

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 64.1.002.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ
ЧЕЛОВЕКА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 07.10.2022 г. № 25

о присуждении Тимоновой Софье Сергеевне, гражданину РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Создание высокопродуктивных моноклональных клеточных линий, экспрессирующих активные рекомбинантные лизосомальные ферменты арилсульфатазу В и идуронат-2-сульфатазу» по специальности 1.5.6. Биотехнология принята к защите 01.07.2022 г., протокол № 19 диссертационным советом 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Тимонова Софья Сергеевна, 1993 г. рождения, в 2017 г. окончила магистратуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский технологический университет» по направлению 19.04.01 «Биотехнология», профиль образовательной программы - «Технология биофармацевтических препаратов», работает научным сотрудником лаборатории стабильных клеточных линий отдела клеточной биологии департамента генно-инженерных биологических препаратов Акционерного общества «ГЕНЕРИУМ».

Диссертация выполнена в лаборатории стабильных клеточных линий отдела клеточной биологии департамента генно-инженерных биологических препаратов Акционерного общества «ГЕНЕРИУМ».

Научные руководители – кандидат биологических наук Пискунов Александр Александрович, Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ», департамент генно-инженерных биологических препаратов, директор департамента.

Официальные оппоненты:

Игнатъев Георгий Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория молекулярной биотехнологии, старший научный сотрудник,

Юрков Сергей Григорьевич, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория «Лекарственные средства для животных», главный научный сотрудник,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждения высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Москва, в своем положительном отзыве, подписанном доктором химических наук Демидюком Ильей Валерьевичем, профессором РАН, доцентом кафедры биотехнологии и промышленной фармации, и кандидатом химических наук Шестиной Натальей Сергеевной, доцентом, секретарем той же кафедры, указала, что диссертационная работа Тимоновой Софьи Сергеевны «Создание высокопродуктивных моноклональных клеточных линий, экспрессирующих активные рекомбинантные лизосомальные ферменты арилсульфатазу В и идуронат-2-

сульфатазу» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение важной для отечественного здравоохранения задачи – разработка высокопродуктивных моноклональных клеточных линий-продуцентов активных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы для получения белковых лекарственных препаратов. По актуальности избранной темы, объему и методическому уровню проведенных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов данная работа соответствует требованиям пунктов 9-14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ от 24.04.2016 г. № 335, от 02.06.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Тимонова Софья Сергеевна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 Биотехнология.

Соискатель имеет **4** опубликованных работы, в том числе по теме диссертации опубликовано **4** работы, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано **3** работы и получен **1** патент на изобретение. Общий объем работ – 2,88 п. л.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ:

1. **Тимонова, С.С.** Принцип оперативного выбора лидерных клонов-продуцентов моноклональных антител при создании стабильных клеточных линий на основе СНО / **С.С. Тимонова**, В.И. Павелко, И.А. Кирик, В.Н. Бадэ, Т.О. Малыгина, Р.А. Хамитов, А.А. Пискунов // **Биотехнология**. – 2019. – Том 35. – № 4. – С. 65–72. SCOPUS SJR=0,71, Цит. 2

2. **Тимонова, С.С.** Оптимизация процесса культивирования клон-продуцента рекомбинантного лизосомального фермента идуронат-2-сульфатазы / **С.С. Тимонова**, М.С. Пантюшенко, Р.В. Тихонов, А.А. Пискунов, В.Н. Бадэ // **Биотехнология**. – 2021. – Том 37. – № 2. – С. 34–47. SCOPUS SJR=0,71, Цит. 1.

3. **Тимонова, С.С.** Увеличение продуктивности клеточной линии-продуцента арилсульфатазы В за счет коэкспрессии формилглицин генерирующего фермента / С.С. Тимонова, К.А. Смолова, Д.Т. Зарипова, М.С. Пантюшенко, М.А. Королева, Р.Л. Анисимов, Р.А. Хамитов, А.А. Пискунов, В.Н. Бадэ // **БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.** – 2022. Том 22. – № 1. – С. 80–93. SCOPUS SJR= 0,57, Цит. 1.

4. **Пат. RU2020107533А РФ:** Клетка, продуцирующая с высокой эффективностью активный белок арилсульфатазу В, и способ получения этой клетки / Пискунов А.А., Бадэ В.Н., **Тимонова С.С.** Патентообладатель АО «Генериум». заявл. 19.02.2020; опубл. 19.08.2021, Бюл. №23 – 1 с.

