

ОТЗЫВ официального оппонента

доктора биологических наук Дейнеко Елены Викторовны
на диссертационную работу Фирсова Алексея Петровича

«Получение рекомбинантных белков индустриального и фармацевтического назначения в растительных экспрессионных системах», представленную к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности
1.5.6. Биотехнология

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа А. П. Фирсова посвящена одному из важнейших направлений современной биотехнологии, связанному с наработкой хозяйственно-значимых рекомбинантных белков в альтернативной системе экспрессии, а именно, в растительных экспрессионных системах. Следует подчеркнуть, что по сравнению с другими экспрессионными системами (бактериальные, дрожжевые, СНО, клетки насекомых) растительные системы привлекают все большее внимание исследователей. Получение рекомбинантных белков на основе растительных клеток предлагает отличительные преимущества, включая низкие производственные затраты, высокую масштабируемость и значительно сниженный риск заражения патогенами человека и животных. Несмотря на успешность использования растений в качестве платформ для коммерческого получения биофармацевтиков и белков индустриального назначения, в этой области все еще остается много нерешенных проблем. Именно этот факт подчеркивает актуальность и важность темы исследований, представленных в диссертационной работе Алексея Петровича Фирсова. Исследование А.П. Фирсова нацеленно на анализ экспрессионных систем для получения таких рекомбинантных белков, как тауматин в растениях томатов; антигенный пептид М2е вируса гриппа птиц, субъединица В рицина как адъюванта и бета-глюкуронидазы в качестве партнёра для слияния и репортёрного гена, синтезируемых в растениях табака и ряски; а также гирудина и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (ГКСФ) с системе экспрессии на основе водного растения ряски малой. Большое внимание в диссертационной работе уделено рассмотрению вопросов, связанных именно с разработкой растительных систем экспрессии для получения выше перечисленных рекомбинантных белков. В диссертационной работе большой акцент сделан на проблеме все еще недостаточно высокого уровня накопления рекомбинантных белков в растительных системах экспрессии, а также на проблеме снижения затрат на их выделение и очистку от вторичных метаболитов и собственных белков растений.

Научная новизна и практическая значимость исследования и полученных результатов.

Научная новизна диссертационной работы А. П. Фирсова определяется тем, что диссертантом разработаны теоретические и практические подходы для наработки индустриальных (на примере тауматина) и фармацевтических (на примере М2е-пептида вируса гриппа птиц, гирудина и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека) рекомбинантных белков в растительных системах экспрессии. В диссертационной работе А. П. Фирсова на примере генетически модифицированных растений томата, несущих различные варианты гена тауматина II, экспериментально показана важность оптимальной компартиментализации рекомбинантного белка для его

максимального накопления в растительных тканях. Диссертантом было убедительно показано превышение накопления целевого белка на два порядка в плодах по сравнению с листьями, а также полное сохранение его органолептических характеристик в тканях исследуемых растений. Немаловажное значение имеет и разработка протокола выделения рекомбинантного тауматина, позволившего диссертанту впервые выделить рекомбинантный белок из плодов томата и продемонстрировать его идентичность натуральному тауматину, а также подтвердить его идентичность по вкусовым характеристикам природному тауматину, синтезируемому растениями *T. daniellii*. На примере пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 диссертантом установлена важность слияния пептида с белками-партнерами - накопление слитого белка М2е - RTВ не зависело от его компартментализации и обеспечивало высокий уровень его накопления в растительных тканях. Рекомбинантный RTВ - М2е, впервые полученный диссертантом в стабильно трансформированных растениях ряски малой, был функционально активен и вызывал индукцию анти-М2е антител при оральной иммунизации мышей. С использованием ряски малой впервые получены линии-продуценты, синтезирующие рекомбинантный ГКСФ на уровне до 70 мг/кг сырой массы, что выше по сравнению с большинством экспериментов с использованием стабильно трансформированных растений. Полученные диссертантом экспериментальные результаты, а также сделанные выводы и заключения подчеркивают значимость представленной к защите диссертационной работы как с практической, так и теоретической сторон.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов

Во Введении диссертантом убедительно обоснована актуальность исследования, чётко сформулированы цели и задачи, а также положения, выносимые на защиту. Основной раздел диссертации содержит описание полученных результатов исследования и их обсуждение. Написан хорошо, представленный материал изложен логично, достаточно иллюстрирован. Обсуждение результатов проведено грамотно. Обоснованность полученных результатов обеспечена применением современной научно-методической базы, с использованием современных методов исследований.

