

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 350.002.01,
СОЗДАННОГО 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 11.06.2021 г. № 16
о присуждении Воробьевой Иве Глебовне, гражданину РФ, ученой степени
кандидата биологических наук.

Диссертация «Разработка маркера селекции и сортига для быстрого получения клональных линий с планируемой продуктивностью рекомбинантного белка» по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) принята к защите 09.04.2021 г., протокол № 6 диссертационным советом Д 350.002.01, созданным 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, Территория «Квартал А», д. 24, п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279, приказ о создании № 714/нк от 02.11.2012 г.

Соискатель Воробьева Ива Глебовна, 1971 г. рождения, в 1994 г. окончила Экологический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» по специальности «Биотехнология». С 1994 по 1998 гг. И.Г. Воробьева обучалась в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» по направлению 03.01.03 – «Молекулярная биология»; работает лаборантом-исследователем лаборатории биосовместимых матриц и тканевой инженерии Курчатовского комплекса НБИКС – природоподобных технологий Федерального государственного бюджетного

учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Диссертация выполнена в отделе медицинской биотехнологии Федерального бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Научный руководитель – кандидат биологических наук (специальность 03.01.03 – молекулярная биология) Шукуров Рахим Рахманкулыевич, Общество с ограниченной ответственностью «Международный биотехнологический центр «Генериум», отдел аналитических методов, начальник отдела.

Официальные оппоненты:

Косовский Глеб Юрьевич, доктор биологических наук (03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), профессор РАН, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Московская область, директор;

Генералов Сергей Вячеславович, кандидат биологических наук (03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии), Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, г. Саратов, лаборатория профилактических иммуноглобулинов, ведущий научный сотрудник,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Москва, в своем положительном заключении, подписанном Костровым Сергеем Викторовичем, доктором химических наук, членом-корреспондентом РАН, профессором, кафедра биотехнологии и

промышленной фармации, заведующий кафедрой, и Шестиной Натальей Сергеевной, кандидатом химических наук, доцентом, секретарем той же кафедры, указала, что диссертационная работа содержит решение важной для отечественного здравоохранения задачи – снижение затрат на создание высокопроизводительной клеточной линии для получения белковых лекарственных средств. По актуальности избранной темы, объему и методическому уровню проведенных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов данная работа соответствует требованиям пунктов 9-10 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 ее автор Воробьева Ива Глебовна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Соискатель имеет **19** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано **9** работ, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано **5** работ. Общий объем работ – 3,2 п. л.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Шукуров, Р.Р. Создание стабильной клеточной линии — продуцента рекомбинантного дарбэпоэтина-альфа на основе клеток СНО. / Р.Р. Шукуров, Н.В. Лобанова, И.Н. Савинова, **И.Г. Воробьева**, А.А. Нурбаков, Л.В. Ермолина, Н.В. Орлова, А.Г. Мосина, Л.П. Антонова, Р.А. Хамитов, Ю.А. Серегин. // **Биотехнология.** – 2013.- № 2, С. 46-543. РИНЦ ИФ= 0,595, WoS. Цит. 2

2. **Воробьева, И.Г.** Создание штамма-продуцента моноклонального антитела инфликсимаб на основе линии клеток СНО. / **И.Г. Воробьева**, Р.Р. Шукуров, Ю.А. Серегин, Е.А. Смирнова // **Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие.** - 2013. - Т. 8, № 4. - С. 85-89. ВАК.

3. **Воробьева, И.Г.** Модификация системы, основанной на применении маркеров селекции и сортирования, для отбора стабильных трансфектантов / **И.Г. Воробьева**, Р.Р. Шукуров, Д.Г. Козлов, Т.Б. Корягина, Н.В. Антипова,

В.Н. Степаненко. // **Биотехнология.** – 2018. - Т. 34, № 2. - С.9 – 17 РИНЦ ИФ=0,595, SCOPUS, WoS

4. Ельчанинов, А.В. Регуляция пролиферации гепатоцитов после субтотальной резекции печени крыс. / А.В. Ельчанинов, А.В. Макаров, **И.Г. Воробьева**, Е.Ю. Кананыхина, А.В. Лохонина, В.В. Глинкина, Г.Б. Большакова, Д.В. Гольдштейн, Т. Фатхудинов // **Гены и Клетки.** - 2018. - Т. 13, № 4. - С. 37-42. SCOPUS.

