такого рода задач нацелена диссертационная работа Синегубовой Марии Валерьевны, в которой выстроен полный технологический цикл — от молекулярного дизайна экспрессионных конструкций до переноса разработанных процессов в промышленное производство.

Крайне важно, что автор не ограничивается получением единственного продукта, а создаёт и испытывает универсальную векторную платформу, тестирует её на

диагностическом антигене RBD SARS-CoV-2 и двух представителей семейства гликопротеиновых гормонов человека — хорионическом гонадотропине (ХГч) и фолликулостимулирующем гормоне (ФСГ). Такой охват материала позволяет не только продемонстрировать надёжность разработанных инструментов, но и выявить фундаментальные закономерности, управляющие эффективностью секреции сложных гетеродимерных белков. Не менее значимой представляется и выполненная автором валидация хроматографических процессов в масштабе, приближенном к производственному, что напрямую повлияло на успешный выпуск десятков промышленных серий лекарственного препарата. Всё это определяет высокую актуальность и очевидную практическую востребованность представленного исследования.

Научная новизна исследований и полученных результатов

К наиболее значимым новым результатам диссертационной работы относятся следующие.

Впервые на примере модельного белка eGFP установлено, что некодирующие участки гена EEF1A1 китайского хомячка, фланкирующие целевой ген в экспрессионной плазмиде p1.1, могут быть удалены без существенной потери стабильности экспрессии при длительной культивации в неселективных условиях. Показано, что укороченный вариант p1.1-Tr2 сохраняет продуктивность и стабильность на уровне полноразмерного вектора, а долгосрочная стабильность достигается за счёт совместного действия компактной регуляторной области EEF1A1 и фрагмента EBVTR.

Разработан рекомбинантный мономерный вариант рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2, лишённый непарного остатка цистеина. Удаление Cys538 и корректировка границ домена устранили склонность белка к формированию ковалентных гомодимеров (доля димерной формы снижена с 31 % до 6 %). На основе полученного RBD и рекомбинантного растворимого АПФ2 разработан тест суррогатной вирус-нейтрализации; показано, что схема с иммобилизованным RBD и конъюгатом АПФ2-HRP превосходит альтернативный дизайн по стабильности компонентов и коррелирует с классической вирус-нейтрализацией (коэффициент Спирмена 0,855).

Впервые для всех четырёх гликопротеиновых гормонов (ФСГ, ЛГ, ХГ, ТТГ) проведено систематическое исследование влияния гетерологичных сигнальных пептидов на секрецию β -цепей. Установлено, что сигнальный пептид человеческого сывороточного альбумина является наиболее универсальным и обеспечивает статистически значимое

увеличение продуктивности по гетеродимерной форме. Данные количественной ПЦР-РВ и вестерн-блоттинга доказывают, что прирост продуктивности обусловлен повышением эффективности посттрансляционных событий, а не различной копийностью трансгена.

При получении продуцента ХГч разработан подход, включающий анализ стехиометрии экспрессии α - и β -субъединиц в стабильно трансфицированных популяциях и последующую трансфекцию конструкцией, несущей ген дефицитной цепи и второй селекционный маркер. Подход позволил сбалансировать экспрессию цепей и увеличить выход гетеродимера более чем вдвое.

Впервые проведена комплексная оценка промышленной пригодности многостадийного процесса очистки рФСГч с использованием уменьшенных лабораторных моделей. Определены динамическая ёмкость связывания и оптимальные времена контакта для пяти хроматографических сорбентов, доказана сохранность их свойств в течение 40 циклов эксплуатации, детально охарактеризована динамика утечки камелидных мини-антител с иммуноаффинного сорбента и степень их удаления в полном процессе очистки.

Теоретическое и практическое значение работы

Теоретическая ценность работы состоит в расширении представлений о механизмах регуляции экспрессии трансгенов в клетках СНО, о роли сигнальных пептидов в котрансляционной транслокации гетеродимерных белков и о факторах, определяющих долговременную стабильность продуктивности. Предложенные принципы балансировки экспрессии субъединиц и конструирования кассет с элементами EEF1A1 и EBVTR универсальны и применимы к другим фармацевтически значимым гликопротеинам. Экспериментально обоснован тезис о том, что выбор родительской сублинии СНО критически определяет профиль гликозилирования и качество продукта.