Достоверность результатов работы не вызывает сомнений. Экспериментальные данные получены на большом объёме выборок и с применением современных методик. Сделанные выводы строго базируются на полученных результатах исследования и полностью им соответствуют. Автореферат соответствует основным положениям исследований и выводов, изложенным в диссертационной работе.

По материалам диссертации представлена 31 научная работа, 17 из которых относятся непосредственно к теме диссертации, опубликованных в журналах, входящих в список ВАК, а также три главы в монографиях.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа А. П. Фирсова построена по классической схеме. Работа изложена на 363-х страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 480 научных работ, представленных отечественными и зарубежными источниками. Работа иллюстрирована 86-ю рисунками и включает 43 таблицы.

Во Введении изложена актуальность темы и степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы, а также основные положения, выносимые на защиту, апробация работы и личное участие автора. В обзоре литературы приведены современные данные, касающиеся рассмотрения различных систем экспрессии, используемых для биотехнологической наработки различных рекомбинантных белков с оценкой их преимуществ и недостатков для их производства в крупном масштабе. Основной акцент сделан на рассмотрении растительных систем экспрессии как перспективной альтернативы для производства рекомбинантных белков. Критически проанализированы системы экспрессии растений на основе стабильной и транзиектной систем, приведены примеры успешного выведения производства рекомбинантных белков индустриального и фармацевтического направления на современный рынок рекомбинантных белков.

Глава «Материалы и методы» включает подробное описание исходного растительного материала, используемого в экспериментах, а также условия его культивирования. Достаточно полно представлен весь перечень методов и подходов, применяемых при анализе экспериментального материала. В целом данная глава свидетельствует о том, что работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных молекулярно-биологических подходов и применения ДНК-технологий.

Результаты собственных исследований представлены в Главе 3, которая последовательно подразделена на отдельные подглавы, связанные с представлением результатов, относящихся к разработке систем экспрессии конкретных рекомбинантных белков, таких как тауматин, M2e-пептид вируса гриппа птиц, гирудин и ГКСФ человека. В каждой из этих подглав включены экспериментальные данные, направленные на создание экспрессионной модели с использованием таких видов растений, как томаты, табак и ряска малая. Основной акцент в экспериментах по созданию системы экспрессии для наработки исследуемых целевых белков диссертантом сделан на оптимизации выхода рекомбинантного белка, а также на разработку протокола выделения и очистки рекомбинантного тауматина II. Проведенные диссертантом исследования свидетельствуют о том, что в растительных системах возможно получение рекомбинантных белков различного назначения на достаточно высоком уровне, что подтверждается созданием генетически модифицированных линий томатов, в плодах которых может накапливаться до 150 мг рекомбинантного тауматина II в 1 кг сырой массы. Достижение такого уровня накопления целевого белка в растительных тканях дает основание для их использования в качестве продуцентов тауматина для нужд пищевой и биофармацевтической отраслей промышленности. Интересные для биотехнологии результаты были получены в отношении использования ряски малой в качестве перспективного биопродуцента рекомбинантных целевых белков, что подтверждается высоким выходом рекомбинантного ГКСФ, оцениваемом на уровне до 70 мг/кг сырой массы. Следует подчеркнуть, что достигнутый уровень выхода рекомбинантного белка является наивысшим, полученным в экспериментах с ядерно-трансформированными растениями. Немаловажное значение разработанных диссертантом систем экспрессии на основе томатов и ряски имеет и тот факт, что эти виды растений могут быть культивированы в закрытых системах экспрессии, что минимизирует риски неконтролируемого переноса чужеродных генов в окружающую среду.

Замечания.

