ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.016.01 (Д 006.027.01), СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ» (МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ) ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 19.10.2026 г. протокол № 3

О присуждении Фирсову Алексею Петровичу, гражданину Российской Федерации, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «Получение рекомбинантных белков индустриального и фармацевтического назначения в растительных экспрессионных системах» по специальности 1.5.6 – Биотехнология принята к защите 16.07.2026 г., протокол № 2, диссертационным советом 24.1.016.01 (Д 006.027.01) на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42, приказ Минобрнауки Российской Федерации № 714/нк от 02.11.2012.

Соискатель Фирсов Алексей Петрович, гражданин Российской Федерации, 20.01.1965 года рождения, в 1988 г. окончил с отличием Плодоовощной институт им. И.В. Мичурина по специальности «Плодоводство и виноградарство» с присуждением квалификации «Ученый агроном». В 1993 г. окончил аспирантуру Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина АН СССР (г. Пущино). В 1998 г. защитил кандидатскую диссертацию «Эффект гена rol C *Agrobacterium rhizogenes* на гормональный баланс и морфологические показатели трансгенных растений земляники садовой и актинидии коломикты» с присвоением ученой степени

кандидата биологических наук по специальности 03.00.12 – Физиология растений.

С 1993 по 2000 гг. работал в Всероссийском научно-исследовательском институте генетики и селекции плодовых культур им. И.В. Мичурина и Всероссийском НИИ садоводства имени И.В. Мичурина. С 2000 г. по настоящее время работает в должности старшего научного сотрудника в Филиале Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Министерство науки и высшего образования Российской Федерации.

Докторская диссертация «Получение рекомбинантных белков индустриального и фармацевтического назначения в растительных экспрессионных системах» выполнена в лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Министерство науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный консультант – доктор биологических наук Долгов Сергей Владимирович, заведующий лабораторией экспрессионных систем и модификации генома растений, главный научный сотрудник, Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Московская область, г. Пущино.

Официальные оппоненты:

1. Дейнеко Елена Викторовна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, лаборатория биоинженерии растений, отдел молекулярных биотехнологий, Федеральное государственное бюджетное

научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

2. Матвеева Татьяна Валерьевна, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, профессор кафедры генетики и биотехнологии, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург.

3. Савченко Татьяна Викторовна, доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник, лаборатория фотосинтетического окисления воды, Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», г. Пущино.

Выбор официальных оппонентов определялся их большим опытом в области генной инженерии растений, модификаций растительного генома с применением методов генетической инженерии и геномного редактирования, области биохимии растительных белков, адаптивных ответов растений, а также наличием публикаций в ведущих рецензируемых изданиях по тематике работы. Официальные оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию. Высказаны замечания и комментарии. Замечания носят рекомендательный характер, не снижают значения представленных в диссертации результатов. Ответы на все замечания представлены в стенограмме заседания.

Ведущая организация Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), г. Москва, в своем положительном отзыве, утвержденном заместителем директора по научной работе, доктором биологических наук, профессором

Равиным Николаем Викторовичем и составленном доктором биологических наук Мардановой Евгенией Сергеевной, ведущим научным сотрудником лаборатории Систем молекулярного клонирования, указала, что диссертационная работа Фирсова Алексея Петровича соответствует паспорту специальности 1.5.6 – Биотехнология. Автореферат и научные публикации соответствуют содержанию диссертации. Высказанные замечания и пожелания не имеют принципиального значения и не снижают общей положительной оценки диссертационной работы. Диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную исследовательскую работу, которая по своей актуальности, методическому решению поставленных задач, большому объёму выполненной работы, научной новизне и практической значимости соответствует требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней» (постановление Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор А.П. Фирсов заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. – Биотехнология. Отзыв не содержит критических замечаний, в нем имеется ряд вопросов к диссертанту. Ответ на отзыв присутствует в стенограмме заседания. Выбор ведущей организации обоснован высоким уровнем проводимых в ней исследований в области разработки рекомбинантных вакцин и методов получения в растениях вакцинных белков возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных, идентификации и характеристики новых ферментов для биотехнологии и биомедицины, а также высоким профессиональным уровнем сотрудников.