Практическая значимость подтверждена внедрением результатов исследования. Линия-продуцент RBD SARS-CoV-2 использована в производстве диагностических тестов, а разработанный тест сВНТ — в клиническом скрининге. Продуцент ХГч служит источником субстанции для лекарственного препарата, применяемого в программах ВРТ; гормон по физико-химическим свойствам и биологической активности признан биоаналогичным оригинальному. Результаты валидации очистки рФСГч перенесены в промышленное производство: выпущено более 60 партий препарата со стабильными

характеристиками, что является наиболее весомым доказательством практической полезности работы.

Обоснованность и достоверность полученных данных

Достоверность результатов обеспечена применением широкого набора взаимодополняющих методов (проточная цитометрия, ИФА, вестерн-блоттинг, количественная ПЦР-РВ, SPR, ВЭЖХ-анализ гликанов, MALDI-TOF масс-спектрометрия, изоэлектрическое фокусирование), что позволяет перекрёстно верифицировать ключевые выводы. Все эксперименты выполнены с необходимыми контролями и в нужном количестве повторностей, статистическая обработка проведена с использованием адекватных критериев (t-критерий Стьюдента, дисперсионный анализ с тестом Тьюки, корреляционный анализ Спирмена). Принципиально важные результаты подтверждены как на транзистентно, так и на стабильно трансфицированных культурах. Материалы диссертации прошли независимую экспертизу: опубликовано 6 статей в журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science, получен 1 патент, результаты многократно представлены на российских и международных конференциях.

Общая характеристика и структура диссертационной работы

Работа построена по стандартной схеме и содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Текст изложен на 180 страницах, содержит 39 рисунков, 14 таблиц и 366 ссылок на использованную литературу.

Введение содержит описание цели и задач исследования, актуальности, новизны и практической значимости полученных результатов. Приведена информация об опубликованных по теме исследования научных статьях и тезисах научных докладов на конференциях.

Обзор литературы даёт достаточно полное представление о тематике исследования и охватывает ключевые аспекты экспрессии рекомбинантных гликопротеинов в клетках млекопитающих.

Раздел **Материалы и методы** содержит необходимую информацию о молекулярно-генетических методах, методах работы с культурами эукариотических клеток, методах очистки белков и аналитических методиках, использованных автором в работе. Приведено описание методов проточной цитометрии, иммуноферментного

анализа, вестерн-блоттинга, ПЦР в реальном времени, изоэлектрофокусирования, ВЭЖХ и масс-спектрометрии.

В разделе **Результаты и обсуждение** автор последовательно излагает основные достижения работы. На примере модельного белка eGFP проведён функциональный анализ некодирующих областей гена EEF1A1 и фрагмента EBVTR в составе экспрессионной плазмиды p1.1. Установлено, что укороченный вариант p1.1-Tr2 сохраняет продуктивность и стабильность на уровне полноразмерного вектора, что позволило использовать его в качестве универсальной платформы для дальнейших конструкций.

Далее описано получение двух вариантов рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2. Показано, что удаление непарного цистеина и корректировка границ домена приводят к существенному снижению доли ковалентного димера. На основе оптимизированного RBD и рекомбинантного растворимого АПФ2 разработан тест суррогатной вирус-нейтрализации. Проведено сравнение двух схем анализа, по результатам которого схема с иммобилизованным RBD и конъюгатом АПФ2-HRP признана предпочтительной. Валидация на 73 клинических образцах продемонстрировала высокую корреляцию с классической вирус-нейтрализацией (коэффициент Спирмена 0,855).

В части, касающейся гликопротеиновых гормонов, выполнено систематическое сравнение четырёх гетерологичных сигнальных пептидов для β -субъединиц ФСГ, ЛГ, ХГ и ТТГ. Наибольший и наиболее универсальный эффект продемонстрировал сигнальный пептид человеческого сывороточного альбумина. Данные количественной ПЦР и вестерн-блоттинга подтверждают, что прирост продуктивности обусловлен именно эффективностью посттрансляционных событий, а не различной копийностью трансгена. При создании продуцента ХГч применён подход с диагностикой стехиометрии цепей и дополнительной трансфекцией геном дефицитной субъединицы, что позволило вдвое увеличить выход гетеродимера. Полученная клональная линия S-pTr2-hCG-8 в оптимизированных условиях культивирования обеспечивает титр, привлекательный для промышленного внедрения, а сравнительный анализ профиля гликоизоформ, данных масс-спектрометрии и биологической активности *in vivo* свидетельствует о сопоставимости продукта с оригинальным препаратом.

