

ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ  
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

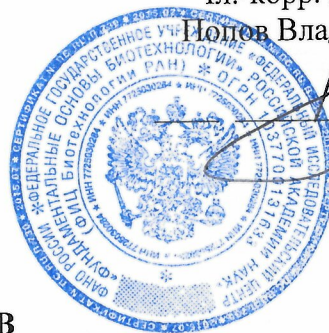
119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2  
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32  
www.fbras.ru, info@fbras.ru

09.06.2017 № 12307-2171-45

На № 401/1-217.1-474 от 25.04.2017

УТВЕРЖДАЮ

Директор  
Федерального  
исследовательского центра  
«Фундаментальные основы  
биотехнологии»  
Российской академии наук  
Чл.-корр. РАН, профессор  
Попов Владимир Олегович



2017 г.

### О Т З Ы В

ведущей организации на диссертационную работу **Смирнова Ивана Витальевича** «Направленное изменение функциональных свойств биокатализаторов», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Предложенная к рассмотрению диссертационная работа представляет собой раздел белковой инженерии, в котором предлагаются подходы к приданию белковым молекулам новых, не типичных им ранее свойств биокаталитической активности. В качестве объектов исследования использованы антитела – как пример биологической молекулы с предположенной функцией специфического связывания лиганда, а также ферменты, как объект направленного изменения функциональной активности или индукции новой несвойственной для конкретного фермента типа каталитической активности. В работе предлагаются новые принципы создания биокатализаторов с новыми функциональными активностями и работе решаются задачи, представляющих как фундаментальный научный, так и прикладной интерес.

С точки зрения развития фундаментальной науки в ходе выполнения диссертационной работы автор усовершенствовал технологию получения биокатализаторов на основе антител. Был предложен новый метод получения каталитических антител, предрасположенных к ковалентному катализу. Данный метод получил название – метод получения «реактибоди» и был успешно опубликован в виде научной статьи в высокорейтинговом журнале Proceedings of the National Academy of Sciences. С использованием этого метода автору впервые удалось получить антитело, способное гидролизовать фосфорорганический пестицид параоксон. Как логичным

продолжением этой работы был разработан комплекс квантово-механических и молекулярно-механических расчетов, который позволил получить мутантный вариант антитела, проявляющий 170-кратное увеличение эффективности взаимодействия с фосфорорганическим пестицидом параоксон по сравнению с исходным антителом. Важно отметить, что данный метод является универсальным, основывается только на знании механизма каталитического процесса, что открывает широкие перспективы его использования для других фермент-субстратных систем. Безусловной заслугой автора является создание платформы для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической активности в каплях двойной микрофлюидной эмульсии. Высокая селективность и чувствительность платформы позволили детектировать различные типы активности, а также дискриминировать уровни одинаковой активности. В качестве примера практического приложения этой разработки были найдены новые каталитические антитела на основе рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека, способные к самореактивации при ингибировании пестицидом параоксон.

Как было упомянуто выше, работа сочетает в себе не только фундаментальные научные исследования, но и разработки, которые могут быть внедрены в биотехнологическое производство в кратчайшей перспективе. Примером этого является создание препаратов пролонгированного действия на основе рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека. Автор предложил два независимых подхода, один из которых представляет собой химическое присоединения полимера сиаловых кислот к ферменту. Метод позволил впервые получить полисиалированное производное гидролитического фермента. Автор применил оригинальный способ поиска эффективных условий конъюгации, которые позволили получать препарат с 80%-ным выходом при менее чем 20% потерей специфической активности. Представленный способ позволил увеличить время полувыведения полисиалированного препарата в 5,5 раз в сравнении с исходным ферментом. Более того была показана высокая эффективность, полученного препарата в качестве профилактического биологического антитела. Защитный индекс по веществу боевому отравляющему веществу VR составил 4,2 ЛД50, что сопоставимо с препаратом БУХЭ плазмы крови человека. Результаты опубликованы в журнале *Proceedings of the National Academy of Sciences*, проведены доклинические исследования, подана заявка на патент. В качестве альтернативного подхода был использован генно-инженерный способ создания тетрамерная форма бутирилхолинэстеразы. Для этого была создана панель новых экспрессионных конструкций, сочетающие в себе самые современные генетические элементы для увеличения уровня транскрипции и трансляции целевого гена. В результате был получен рекомбинантный фермент в исключительно

тетрамерной форме с уровнем продукции до 70 мг/л. Необходимо отметить, что разработанная технология продукции 4pчБуХЭ является уникальной и не была реализована ни в одной лаборатории мира. Создание тетрамерного фермента позволило увеличить время полувыведения препарата в 10 раз по сравнению с исходной олигомерной бутирилхолинэстеразой. Полученный препарат также был протестирован *in vivo* и обеспечивал высокие показатели выживаемости мышей, получивших абсолютно летальную дозу пестицида параоксон.