На диссертацию и автореферат поступило **3** положительных отзыва от: **(1) Стратоновой Натальи Валерьевны**, к.б.н., зам. ген. директора по производству АО «Генериум», Владимирская обл., содержит замечания: «1) Нет объяснения гетерогенности фенотипа полученных клональных линий; 2) Не ясно, почему в конструкции в качестве трансмембранной части селективного белка был выбран именно данный участок PDGFR белка»; **(2) Литвиновой Натальи Алексеевны**, к.б.н., нач. отд. молекулярной диагностики МБЦ Генериум, Владимирская обл., содержит замечания: «1) В опыте с использованием металлосвязывающего домена использовался только один вариант носителя, хотя данный домен может связываться с различными металлами и оксидами металлов; 2) Показано обогащение пула трансфектантами, однако данных повторных раундов обогащения не приведено»; **(3) Серебряного Всеволода Александровича**, к.б.н., ст. науч. сотр. лаборатории №2 АО НИИ «Аджиномото-Генетика», Москва - отмечено небрежное оформление автореферата.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что д-р биол. наук, профессор **Косовский Глеб Юрьевич** является признанным специалистом в сфере биотехнологии клеточных линий, имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Воробьевой И.Г. (**Int. J. Env. Prob.** - 2016. – V.4, N2. – P. 89-98; **Биофармац. Журн.** - 2016. – Т.8, N3. – С. – 3-10; **Ген. Клет.** – 2017. – Т.12, N3 – С. 115; 2019. - Т.14. – С. 108-109; **Акт. Биотех.** – 2017. – Т.2, N21. – С. 82а-85; 2018. – Т.3, N.26. – С. 131-133; **Крол. Зверовод.** – 2019. – Т.1. – С. 3-8; **Вет. Зоотех. Биотехнол.** – 2019. – Т. 1 – С. 85-93);

канд. биол. наук **Генералов Сергей Вячеславович** является специалистом в области нанотехнологии и биотехнологии и имеет научные публикации в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Воробьевой И.Г. (**Биотехнол.** - 2020. – Т.36, N3. – С. 82-89; 2018. – Т. 34, N4. – С. 83-88; **Мол. Ген. Микробиол. Вирусол.** - 2020. – Т. 38, N4. – С. 196-202.; **Пробл. Особо Опасн. Инф.** - 2019. – Т. 4. – С. 113-116; 2016. – Т. 2. –

С. 95-101; **Вестн. Биотехнол. Физ.-Хим. Биол. им. Овчинникова.** - 2019. – Т. 15, N1. – С. 47-52; 2018. – Т. 14, N3. – С. 50-55; **Инф. Иммуно.** - 2019. – Т. 9. – N1. – С. 107-114; **Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.** - 2018. – Т. 3. – С. 18-25; **Вопр. Вирусол.** - 2017. – Т. 62, N5. – С. 227-232).

Назначение **ведущей организации** обосновано широкой известностью ее достижений в области нанотехнологии и нанобиотехнологии клеточных линий, наличием публикаций в сфере исследований, соответствующей кандидатской диссертации Воробьевой И.Г. (**Molecul.** – 2018. – Т. 23, N12. – С. 3101; **Биоорган. Хим.** – 2017. – Т. 43, N5. – С. 543-552; **Russ. J. Bioorgan. Chem.** – 2019. – Т. 45, N6. – С. 719-725; **Mol. Biol.** – 2017. – V.51, N1. – P. 102-107; **Prot. Express. Purif.** – 2018. – V. 143. – P. 77-82; **Mos. Univer. Chem. Bull.** – 2018. – V.73, N2. – P. 74-79; **Eur. J. Pharm. Biopharm.** – 2018. – V. 123. – P. 59-70; **BioNanoSci.** – 2020. – V. 10. – P. 885–898; **Biol. Trace Elem. Res.** – 2020. – V. 193. – P. 564–573; **Russ. J. Phys. Chem. B** – 2019. – V. 13. – P. 938–941; **J. Pharm. Sci. Res.** – 2018. – V.10, N6. – P. 1457–1460; **Dokl. Biochem. Biophys.** – 2019. – V. 484. – P. 42–44), а также наличием ученых, являющихся безусловными специалистами по теме диссертации Воробьевой И.Г.

Диссертационный совет отмечает, что, на основании выполненных соискателем исследований:

разработан новый протокол селекции клеточной линии CHO, позволяющий получать высокопроизводительные варианты при одноступенчатом скрининге; созданы генетические конструкции TiBP-PDGFR и CBD-PDGFR на основе вектора pCI-нео, усиливающие адгезию клеток-реципиентов на носителях, содержащих целлюлозу; новый маркер селекции и сортирования CBD-PDGFR для интегрированных в геном конструкций;

предложена новая схема скрининга производительных моноклональных линий CHO-S, несущих трансгенную конструкцию CBD-PDGFR, обеспечившая сокращение времени селекции более чем в 2 раза и затрат на расходные материалы - более чем в 4 раза, по сравнению с описанным ранее методом предельных разведений;