На диссертацию и автореферат поступило **7** положительных отзывов от: **(1)** кандидата биол. наук **Розова Федора Николаевича**, ведущего научного сотрудника научного отдела компании ООО «Хайтест Россия», г. Москва, содержит замечания: работа с единственным клоном выглядит немного рискованно: поскольку характеристики клона-продуцента могут меняться со временем, то в подобные исследования более принято создавать несколько лидерных клонов; необходимо уточнить, что именно представляют собой: feed 2, feed 3 или feed 4: Это коммерчески доступные «подпитки» или самостоятельно приготовленные смеси питательных веществ? автору следовало указать на то, что результат, представленный на рис. 10-С, D, зависел от того, каким способом обрабатывать полученные данные: путем построения простой линии регрессии или путем применения непарного t-критерия; доктора биол. наук, **(2)** кандидата биол. наук **Суздальцевой Юлии Геннадиевны**, ведущего научного сотрудника лаборатории эпигенетики Института общей генетики РАН, г. Москва - без замечаний; **(3)** доктора биол. наук, профессора РАН **Плотникова Егора Юрьевича**, заведующего лабораторией структуры и функции митохондрий отдела функциональной биохимии биополимеров Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университете им. М.В. Ломоносова, г. Москва, содержит замечание: выводы, представленные в работе, несколько избыточны и подробны и больше напоминают описание основных результатов, автору следует быть более лаконичным; **(4)** доктора биол. наук, профессора **Прунтовой Ольги Владиславовны**, Федеральный Центр охраны здоровья животных, г. Владимир, содержит замечания: хотелось бы узнать, что конкретно имеет в виду автор, используя термин

«жизнеспособность»? По данным, представленным в автореферате, этот параметр надо называть «концентрация клеток» или «динамика роста популяции клеток» в единицах кл/см³; на рис. 3В ось ординат обозначена «жизнеспособность, %», как это интерпретировать? Общее замечание по всему тексту автореферата: неудачное использование вместо русских терминов даже не англицизмов, а жаргона; (5) кандидата биол. наук **Буруновой Вероники Вячеславовны**, старшего научного сотрудника лаборатории клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, г. Москва - без замечаний; (6) доктора биол. наук, профессора **Глухова Александра Ивановича**, заведующего кафедрой биологической химии Первого Московского медицинского университета им. И.М. Сеченова, г. Москва - без замечаний; (7) кандидата биол. наук **Крашенинникова Михаила Евгеньевича**, ведущего научного сотрудника научно-образовательного ресурсного центра «Клеточные технологии» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Российского университета дружбы народов, г. Москва - без замечаний.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор медицинских наук, профессор **Игнатъев Георгий Михайлович** является признанным специалистом в сфере разработки биотехнологических препаратов, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Тимоновой С.С. (**Инф. Бол. Новос. Мнен. Обуч. - 2022. - Т. 11, № 1(40). - С. 21-27; Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол. - 2019. - № 3. - С. 37-45; 2020. - № 2. - С. 182-189; 2021. - Т. 98, № 6. - С. 648-656; Emerg. Microb. Inf. - 2021. - V. 10, N 1. - С. 1790-1806; Vaccines. - 2021. - V. 9, N 6. - P. 565; Int. J. Inf. Dis. - 2020. - V. 99. - P. 40-46; Биопреп. Профилактикт. Диагн. Леч. -2017. - Т. 17. - № 2 (62). - С. 95-102; 2020. - Т. 20, № 2. - С. 107–115; Вопр. Вирусол. - 2018. - Т. 63, № 2. - С. 90-96; Эпидемиол. Вакцинопрофил. - 2018. - Т. 17, № 1 (98). - С. 20-24;**

доктор биологических наук, профессор **Юрков Сергей Григорьевич** является признанным специалистом в области технологий получения и поддержания клеточных культур и имеет научные публикации в сфере

исследований, соответствующей кандидатской диссертации Тимоновой С.С. (**Вет. Врач.** – 2017. - №1. - С. 14-18; **Ветеринария.** - 2017. - №8. – 54-57; 2020. - № 1. - С. 51-54; 2021. - № 4. - С. 18-24; 2021. - № 7. - С. 18-24; **Transbound. Emerg. Dis.** – 2018. - V. 65, N 3. - P. 916-920; **Pathogens** – 2020. – V. 9, N11. – N 867; **Rus. Agricult. Sci.** - 2020. - V. 46, N 5. - P. 525-529; **Вопр. Вирусол.** – 2021. – Т.66, №1. – С. 29-39; **Биотехнология.** - 2021. - Т. 37, №1. - С. 69-80; **Ветерин. Сегодня.** - 2021. - № 4 (39). - С. 323-328.

