

УТВЕРЖДАЮ
Первый проректор

ФГБОУ ВО «МИРЭА –



Н.И. Прокопов

2021 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет»

Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Москва, о научно-практической значимости диссертации Воробьевой Ивы Глебовны, выполненной на тему: «Разработка маркера селекции и сортировки для быстрого получения клonalных линий с планируемой продуктивностью рекомбинантного белка», на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Актуальность темы диссертации

Таргетная терапия социально значимых заболеваний, включая онкологические и аутоиммунные, использует полноразмерные моноклональные антитела и другие гликозилированные рекомбинантные белки, которые, в основном, производятся в клеточных линиях высших эукариот. Технологии разработки клеточной линии имеют решающее значение для быстрого создания терапевтических продуктов. Высокопродуктивные клоны составляют не более 1% гетерогенной популяции после трансфекции и амплификации генов, зачастую обладают более низкой жизнеспособностью и увеличенным клеточным циклом из-за дополнительной метаболической нагрузки. Тысячи клонов анализируются, чтобы получить набор производительных моноклонов. Даже при применении современной робототехники, создание производственной линии остается

затратным и капиталоемким, и, как правило, требует от 6 до 12 месяцев. Скорость и метод отбора высокопродуктивных клеточных линий значительно влияют на затраты разработки для крупномасштабного промышленного производства терапевтического белка.

Научная новизна исследования

В ходе работы диссидентом Воробьевой И.Г. созданы генетические конструкции, усиливающие адгезию клеток-реципиентов на носителях, содержащих целлюлозу. Создан новый маркер селекции и сортинга для получения модифицированных клеточных линий. Отобрана коллекция клонов модельного белка с продуктивностью до 76 пикограмм/клетку/сутки. Проведено сравнение скорости отбора клеточных линий новым маркером селекции и сортинга в сопоставлении с традиционным подходом.

Значимость полученных результатов для науки и практической деятельности

В ходе выполнения диссертационной работы были получены серии производительных клонов-продуцентов дарбэпоэтина альфа и полноразмерного моноклонального антитела инфликсимаба. Разработан новый протокол простой и эффективной селекции высокопроизводительной клеточной линии. Получена коллекция стабильных клеточных линий с высоким уровнем экспрессии модельного белка для использования в качестве основы для целевой интеграции при контролируемой вставке трансгена.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов диссертации

Методологической базой исследования Воробьевой И.Г. являлись работы в области молекулярных основ клеточного дисплея, эпигенетической регуляции экспрессии гетерологичных генов, фенотипических проявлений инсерционного мутагенеза в клетках высших эукариот, изучения свойств химерных трансмембранных инженерных белков. В работе использованы молекулярно-генетические методы, методы клеточной инженерии, количественные и

качественные методы оценки экспрессии генов: иммуноферментный анализ, проточная цитометрия, методы визуализации экспрессии исследуемых генов. Результаты, полученные в ходе исследования, должным образом зарегистрированы и статистически обработаны.

Оценка структуры, содержания, соответствия требованиям, предъявляемым к диссертациям

Диссертация содержит следующие основные разделы: Введение, Обзор литературы, Описание материалов и методов, Результаты исследований и их обсуждение, Заключение, Выводы и Список цитируемой литературы, включающий 180 печатных источников, 176 из которых англоязычные. Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста и содержит 12 таблиц и 17 рисунков.

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 научных статей – в изданиях, входящих в базы данных Web of Science и Scopus, 1 - в журнале, рекомендованном ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, и 4 - на научных мероприятиях, 2 из которых международные и 2 - российские.

Содержание работы соответствует теме диссертации, выводы согласуются с поставленными задачами, содержание автореферата соответствует положениям диссертации.

Рекомендации по использованию результатов диссертации

Технологию селекции и сортировки на основе клеточного дисплея можно применять для создания высокопродуктивных клеточных линий. Сравнение нескольких систем отбора показывает перспективность использования модифицированной системы селекции и позволяет сократить затраты времени и расходных материалов более чем в 2 раза. Преимущество в скорости дает возможность проверять моноклональность пула, параллельно с другими методами оценки коллекции созданных клеточных линий. Данная работа может использоваться при получении подготовленной линии для отбора клеток с

неизмененной системой гликозилирования и фолдинга, или в исследовательской работе с клетками, подвергающимися генетическим модификациям.

Вопросы и замечания к диссертационной работе:

1. Некоторые рисунки или изображения в таблицах представлены в плохом качестве, например, стр.93 - схема скрининга.
2. Обзор литературы содержит разделы, которые не используются и не обсуждаются в работе, например, стр.17 - Оптимизация кодирующей последовательности по кодонам.
3. Не ясно соответствие приведенной в списке публикаций автора под номером 4 статьи (Ельчанинов А.В., Макаров А.В., Воробьева И.Г., Кананыхина Е.Ю., Лохонина А.В., Глинкина В.В., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В., Фархудинов Т. Регуляция пролиферации гепатоцитов после субтотальной резекции печени крыс. Гены и Клетки. 2018. Т.13, №4, С. 37-42. SCOPUS) тематике диссертационной работы.

Отмеченные замечания и вопросы в целом не влияют на положительную оценку диссертационной работы, имеющую важное прикладное значение для разработки лекарственных средств.

Заключение

Диссертационная работа Воробьевой Ивы Глебовны «Разработка маркера селекции и сортировки для быстрого получения клональных линий с планируемой продуктивностью рекомбинантного белка» является научно-квалификационной работой, в которой содержится 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 её автор Воробьева Ива Глебовна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Отзыв и диссертационная работа Воробьевой Ивы Глебовны рассмотрены, обсуждены и одобрены на заседании кафедры биотехнологии и промышленной фармации РТУ МИРЭА, протокол № 11 от «19» мая 2021 г. На заседании присутствовало 14 чел. В обсуждении приняли участие: проф. Кедик С.А., проф. Костров С.В., доц. Пшеничникова А.Б., доц. Панов А.В., доц. Матвеев А.В.

Доктор химических наук, профессор,
член-корреспондент РАН

С.В. Костров

Секретарь кафедры биотехнологии и
промышленной фармации,
доцент, кандидат химических наук

Н.С. Шастина

Подписи Кострова С.В. и Шастиной Н.С. заверяю
Начальник отдела Управления кадров

В.В. Сазикова



Сведения о ведущей организации:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Адрес: 119454, Москва, Пр-т Вернадского, 78

Тел.: +7(499) 215 65 65 доб. 1140

Электронная почта: mirea@mirea.ru

Сайт: <http://www.mirea.ru>