доказана перспективность использования маркера селекции и сортирования CBD-PDGFR для разработки новых клеточных линий CHO, производящих рекомбинантный белок;

введен новый маркер селекции и сортировки CBD-PDGFR - химерный ген, кодирующий химерный белок, включающий в себя целлюлозосвязывающий домен и трансмембранный домен тромбоцитарного фактора роста;

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано, что применение маркера CBD-PDGFR приводит к дифференцированной селекции трансгенных клеточных линий CHO по производительности рекомбинантного белка на целлюлозной подложке для получения коллекций производительных линий по измененной (упрощенной) схеме скрининга;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих базовых методов исследования: работа с клеточными культурами (культивирование эукариотических клеточных культур, определение жизнеспособности и стабильности, трансфекции, криоконсервирование, определение генетической стабильности, различные типы селекции), генно-инженерных (расщепление последовательности ДНК эндонуклеазами рестрикции, электрофорез, элюция фрагмента из агарозного геля, лигирование, аналитическая и препаративная ПЦР, сайт-направленный мутагенез), иммунохимических (проточная цитометрия и иммуноферментный анализ), а также ряд других методов, таких как просвечивающая электронная микроскопия и MACS-селекция;

изложены условия использования клеточного дисплея для дифференцированной селекции высокопроизводительных линий CHO-с несущих модифицированные гены целевых белков;

раскрыты противоречия между первичным обогащением трансфицированного пула клеток CHO-s с помощью маркера TiBP-PDGFR, и возможностью отобрать представительную коллекцию производительных линий, несущих трансген;

изучены скорости отбора клеточных линий CHO-s с двумя разными селективными маркерами TiBP-PDGFR и CBD-PDGFR, что обеспечило сокращение временных затрат и расходных материалов для снижения себестоимости разработки при производстве лекарственных средств на основе высокогликозилированных рекомбинантных белков.

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

разработаны и внедрены материалы - Методика получения клеточных линий СНО - которая используется в Департаменте экспериментального производства при создании рекомбинантных биопрепаратов (Справка ООО «ФАРМАПАРК» от 12.04.2021 г.) – межведомственный уровень внедрения; **определены** перспективы практического использования разработки маркера селекции и сортировки CBD-PDGFR для получения высокопроизводительной клеточной линии СНО-s – в лабораториях, занимающихся разработкой эукариотических линий для производства высокогликозилированных рекомбинантных белков;

созданы серии производительных клонов-продуцентов дарбэпоэтина альфа и полноразмерного моноклонального антитела инфликсимаба, а также серия стабильных клональных линий СНО-s, продуцирующих химерный белок CBD-PDGFR с удельной продуктивностью до 76 пг/клетку/сутки;

представлены рекомендации, обеспечивающие сокращение временных затрат и расходных материалов (питательных сред, наборов для иммуноферментного анализа и расходных материалов) в два и более раз при производстве лекарственных средств на основе рекомбинантных белков, таких как инфликсимаб и дарбэпоэтин альфа.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:

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

идея диссертационного исследования об использовании клеточного дисплея для получения клональных линий опирается на анализ имеющихся в научной литературе экспериментальных и теоретических данных, обобщении опыта ведущих исследовательских групп по изучению и применению селекции высокопродуктивных клональных линий СНО-s на основе химерных белков, экспонирующих домен CBD, способный связываться с целлюлозной подложкой;

установлена корреляция полученных автором результатов с опубликованными ранее в научной литературе данными независимых зарубежных авторов, в части – соотношения высокопродуктивных линий в клеточных пулах после трансфекции относительно общего количества клеток;

использованы современные методы получения и обработки информации в рамках систем сбора, обработки и визуализации данных: программа FlowJo, (<https://www.flowjo.com/>) и Vector NTI (<https://www.thermofisher.com/>).

Личный вклад соискателя состоит в проведении автором лично следующих этапов работы: анализ научной литературы, формулировка задач работы, анализ и обобщение полученных результатов. Все лабораторные исследования, включавшие трансфекции и скрининги, изготовление генетических конструкций для селекции на носителе, оценку продуктивности иммуноферментным анализом и методом проточной цитометрии, анализы генетической стабильности, статистический анализ и описание полученных данных проведены автором самостоятельно. Автор непосредственно принимала участие в подготовке и написании научных публикаций по теме диссертации.

На заседании 11.06.2021 г. диссертационный совет принял решение присудить Воробьевой И.Г. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 8 докторов наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 19, против 0, недействительных бюллетеней нет.

Председатель
диссертационного совета
д.б.н., профессор



(Шемякин Игорь Георгиевич)

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.б.н.

(Фурсова Надежда Константиновна)

Дата оформления Заключения – 11.06.2021 г.

Печать организации, на базе которой создан диссертационный совет.