Соискателем опубликовано 31 научная статья в журналах, индексируемых в международных базах данных и рекомендованных ВАК, из них 17 научных публикаций (7 в журналах рекомендованных ВАК РФ, 7 в журналах международных баз данных) относятся к теме диссертации. Наиболее значительными являются следующие публикации:

1. Фирсов А.П., Куликов И.М., Долгов С.В. Сверхсладкий белок

тауматин II в селекции садовых растений // Садоводство и виноградарство.- 2024.- № 5.- С. 5-14.

2. Фирсов Г.А., Бутанаев А.М., Суслина С.Н., Фирсов А.П. Сладкие белки как новые корригенты вкуса для фармацевтической промышленности: перспективы использования. // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова.- 2024.- Том 20.- № 3.- С. 41-51.

3. Firsov A., Shaloiko L., Kozlov O., Vainstein A., Dolgov S. Tomatoes expressing Thaumatin II retain their sweet taste after salting and pickling processing // Journal of the Science of Food and Agriculture.- 2021.- Vol.- 101.- № 12.- P. 5286-5289.

4. Khvatkov P., Firsov A., Shvedova A., Kozlov O., Chernobrovkina M., Pushin A., Shaloiko L., Dolgov S. Wolffia arrhiza as a promising producer of recombinant hirudin // 3 Biotech.- 2021.- Vol. 11.- № 5.- P. 209.

5. Kozlov O.N., Mitiouchkina T.Y., Tarasenko I.V., Shaloiko L.A., Firsov A.P., Dolgov S.V. Agrobacterium-Mediated transformation of *Lemna minor* L. with hirudin and β-glucuronidase genes // Applied Biochemistry and Microbiology.- 2019.- Vol. 55.- № 8.- P. 805-815.

6. Firsov A., Tarasenko I., Mitiouchkina T., Shaloiko L., Kozlov O., Vinokurov L., Rasskazova E., Murashev A., Vainstein A., Dolgov S. Expression and immunogenicity of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 fused to Ricin toxin B chain produced in duckweed plants // Frontiers in Chemistry.- 2018.- Vol. 6.- P. 22.

7. Khvatkov P., Firsov A., Shvedova A., Shaloiko L., Kozlov O., Chernobrovkina M., Pushin A., Tarasenko I., Chaban I., Dolgov S. Development of Wolffia arrhiza as a Producer for Recombinant Human Granulocyte Colony Stimulating Factor // Frontiers in Chemistry.- 2018.- Vol. 6.- № Jul.- P. 304.

8. Firsov A., Shaloiko L., Kozlov O., Vinokurov L., Vainstein A., Dolgov S. Purification and characterization of recombinant supersweet protein thaumatin II from tomato fruit // Protein Expression and Purification.- 2016.- Vol. 123.- P. 1-5.

9. Фирсов А.П., Тарасенко И.В., Пушин А.С., Шалойко Л.А., Винокуров

Л.М., Долгов С.В. Экспрессия в трансгенных растениях табака гена пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в трансляционном слиянии с субъединицей Б рицина // Биотехнология.- 2015.- Том 31.- ж№ 2.- С. 55-64.

10. Firsov A., Tarasenko I., Mitiouchkina T., Ismailova N., Shaloiko L., Vainstein A., Dolgov S. High-yield expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in transgenic duckweed plants // Molecular Biotechnology.- 2015.- Vol. 57.- № 7.- P. 653-661.

11. Tarasenko I.V., Taranov A.I., Firsov A.P., Dolgov S.V. Expression of the nucleotide sequence for the M2e peptide of avian influenza virus in transgenic tobacco plants // Applied Biochemistry and Microbiology.- 2013.- Vol. 49.- № 8.- P. 695-701.

12. Firsov A.P., Pushin A.S., Korneeva I.V., Dolgov S.V. Transgenic tomato plants as supersweet protein thaumatin II producers // Applied Biochemistry and Microbiology.- 2012.- Vol. 48.- № 9.- P. 746-750.

