



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Федеральный исследовательский центр

вирусологии и микробиологии»

(ФГБНУ ФИЦВиМ)

601125, Россия, Владимирская область, Петушинский район, п.
Вольгинский,
ул. Академика Бакулова, стр.1

Тел./факс: (4922) 37-92-51; 37-92-61 ,

e-mail: info@ficvim.ru; www.ficvim.ru

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу
Тимоновой Софьи Сергеевны на тему: «Создание высокопродуктивных
моноклональных клеточных линий, экспрессирующих активные
рекомбинантные лизосомальные ферменты арилсульфатазу В и
идуранат-2-сульфатазу», представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология**

Актуальность темы

Орфанные генетические заболевания, к которым относится группа мукополисахаридозов, рассматриваются как важная медицинская и социальная проблема. Ферментная недостаточность при мукополисахаридозах II и VI типов сопровождается тяжелейшими клиническими проявлениями болезни и органической патологией.

Одним из путей лечения и улучшения качества жизни при этих заболеваниях является пожизненное использование ферментной заместительной терапии.

Получение клонов-продуцентов лизосомальных ферментов, оптимизация условий и параметров их суспензионного культивирования – необходимое звено разработки промышленной биотехнологии отечественных препаратов.

В этом отношении диссертационная работа Тимоновой С.С., направленная на получение, изучение биологических свойств

высокопродуктивных моноклональных клеточных линий, сохраняющих высокие уровни экспрессии активных рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы, решает важную задачу и является, несомненно, актуальной.

Степень обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в диссертации

Анализ научной литературы по проблемам терапии мукополисахаридозов, молекулярно-генетическим и биотехнологическим подходам к решению проблемы разработки клеточных систем биосинтеза активных ферментов, для заместительной терапии позволил диссертанту обоснованно выбрать цель и сформулировать задачи исследований.

Использованные автором современные методы отвечают высокому уровню исследований, а полученные в результате экспериментальной работы научные данные обобщены и проанализированы, что позволило обосновать и сформулировать выносимые на защиту научные положения, выводы и практические рекомендации.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и практических рекомендаций

Научная новизна исследований заключается в том, что автором теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены методические подходы по получению клонов-продуцентов рекомбинантных лизосомальных ферментов. Впервые в России созданы высокопродуктивные клеточные линии – продуценты и установлено сохранение полученными моноклональными клетками высоких уровней продуцирования арилсульфатазы В с коэкспрессией вспомогательного формилглицин генерирующего фермента и идуронат-2-сульфатазы на протяжении не менее 60 клеточных генераций. Оптимизация условий и параметров суспензионного культивирования клонов с введением в систему дополнительных фидеров и ионов меди обеспечило получение ферментов с высокой удельной активностью. Полученные оригинальные

экспериментальные данные расширяют знания в области биологии рекомбинантных клеток в культуре. Созданные крупные банки клеток в жидком азоте, сохраняющие стабильность биотехнологических характеристик после реконсервации, обеспечивают возможность их практического использования. Полученные данные, несомненно, обладающие научной новизной, представляют значительный интерес и могут быть использованы как основополагающие рядом смежных направлений исследований, что открывает возможность их практического использования для различных областей биотехнологии и проведения исследований фундаментального и прикладного характера.

Выводы и практические предложения представляют теоретическое и практическое значение и являются базой для дальнейшего развития исследований по данному направлению.

Диссертационная работа Тимоновой С.С. выполнена на высоком научно-методическом уровне, экспериментальные исследования обоснованы, результаты статистически обработаны и подвергнуты глубокому анализу.

Все выше перечисленное позволяет сделать заключение о высокой достоверности научных положений, выводов и практических рекомендаций диссертации Тимоновой Софьи Сергеевны.

Соответствие диссертации, автореферата и публикаций критериям «Положения о присуждении ученых степеней»

Диссертация Тимоновой С.С. «Создание высокопродуктивных моноклональных клеточных линий, экспрессирующих активные рекомбинантные лизосомальные ферменты арилсульфатазу В и идуронат-2-сульфатазу» написана хорошим научным языком, обладает внутренним единством, содержит новые научные результаты. Автореферат содержит основные разделы диссертации и раскрывает ее научные положения. Выводы и практические предложения, изложенные в автореферате и диссертации, идентичны. Диссертация и автореферат соответствуют критериям

«Положения о присуждении ученых степеней». По теме диссертации опубликовано 4 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации. По результатам исследований получен один патент на изобретение RU2020107533А «Клетка, продуцирующая с высокой эффективностью активный белок арилсульфатазу В, и способ получения этой клетки». В опубликованных статьях достаточно полно отражены основные результаты экспериментальной работы диссертанта.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы

Тимоновой С.С. самостоятельно проведен анализ разработанности изучаемой проблемы и определена тема диссертации, цель и задачи научного исследования, обоснован выбор материалов и методов, освоены необходимые методики, проведено обобщение и анализ полученных данных. Экспериментальная работа по теме диссертационных исследований Тимоновой С.С. проводилась самостоятельно на базе научно-производственной площадки АО «Генериум» в отделе клеточной биологии.