Назначение ведущей организации обосновано широкой известностью ее достижений в области биотехнологии и промышленной фармации, наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Тимоновой С.С. (**Prot. Expres. Pur.** - 2018. - V. 143. - P. 77-82; **Dokl. Biochem. Biophys.** - 2019. - V. 484, P. 42–44; **Mosc. Univ.y Chem. Bull.** - 2018. - V.73, N 2. - P. 74-79; **BioNanoScience** - 2020. - V.10, - P.885–898; **Biol. Trace Elem. Res.** - 2020. - V. 193. - P. 564–573; **Rus. J. Phys. Chem. B** - 2019. - V. 13. - P. 938–941; **J. Pharm. Sci. Res.** - 2018. - V.10, N 6. - P. 1457-1460; **Mol. Biol.** - 2017. - V.51, N 1. - P. 102-107; **Eur. J. Pharm. Biopharm.** - 2018. - Т. 123. - С. 59-70; **Molecules.** - 2018. - Т. 23. N 12. - С. 3101; **Биорг. Хим.** - 2017. - Т. 43, № 5. - С. 543-552; **Rus. J. Bioorg. Chem.** - 2019. - Т. 45, N 6. - P. 719-725; **Тонкие Хим. Технол.** - 2020. - Т. 15, № 1. - С. 7-27), а также наличием ученых, являющихся безусловными специалистами по теме диссертации Тимоновой С.С.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана технология получения и культивирования высокопродуктивных моноклональных клеточных линий-продуцентов рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы с высокой удельной активностью (70-100 ЕД/мг и 30-35 ЕД/мг, соответственно), на основе суспензионной клеточной линии СНО, без использования компонентов животного происхождения;

предложена схема получения продуцентов арилсульфатазы В, модифицированных вспомогательным формилглицин генерирующим ферментом, включающая в себя: проведение трансфекции клеток CHO плазмидами в определенном соотношении, получение минипулов-продуцентов клеточных линий, получение моноклональных клеточных линий-продуцентов ферментов, а также оптимизация состава ростовой среды, с добавлением сульфата меди и хлорида кальция, с целью повышения продуктивности линий-продуцентов рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы и их удельной активности.

доказано, что добавление в среду культивирования BalanCD CHO Growth A (IrvineScientific, США) сульфата меди приводит к повышению продуктивности линий-продуцентов лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатаз (с 1-2 до 400-420 мг/л и с 20-40 до 250-300 мг/л, соответственно), и к увеличению их удельной активности (с 10-20 до 70-100 ЕД/мг и с 3-10 до 30-35 ЕД/мг, соответственно);

введены основные принципы получения высокопродуктивных линий-продуцентов активных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы, заключающиеся в использовании ионов металлов, входящих в активные центры целевых и вспомогательных ферментов в качестве добавок среду культивирования.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано, что коэкспрессия формилглицин-генерирующего фермента, который влияет на активный центр арилсульфатазы, и добавление ионов меди, которые входят в активный сайт формилглицин-генерирующего фермента, обеспечивают увеличение продуктивности клеточной линии продуцента арилсульфатазы В;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: молекулярных – создание экспрессионных векторов, несущих гены целевых и вспомогательного ферментов; биотехнологических – работа с культурами

клеток на основе линии СНО, проведение трансфекции, осуществление высокоэффективных скринингов, получение моноклональных клеточных линий продуцентов целевых ферментов, оптимизация условий культивирования линий продуцентов, работа с роботизированными системами для получения моноклональных клеточных линий продуцентов, изучение стабильности ростовых и продукционных характеристик промышленных клонов-продуцентов; биохимических, физико-химических и иммунохимических – иммуноферментный анализ, электрофорез в полиакриламидном геле, вестерн-блот и дот-блот анализы, хроматографическая очистка целевых ферментов, определение активности полученных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы;

изложены принципы получения высокопродуктивных линий продуцентов лизосомальных сульфатаз и подбора состава питательной среды для их культивирования, заключающиеся в отборе наиболее высокопродуктивных клеточных линий в присутствии формилглицин генерирующего фермента, а также сульфата меди и хлорида кальция;