13. Пушин А.С., Овчинникова Е.В., Шульга О.А., Фирсов А.П., Долгов С.В. Аккумуляция рекомбинантного суперсладкого белка тауматина II в апопласте трансгенных растений табака // Биотехнология.- 2008.- № 6.- С. 31-40.

14. Popowich E.A., Firsov A.P., Mitiouchkina T.Y., Filipenya V.L., Dolgov S.V., Reshetnikov V.N. Agrobacterium-mediated transformation of Hyacinthus orientalis with thaumatin II gene to control fungal diseases // Plant Cell Tissue and Organ Culture.- 2007.- Vol. 90.- P. 237-244.

Недостоверных сведений об опубликованных соискателем ученой степени в работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации, и заимствованных материалов или отдельных результатов без указания источника установлено не было.

На автореферат диссертации поступило 9 отзывов. Все отзывы положительные: Отзывы прислали:

1) Булгаков Виктор Павлович, д.б.н., академик РАН, главный научный сотрудник, лаборатория биоинженерии, ФГБУ Федеральный научный центр

биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук. Отзыв положительный без замечаний.

2) Вихлянцев Иван Милентьевич, д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории биофармакологии ИТЭБ РАН. Отзыв положительный без замечаний.

3) Голденкова-Павлова Ирина Васильевна, д.б.н., доцент, заведующая лабораторией функциональной геномики, ведущий научный сотрудник, ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук. Отзыв положительный, имеется ряд вопросов: 1) Хотелось бы знать мнение соискателя - не может ли увеличение выхода целевого белка тауматина в плодах томатов быть связанным с их меньшей протеолитической активностью, по сравнению с другими органами растений? 2) Соискатель указывает что растения томата Ялф были трансформированы геном тауматина II в составе вектора pBI-th35. Использован ли в составе вектора органоспецифичный промотор для достижения экспрессии целевого гена в плодах растений томатов. 3) Диссертант отмечает, что «Экспрессия рекомбинантного тауматина II в плодах томата и его корректный процессинг были дополнительно подтверждены методом Вестерн-блот анализа (рис. 4, Б)». В связи с этим возникает вопрос – какой тип процессинга происходит с целевым белком в растительной системе томатов? 4) Диссертант в автореферате указывает - Влияние структуры рекомбинантного белка на экспрессию в растениях – продуцентах. Следует уточнить о какой структуре идет речь – первичной, вторичной …? 5) Может ли β-глюкуронидаза, которая использована как партнер для синтеза пептида сказаться на свойствах целевого пептида, и следует ли для дальнейшего использования проводить разделение целевого пептида от белка-носителя? Использовал ли соискатель специфические последовательности для отщепления и какой выход пептида при этом ожидаемый?

4) Донова Марина Викторовна, д.б.н., главный научный сотрудник Лаборатории микробиологической трансформации органических соединений

Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН – обособленного подразделения ФБГУН «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований РАН». Отзыв положительный. Отмечается: «Проведенные исследования открывают широкие возможности для патентования, однако патенты в материалах автореферата не заявлены». Замечание: «следовало бы более подробно и развернуто описать современное состояние исследований, а также степень разработанности вопроса растительных экспрессионных платформ. Кроме того, остается неясным, как именно планируется переход от разработанных линий растений-продуцентов к замкнутым культуральным системам для получения рекомбинантных белков».

5) Заславская Кира Яковлевна, директор по новым продуктам ГК «ПРОМОМЕД». Отзыв положительный, отмечается: «В автореферате встречаются отдельные стилистические погрешности и опечатки, которые не влияют на общую положительную оценку работы А.П. Фирсова».