При прочтении диссертации у меня возникли некоторые вопросы, главным образом, дискуссионного характера:

1. Для получения линий-продуцентов различных целевых белков диссертантом использован метод агробактериальной трансформации, в основе которого лежит случайный характер распределения Т-ДНК-инсерций в геноме трансформируемого растения. В связи с этим возникает вопрос – отмечалось ли в ходе экспериментов выявление отдельных растений с мутантным фенотипом, поскольку Т-ДНК инсерции могли быть доставлены в районы расположения собственных генов растения.
2. На стр. 178 диссертантом указано, что дальнейшее повышение уровня накопления рекомбинантного белка в линиях томата Т91 и Т26 возможно за счет их гибридизации. В таком случае что, по мнению диссертанта, важнее – получить самоопыленное потомство и отобрать моноинсерционную гомозиготу по встройке в район, характеризующийся высоким выходом рекомбинантного белка для каждой линии и затем их объединить, или получить гибридное потомство от скрещивания этих двух линий, принимая во внимание, что обе линии по результатам Саузерн-гибридизации имеют по две Т-ДНК инсерции на геном.
3. В представленной работе встречаются некоторые неточности, например, по тексту используется устаревшее название канадской биотехнологической компании Medicago, которая была ликвидирована в начале 2023 года и с конца этого же года преобразована в новое юридическое лицо - Aramis Biotechnologies.
4. На странице 44 указана 3-я фаза испытаний для рекомбинантного белка PRX-102, что совсем корректно, поскольку этот белок уже коммерциализован и на рынке представлен под торговым наименованием Elfabrio® (пегунигальсидаза альфа).

Заключение

В целом, диссертационная работа оставляет очень хорошее впечатление. Выше перечисленные вопросы носят в основном дискуссионный характер, указанные незначительные недостатки в отношении терминологии не умаляют достоинств выполненной работы. Диссертационная работа А. П. Фирсова «Получение рекомбинантных белков индустриального и фармацевтического назначения в растительных экспрессионных системах», представленная на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, является завершённым научно-исследовательским трудом, имеющим существенное значение для биотехнологии, в том числе для развития платформ наработки рекомбинантных белков различного назначения на основе растительных систем экспрессии. В диссертации проведён глубокий анализ возможностей использования растительных платформ для наработки рекомбинантных белков на достаточно высоком уровне экспрессии целевых рекомбинантных белков, представляющих интерес для биотехнологического производства. На основе оптимизации различных методов и подходов диссертантом разработан протокол выделения и очистки синтезируемого в растениях целевого белка тауматина II. Полученные диссертантом результаты открывают новое направление исследований по оптимизации растительных систем экспрессии как альтернативы для крупномасштабного получения рекомбинантных белков индустриального и биофармацевтического назначения.

Полученные диссертантом результаты являются достоверными, положения и выводы по диссертационной работе вполне обоснованы. Автореферат соответствует основному содержанию диссертации. Опубликованные диссертантом научные статьи полностью соответствуют теме диссертационной работы. Диссертационная работа А.П. Фирсова соответствует требованиям главы II “Положения о порядке присуждения ученых степеней”, утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842 (в действующей редакции), а ее автор Фирсов Алексей Петрович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Дейнеко Елена Викторовна,

доктор биологических наук по специальности 03.02.07 - Генетика,
профессор, главный научный сотрудник, зав. лабораторией
биотехнологии растений

/Дейнеко Е.В./

Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН»
пр-т академика Лаврентьева, 10, 630090, Новосибирск
+7-913-740-8108

эл.почта:deineko@bionet.nsc.ru

29 сентября 2026 г.

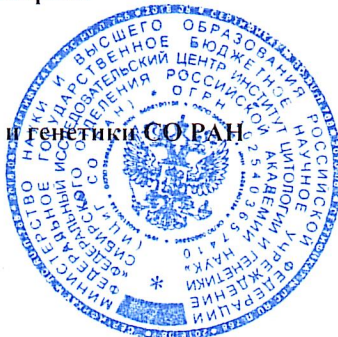
Подпись д.б.н., проф. Дейнеко Е.В. заверяю:

Орлова Галина Владимировна

Ученый секретарь

ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН»

кандидат биологических наук



/Орлова Г.В./