раскрыт механизм повышения активности лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы - за счет увеличения активности вспомогательного формилглицин-генерирующего фермента, влияющего на активный центр арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы в присутствии сульфата меди;

изучено влияние формилглицин-генерирующего фермента на увеличение выхода и активности фермента арилсульфатазы В, которое характеризуется повышением выхода этого фермента в ~10 раз и увеличением ее удельной активности в ~10 раз;

проведена работа по совершенствованию технологии суспензионного культивирования промышленных высокопродуктивных клонов-продуцентов, позволяющей снизить себестоимость производства рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены стабильные высокопродуктивные моноклональные клеточные линии-продуценты рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы и технология их культивирования, которые будут использованы для получения фармацевтических субстанций для ферментозаместительной терапии мукополисахаридоза II и VI типов. Полученные моноклональные клеточные линии-продуценты идуронат-2-сульфатазы и коэкспрессирующие арилсульфатазу В и формилглицин-генерирующий фермент, использованы при наработке серий фармацевтических субстанций для проведения доклинических и клинических испытаний (Паспорт главного банка клеток и Опытно-промышленный регламент ОПП №89761464-88-21 для производства фармацевтической субстанции на основе идуронат-2-сульфатазы, Разрешение на проведение клинических исследований оценки сравнительной фармакокинетики и безопасности препаратов GNR-071 (арилсульфатазы В) и Наглазим® (BIOMARIN, США) у здоровых добровольцев РКИ №456 от 25.07.2022 г) - федеральный уровень внедрения;

определены перспективы использования разработанного способа получения продуцентов арилсульфатазы В с помощью коэкспрессии основного и вспомогательных белков при создании рекомбинантных белковых препаратов;

созданы промышленные высокопродуктивные клеточные линии - продуценты арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы с помощью современных роботизированных систем получения клеточных линий и оптимизации условий культивирования продуцентов;

представлен и экспериментально обоснован способ культивирования полученных промышленных клонов-продуцентов ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы, который позволил повысить продуктивность клеточных линий (с 1-2 до 400-420 мг/л и с 20-40 до 250-300 мг/л,

соответственно) и обеспечил получение целевых ферментов с активностью 70-100 и 30-35 ЕД/мг, соответственно.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

результаты получены на сертифицированном оборудовании, воспроизводимость результатов проверена в различных условиях с необходимым количеством повторов;

идея диссертационного исследования о получении клеточных линий-продуцентов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы опирается на анализ имеющихся в научной литературе экспериментальных и теоретических данных, обобщении опыта ведущих исследовательских групп по изучению биофармацевтических препаратов;

установлена частичная корреляция полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными независимых зарубежных авторов, в части коэкспрессии белков и влияния иона меди на активность формилглицин-генерирующего фермента;

использовано современное оборудование для получения моноклональных клеточных линий-продуцентов: автоматическая система для скрининга и отбора колоний ClonePix FL (Genetix, США); роботизированная система биореакторов AMBR R3-141 (TAP Biosystems, Германия); высококонтрастная фотодокументирующая система для идентификации роста моноклональных клеточных линий Cell Metric (Solentim, Великобритания), использованы современные методы в рамках систем сбора, обработки и визуализации данных: система гель-документирования ChemiDoc XRS+Molecular Imager (BIO RAD, США); программа статистической обработки Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software) и Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation).

Личный вклад соискателя состоит в проведении автором лично следующих этапов работы:

анализ научной литературы, получение линий-продуцентов, включая промышленные стабильные моноклональные клеточные линии-продуценты

рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы на основе клеток линии СНО; проведение оптимизации культивирования клонов-продуцентов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы; создание исследовательского банка продуцентов; исследование влияния коэкспрессии вспомогательного формилглицин-генерирующего фермента на продуцентов арилсульфатазы В; анализ результатов исследования; обработка, оформление результатов и написание публикации по теме диссертации.

На заседании 07.10.2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Тимоновой С.С. за решение задачи получения высокопродуктивных стабильных линий продуцентов, экспрессирующих активные рекомбинантные лизосомальные ферменты арилсульфатазу В и идуронат-2-сульфатазу, важной для биотехнологической отрасли науки, ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 9 докторов наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 19, против 0, недействительных бюллетеней нет.

Председатель
диссертационного совета
академик РАН, д.м.н., профессор


(Дятлов Иван Алексеевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.б.н.


(Фурсова Надежда Константиновна)

Дата оформления Заключения – 07.10.2022 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.