6) Калинина Наталья Олеговна, д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник отдела биохимии вирусов растений, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». Отзыв положительный, имеется ряд вопросов и замечаний: 1) В первой части работы при получении трансгенных табаков и томатов, экспрессирующих сверхсладкий белок тауматин II, приведены детальные данные органолептического анализа листьев и плодов. С какой целью? На мой взгляд при получении растения-продуцента достаточно молекулярно-биологических доказательств синтеза и анализа целевого белка. Вкусовая идентичность белка характеризуется в выделенном образце, что и было показано автором. 2) Рис. 9 и 12 показаны схемы конструкций и соответствующие последовательности нуклеотидов, оптимизированные для ряски, тогда как описывается трансформация растений табака. 3) На рисунках, представляющих Вестерн-блоты (например, рис. 13, 16, 21), не проставлены маркеры мол. масс белков,

что затрудняет оценку результатов. Почему димеризация белка называется агрегированием (рис. 16)? 4) Таблица 7. Для дальнейшего анализа выбраны трансгенные линии 51 и 54 как синтезирующие наибольшие количества рекомбинантного белка. Тогда как линии 16, 50 и 96 синтезируют не меньше. Чем обусловлен такой выбор?

7) Муратова Светлана Александровна, к.б.н., профессор кафедры садоводства, биотехнологий и селекции сельскохозяйственных культур, заведующий учебно-исследовательской лабораторией биотехнологии ФГБОУ ВО «Мичуринский государственный аграрный университет». Отзыв положительный без замечаний.

8) Хватков Павел Алексеевич, к.б.н., заведующий лабораторией биоинженерии растений, ведущий научный сотрудник, Отдел геномных и постгеномных технологий в растениеводстве, ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН». Отзыв положительный без замечаний.

9) Челебиева Элина Сергеевна, к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория Курчатовский геномный центр – НБС-ННЦ Отдела геномных и постгеномных технологий в растениеводстве, ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН». Отзыв положительный. Отмечено, что есть незначительные технические опечатки.

Соискатель Фирсов А.П. ответил на заданные ему в ходе заседания вопросы и привел аргументированные ответы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований был предложен системный подход к разработке методов получения рекомбинантных белков индустриального и фармацевтического назначения в растительных экспрессионных системах. В результате исследования было доказано, что для максимального накопления тауматина II оптимальной является его экспрессия в препроформе с нативными N- и С-концевыми сигнальными пептидами, обеспечивающими,

предположительно, его вакуолярный транспорт; локализация тауматина II в апопластном пространстве ведёт к снижению уровня его накопления; в цитоплазме клетки тауматин II не накапливается. Впервые установлено, что максимальное накопление рекомбинантного тауматина II имеет место в плодах томата, в 20–100 раз больше, чем в листьях, и достигает 4% от общего растворимого белка; и что накопление рекомбинантного тауматина II в растениях томата не влияет на агрономические характеристики растений-продуцентов, включая среднюю урожайность и вес плодов. Томаты, трансформированные геном тауматина II, полностью соответствуют исходной линии Ялф. Показано, что органолептические характеристики рекомбинантного тауматина II, выделенного из плодов томата, полностью идентичны соответствующим характеристикам тауматина II из *T. daniellii*. Впервые разработан лабораторный протокол выделения рекомбинантного тауматина II из плодов томата, который обеспечивал его выход, равный 73,7% от содержания тауматина в биомассе плодов томата и чистоту 93,1%. Выход тауматина II составил 5,4 мг/100г сырой массы томата. В результате исследований было установлено, что стабильная экспрессия пептида М2е вируса гриппа птиц возможна при слиянии с белками-партнерами: β–глюкуронидазой и с субъединицей В рицина, без слияния с белком – партнёром пептид М2е не накапливается в тканях растения-продуцента, а гирудин 2 накапливается на низком уровне. Показано, что пептид М2е вируса гриппа птиц, слитый с β–глюкуронидазой накапливается в трансгенных растениях ряски малой на более высоком уровне, чем при слиянии с субъединицей В рицина. Оральная иммунизация мышей препаратами белка трансгенных растений ряски, содержащими слитый белок RTB - М2е, вызывает индукцию специфических к М2е антител на более высоком уровне, чем в случае иммунизации слитым белком М130 - β–глюкуронидаза. В результате исследований были получены растения ряски малой, трансформированные геном рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека, накопление рекомбинантного

гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека в растениях ряски малой достигало 70 мг рекомбинантного ГКСФ/кг сырой массы продуцента.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что установлены принципы разработки методов получения рекомбинантных белков различного назначения в растительных экспрессионных системах. Показано, что для получения растений-продуцентов, накапливающих рекомбинантный белок на высоком уровне, принципиально важным является изучение способности целевого белка к накоплению в растительных тканях, в том числе определение органа растения и компартмента клетки, наиболее подходящего для его накопления; выбор белка-партнёра для слияния; оптимизация структуры гетерологичного гена. Установлено, что томат и ряска малая могут быть с успехом использованы для получения рекомбинантных белков, в том числе для использования в пищевой промышленности. Полученные в результате исследований новые знания будут использованы при разработке экспрессионных систем и методов получения рекомбинантных белков в растениях. В частности, полученные данные актуальны для разработки подходов с использованием замкнутых культивационных систем, минимизирующих экологические риски при производстве рекомбинантных белков.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что полученные в результате исследований линии томата могут быть использованы для получения сверхсладкого белка тауматина II. В диссертационной работе впервые разработан лабораторный протокол выделения рекомбинантного тауматина II из плодов томата, который обеспечивал его высокий выход и чистоту. Рекомбинантный тауматин II был выделен из плодов томата, органолептический анализ подтвердил полную идентичность его вкусовых характеристик вкусовым характеристикам тауматина из природного источника *T. daniellii.* Установлено, что томаты, трансформированные геном тауматина II полностью соответствуют исходной

линии Ялф. Трансгенные томаты линии Т91, накапливающие в плодах тауматин на уровне до 150 мг/кг сырой массы плодов, могут быть использованы как продуцент этого белка для нужд пищевой и фармацевтической отраслей промышленности, а также для улучшения вкуса томатов в селекционной работе. Полученные в ходе исследований бинарные векторы, несущие гены тауматина II и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека, могут быть использованы для трансформации различных видов растений с целью получения продуцентов этих белков. Результаты исследований продемонстрировали возможность использования трансгенных растений ряски малой для получения рекомбинантных белков различного функционального назначения. Линии ряски, накапливающие до 70 мг/кг сырой массы рекомбинантного ГКСФ человека, могут быть использованы как продуценты этого белка.

Оценка достоверности результатов выявила, что исследование было выполнено на современном сертифицированном оборудовании с применением реактивов и расходных материалов от ведущих мировых производителей. Достоверность результатов исследования обеспечивалась использованием современных и соответствующих поставленным задачам методов, включая методы молекулярной биологии, генетической инженерии и биотехнологии растений. В разделе «Материалы и методы» диссертации представлено детальное описание всех использованных методов и протоколов. Для всех полученных результатов показана воспроизводимость в независимых сериях экспериментов и проведена надлежащая статистическая обработка данных. Обоснованность выводов диссертации основана на анализе и обобщении результатов проведенных экспериментов, а также данных из литературных источников, касающихся изучаемых проблем. Достоверность полученных соискателем результатов не вызывает сомнений.

Личный вклад соискателя состоит в том, что в диссертации изложены результаты исследований, выполненных соискателем лично или под его руководством, или при его непосредственном участии. А.П. Фирсов принимал

участие на всех этапах работы – от постановки задач и формулирования проблем, планирования и проведения экспериментов до интерпретации, анализа, обобщения и подготовки научных публикаций по результатам исследований. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Диссертационный совет пришел к выводу о том, что в диссертации:

- соблюдены критерии, установленные Положением о присуждении ученых степеней, утвержденном постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, которым должна отвечать диссертация на соискание ученой степени;

- отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации;

- соискатель ссылается на авторов и источники заимствования материалов.

На заседании 19 октября 2026 г. диссертационный совет принял решение присудить Фирсову Алексею Петровичу ученую степень доктора биологических наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 11 человек, из них 10 докторов наук по специальности 1.5.6 – Биотехнология, участвовавших в заседании, из 11 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 11, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель
диссертационного совета
24.1.016.01 (Д 006.027.01) П.Н. Харченко

Ученый секретарь
диссертационного совета
24.1.016.01 (Д 006.027.01) М.В. Дудников

19.10.2026 года