Еще одним результатом представляющий прикладной интерес является разработка способа индукции вируснейтрализующих антител против ВИЧ-1, основанного на использовании комбинированного «ДНК-белкового» липосомального препарата. Автор показал, что иммунизация таким препаратом лабораторных мышей приводит к увеличению титра специфических антител, и антитела, выделенные из сыворотки крови животных, получивших препарат, обладают высоким уровнем вируснейтрализующей активности. Препарат прошел весь комплекс доклинических исследований и находится на первой стадии клинических испытаний.

В целом работа представляет собой комплексное исследование, которое включает в себя как индукцию биокаталитической активности, направленное изменение специфичности и кинетических параметров биокатализаторов, а также их фармакокинетических характеристик. В качестве объектов рассмотрены два больших класса биологических молекул – антитела и ферменты.

Объем диссертационной работы составляет 200 печатных страниц, содержит 74 рисунка и 21 таблицу.

Литературный обзор покрывает широкий спектр современных исследований направленных на изучения механизмов каталитических реакций, осуществляемых как ферментами, так и антителами. В обзоре подробно описаны методы, используемые для индукции и модификации каталитической активности. Рассмотрены подходы к рациональному дизайну искусственных ферментов, а также комбинаторных методов скрининга ферментов и антител. Описаны способы поиска каталитической активности в каплях однократной и двукратных эмульсий, из этих данных очевидно, что полученные в диссертационной работе результаты являются следующим шагом в развитии технологий скрининга функциональной активности в эмульсионных каплях. В целом обзор написан хорошим языком, просто и доступно читается. Раздел «Материалы и методы» описывает все использованные в исследованиях методики, сомнений в возможности воспроизвести полученные результатов нет.

В разделе «Результаты и обсуждение» представлено три логично связанных блока

исследований. Первый блок посвящен способам индукции и модификации каталитической активности у антител. Во второй части предложен универсальный способ скрининга биокаталитической активности, который был протестирован на трех ферментах с различным типом каталитической активности: ДНКазaI, энтерокиназа и бутирилхолинэстераза, и успешно доказал свою эффективность. Третий блок посвящен более прикладной задаче – разработке технологий получения препарата рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека пролонгированного действия.

Диссертация представляет собой пример научной работы высочайшего класса. Полученные результаты и выводы не вызывают сомнений. Однако, имеет ряд замечаний и недостатков.

1. Работа изобилует орфографическими ошибками и стилистическими неточностями.
2. В работе имеются ошибки по форматированию текста, например, на страницах 44, 52, 80, 81, 87, 97 текст очевидно имеет больший размер шрифта. Вполне возможно, что автор хотел привлечь внимание, но по логике текста скорее всего это ошибка.
3. Большинство рисунков выполнены на высоком уровне, однако встречаются исключения, в частности рис. 45, описывающий масс-спектрометрическое исследование, качество рисунка плохое, подписи осей не читаются.
4. В диссертации 74 рисунка, однако встречаются ссылки на рисунок 81Б.
5. Таблицы имеют различное форматирование, это не мешает анализу полученных результатов, но визуально выглядит странно.
6. В разделе «Материалы и методы» приведен раздел, посвященный кристаллизации Fab-фрагмента антитела L-S35R и его рентгеноструктурный анализ, однако автор не приводит условия кристаллизации и РСА с исходным антителом A17, которое представляет собой первый пример антитела «реактибоди» и является важной частью исследования.
7. В диссертации недостаточно подробно приведены методы и параметры, используемые в расчетных методах, в частности учитывали ли молекулярную динамику на стадии проведения докинга? Также не очевидно, учитывали ли молекулярную динамику при проведении квантово-механических расчетов.
8. Одним из значимых результатов является доказательство механизма индуцированного соответствия, однако и приведённых данных неочевидно на основании чего автор делает такое заключение.

Отмеченные недостатки не снижают общей оценки рецензируемой работы.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации, результаты диссертации полностью отражены в научных статьях, опубликованных автором в

ведущих российских и зарубежных журналах, результаты работы доложены на отечественных и международных конференциях.

Диссертация Смирнова И.В. «Направленное изменение функциональных свойств биокатализаторов» полностью отвечает требованиям "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор Смирнов Иван Витальевич заслуживает присуждения искомой степени доктора химических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Диссертационная работа была заслушана на межлабораторной конференции Института биохимии им. А.Н.Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» – Российской академии наук (Протокол № 2 от 26 апреля 2017 г.).

Профессор, д.х.н.

Савицкий А.П.

Заведующий лабораторией физической биохимии  
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН  
г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2.  
119071 Российская Федерация  
тел.: + 7 (495)-954-6512  
e-mail: apsavitsky@inbi.ras.ru