Заключительный блок посвящён валидации процесса очистки рекомбинантного ФСГ человека. На уменьшенных лабораторных моделях определены динамическая

ёмкость, оптимальное время контакта и стабильность всех хроматографических сорбентов 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 более 60 промышленных партий субстанции с воспроизводящимися от серии к серии характеристиками.

Вопросы и замечания

1. В рамках работы были получены 4 новых экспрессионных вектора: три с делециями в вышележащих фланкирующих областях (p1.1-Tr1, p1.1-Tr2, p1.1-Tr3) и один (p1.1-D) с интактным вышележащим участком и практически полностью удаленным нижележащим участком. Какие особенности исходного вектора p1.1 сделали необходимым его модификацию? Из каких соображений были выбраны именно эти модификации? Приведенные литературные данные скорее свидетельствовали в пользу того, что эти модификации могут оказаться неудачными. Как вы считаете, в чем причина расхождения с опубликованными ранее результатами модификации?
2. В работе не приведены последовательности генов/белков RBD v1 и v2. Представляют ли они собой коммерческую тайну? Хотелось бы понять, по какой причине потребовалась корректировка границ RBD домена, и что натолкнуло автора на мысль о ее необходимости.
3. При сравнительном анализе двух схем теста суррогатной вирус-нейтрализации автором было установлено, что планшеты с иммобилизованным АПФ2 демонстрируют значительную нестабильность при хранении (вариабельность сигнала до 40 % через двое суток даже при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$). Данный результат имеет важное методическое значение, однако его интерпретация в работе ограничивается констатацией факта. Хотелось бы услышать предположения автора о молекулярных причинах такой нестабильности: может ли она быть связана с обратимой денатурацией АПФ2 при адсорбции на гидрофобной поверхности планшета, с деградацией белка следовыми количествами протеаз, или с иными факторами? Понимание этого механизма позволило бы предложить пути стабилизации альтернативной схемы анализа.
4. В главе 3.5.5, посвящённой оптимизации условий культивирования линии-производителя ХГч, автор приводит сравнительные данные по шести коммерческим средам и отмечает трёхкратный разброс конечных титров. При этом наибольшая пиковая плотность клеток (25 млн/мл в среде ActiGroxx) сопровождалась минимальным накоплением продукта (43 мг/л). Данный результат, представляющий значительный

интерес для понимания физиологии клеток-продуцентов, в тексте диссертации никак не обсуждается. С чем автор связывает такой дисбаланс между ростовыми и продуктивными характеристиками? Проводился ли анализ распределения клеточного цикла или уровня апоптоза в этих культурах, что могло бы объяснить наблюдаемый феномен?

Заключение

Диссертационная работа Синегубовой Марии Валерьевны «Получение фармацевтически значимых гликопротеинов в клетках яичника китайского хомячка» представляет собой законченную научно-квалификационную работу, выполнена на высоком методическом уровне, обладает значительной научной новизной и выдающейся прикладной значимостью.

Результаты работы могут быть использованы в молекулярно-биологических и биотехнологических исследованиях, которые проводятся в ряде институтов Министерства здравоохранения РФ, Министерства науки и высшего образования РФ, а также в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте белка Российской академии наук, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии гена Российской академии наук, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте цитологии и генетики СО Российской академии наук, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной и клеточной биологии СО Российской академии наук и др.

Диссертация Синегубовой Марии Валерьевны полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Синегубова Мария Валерьевна, несомненно, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.4. Биохимия, 1.5.6. Биотехнология.

Отзыв на диссертационную работу Синегубовой Марии Валерьевны «Получение фармацевтически значимых гликопротеинов в клетках яичника китайского хомячка» был обсуждён и одобрен на семинаре Центра высокоточного редактирования и генетических

технологий для биомедицины Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук 20 мая 2026 года (протокол № 1).

Старший научный сотрудник
Центра высокоточного редактирования
и генетических технологий для биомедицины
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института
Биологии гена Российской академии наук

кандидат биологических наук



БРУТЕР Александра Владимировна

Контактная информация:

Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

E-mail: aleabruter@gmail.com

21.05.2026

ПОДПИСЬ Брутер А. В.
ЗАВЕРЯЮ
Ученый секретарь ИБГ РАН Набокова Е. Н.