Считаю, что соискатель лично сформулировала, основанные на полученных данных, выводы и практические рекомендации.

Апробация результатов. Результаты диссертационного исследования были представлены на научно-практических конференциях АО «Генериум» в июне 2018 г. и 2021 г.

Оценка содержания диссертации и ее завершенности

Диссертация изложена на 141 странице, включая 33 рисунка и 15 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 154 источника.

Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, описания собственных результатов исследований и их обсуждения, выводов, описания практического использования результатов, списка литературы и приложений.

Структура и содержание диссертации полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Во «Введении» обоснована актуальность решаемой проблемы, сформулированы цель и задачи работы, научная новизна, практическая значимость и основные положения диссертации, выносимые на защиту.

Литературный обзор содержит тщательный анализ литературы по исследуемой проблеме, что указывает на глубину проработки темы исследования.

«Материалы и методы исследований» содержат сведения об используемой клеточной культуре, реактивах, использованном оборудовании и методах, при помощи которых в работе были реализованы цель и поставленные задачи.

Основными разделами результатов собственных исследований автором выделены: глава 3 - Разработка моноклональных клеточных линий и технологии их культивирования для промышленного производства рекомбинантного активного фермента идуронат-2-сульфатазы; глава 4 - получение моноклональных клеточных линий рекомбинантного фермента арилсульфатазы В; глава 5 - Разработка высокопродуктивных моноклональных клеточных линий, коэкспрессирующих арилсульфатазу В и формилглицин генерирующий ферменты и технологии их культивирования для промышленного производства рекомбинантного активного фермента арилсульфатазы В; глава 6 - Исследование стабильности экспрессионных и ростовых характеристик клонов-продуцентов идуронат-2-сульфатазы и арилсульфатазы В.

Обсуждение включает в себя глубокий анализ собственных результатов экспериментальной работы, позволившей диссертанту практически решить все поставленные задачи и выявить перспективы дальнейших исследований в данном направлении.

В целом материал диссертационной работы представляет научный и практический интерес и является законченным исследованием, в котором решается важная научная проблема, имеющая существенное практическое значение для отечественной медицины и биотехнологии.

Выводы и практические рекомендации написаны в соответствии с целью и задачами исследования и полностью вытекают из результатов проведенной работы.

В этой связи считаю, что диссертация Тимоновой С.С. является завершенной квалификационной работой, выполненной самостоятельно на высоком научном уровне.

Все вышеизложенное позволяет дать положительную оценку выполненной работе.

Замечания, пожелания и вопросы по диссертации.

- 1) Автор отмечает, что теоретическая база работы основана на исследованиях российских и зарубежных ученых (стр.10), однако в обзоре литературы нет ссылок на работы отечественных ученых.
- 2) В обзоре литературы представлена схема получения стабильных линий – продуцентов на основе клеток СНО, однако нет ссылки на источник информации.
- 3) Считаю целесообразным включать в диссертационные работы раздел «Заключение по обзору литературы».
- 4) Хотелось бы получить объяснение факту снижению удельной активности идуронат-2-сульфатазы (12S) при высоком выходе целевого продукта при биосинтезе при 32 °С?

Отмеченные замечания не влияют на общую положительную оценку диссертации, представляющей законченное исследование, несомненно, содержащее научную новизну и результатом которого явилось получение и создание криобанка моноклональных клеточных линий-продуцентов активных рекомбинантных лизосомальных ферментов арилсульфатазы В и идуронат-2-сульфатазы для заместительной ферментной терапии при мукополисахаридозах II и VI типов.

Представленная работа полезна в научном и практическом плане и направлена на решение актуальной проблемы биотехнологии и медицины.

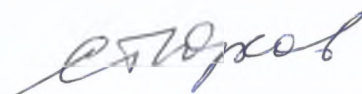
Диссертационная работа соответствует специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Заключение

Считаю, что диссертационная работа Тимоновой Софьи Сергеевны на тему: «Создание высокопродуктивных моноклональных клеточных линий, экспрессирующих активные рекомбинантные лизосомальные ферменты арилсульфатазу В и идуронат-2-сульфатазу», представляет законченный труд, выполненный лично автором, содержащий новые научные данные в области биотехнологии создания рекомбинантных терапевтических препаратов, расширяет арсенал клеточных культур – продуцентов биологически активных препаратов и вносит реальный вклад в решение проблемы заместительной ферментной терапии при мукополисахаридозах II и VI типов.

Диссертационная работа по актуальности решаемой в ней задачи, научной новизне полученных результатов, их практической значимости, достоверности и обоснованности научных положений и выводов полностью соответствует требованиям пункта п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013, а её автор Тимонова С.С. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

Главный научный сотрудник
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
вирусологии и микробиологии»,
доктор биологических наук, профессор



Юрков Сергей Григорьевич

Подпись Юркова С.Г. подтверждаю:
ученый секретарь
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
вирусологии и микробиологии»,
кандидат биологических наук

19.09.2022



Балашова Елена Алексеевна