

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М.  
ШЕМЯКИНА И Ю.А. ОВЧИННИКОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

## **СТЕНОГРАММА**

заседания диссертационного совета Д 002.019.01

«28» июня 2017 года

Защита диссертации **Смирнова Ивана Витальевича** на тему:  
«НАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ  
БИОКАТАЛИЗАТОРОВ»

на соискание ученой степени доктора химической наук

специальность 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Москва – 2017 г.

## СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 28 июня 2017 года.

Заместитель председателя диссертационного совета  
доктор физико-математических наук

Р.Г. Ефремов

Учёный секретарь диссертационного совета  
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствует 22 человека, из них докторов наук по профилю диссертации – 8. Кворум имеется.

1.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
2.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
3.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
4.	Академик РАН	Богданов Алексей Алексеевич	(03.01.03)
5.	Академик РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
6.	Член-корр. РАН	Деев Сергей Михайлович	(03.01.03)
7.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
8.	Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
9.	Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
10.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
11.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
12.	Академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
13.	Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
14.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(02.00.10)
15.	Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
16.	Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
17.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
18.	Академик РАН	Свердлов Евгений Давидович	(03.01.03)
19.	Д.х.н.	Формановский Андрей Альфредович	(02.00.10)
20.	Член-корр. РАН	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
21.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
22.	Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)

**Ефремов Роман Гербертович:** Первая защита будет представлена Смирновым Иваном Витальевичем. Тема – докторская диссертация на соискание степени доктора химических наук по специальности 03.01.06 «Биотехнология, в том числе бионанотехнология». Название «Направленные изменения функциональных свойств биокатализаторов». Владимир Александрович сейчас расскажет о том, все ли документы имеются в деле. Кворум у нас имеется, как мне сообщают, так что мы правомочны начать это заседание. Владимир Александрович, пожалуйста.

**Олейников Владимир Александрович:** *(Зачитывает документы, содержащиеся в личном деле соискателя. Отмечает, что объявление о защите и автореферат*

диссертации размещены на сайте ВАК вовремя и все необходимые документы в деле есть).

**Ефремов Роман Гербертович:** Коллеги, хочу проинформировать еще, что официальными оппонентами по диссертации Смирнова Ивана Витальевича, являются Дебабов Владимир Георгиевич, академик РАН, доктор биологических наук, научный руководитель ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов». Вторым оппонентом является Пышный Дмитрий Владимирович, член-корреспондент Российской академии наук, профессор, доктор химических наук, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН (ИХБФМ СО РАН). Оппонентом также является Демидкина Татьяна Викторовна, доктор химических наук, и.о. заведующего лабораторией химических основ биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН). Ведущей организацией является Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. Есть ли какие-нибудь вопросы по формальностям, связанным с представленными материалами? Если вопросов нет, тогда Иван Витальевич, пожалуйста, 40 минут вам на выступление.

**Смирнов Иван Витальевич:** *(Излагает основные положения диссертационной работы).*

**Ефремов Роман Гербертович:** Вопросы, пожалуйста. Пожалуйста, Александр.

**Василевский Александр Александрович – к.х.н.:** Если позволите, у меня два вопроса. Один по механизму гидролизу, а точнее в первой стадии, на которой удалось реализовать разрушение параоксона каталитическим антителом, по которому вы провели дизайн и создали. Вот там получалось, что ведение положительного заряда, способствует каталитической активности. И в частности, аргинин, в том мутанте, в котором вы в дальнейшем выбрали для исследования. Может ли быть дело в том, что введение положительного заряда способствует диссоциации каталитического тирозина. Если я правильно понял, то ключевая стадия – это протонирование субстрата, то есть диссоциация тирозина с образование отрицательного заряда. Может быть, дело просто вот в этом, что положительный заряд помогает диссоциации?

**Смирнов Иван Витальевич:** Да, отличный вопрос потому что, объясню почему. Потому что сейчас, уже после всех формальных процедур, которые включены в диссертационную работу, мы провели еще один раунд отбора. Мы немного

усовершенствовали использованный нами метод квантово-механического расчета, и провели еще один раунд поиска. И обнаружили другой мутант, более эффективный. Дело в том, что в случае замены аргинина, чисто исходя из стерических затруднений, из расстояния аргинина от активного нуклеофильного тирозина, и его положения, невозможно депротонирование. Просто по расстоянию, и по положению этого остатка. Однако, при замене в этом положении. Вернее, у нас есть другое положение, в котором происходит замена на положительный остаток, это лизин в 47 положении, расстояние как раз достаточное, и в этом случае у нас реализуется механизм не стабилизации субстрата в активном центре, а именно оттягивание протона и облегчения переноса протона на фосфорильный атом кислорода.

**Василевский Александр Александрович – к.х.н.:** Спасибо, второй вопрос такой общего характера. Те аналитические антитела, о которых вы рассказывали, если опять же я правильно разобрался относятся к гидролазам, существует ли каталитические антитела, которые другим классом ферментов относятся. Но то есть там оксидоредуктазы, трансферазы и так далее.

**Смирнов Иван Витальевич:** Безусловно, достаточно большое количество каталитических антител, я могу даже продемонстрировать, если позволите, в таком быстром виде. Вот этот слайд, что существует достаточно большое количество разнообразных каталитических антител, которые гидролизуют все типы реакций, которые здесь приведены, для них все существуют каталитические антитела. Поэтому действительно, в зависимости от задач, которые можно перед собой поставить, можно получить в принципе каталитические антитела для любого химического процесса, в принципе. Эффективность таких антител зачастую гораздо меньше, чем эффективность реальных ферментов, и это по понятным причинам понятно. Опять же, как я уже упоминал все-таки активный центр антитела - это некое искусственное образование, и до эволюционно-совершенного активного центра фермента ему далеко. Однако, в принципе существуют примеры, когда существуют каталитические антитела для реакций, для которых нет ферментов. Спасибо.

**Ефремов Роман Гербертович:** Пожалуйста, еще вопросы, Лев Иванович.

**Патрушев Лев Иванович – д.б.н, профессор, член совета:** Скажите, пожалуйста, как вы оцениваете возможность изменения субстратных специфических ферментов *in vivo*, в результате соматического мутагенеза. У человека десять в пятнадцатой степени клеток организм состоит. Скорость мутагенеза известна, в принципе. Возможно вообще такое, чтобы изменялась субстратная специфичность, образовывались не свойственные

организму метаболиты и так далее, на протяжении жизни организма. Как вы такой шанс оцениваете?

**Смирнов Иван Витальевич:** Такой шанс безусловно есть, однако, у живого организма существует большое количество механизмов, которые будут стараться препятствовать этому нежелательному процессу, и часто бывает так, что все-таки нарушение активного центра фермента часто приводит к его инактивации, как природной, так и не природой. Безусловно, существуют примеры, когда мутагенез ферментов приводит к изменению субстратной специфичности. Это возможно, но я думаю, что в составе живого организма будут включаться механизмы, которые будут каким-то образом препятствовать этому. Возникновение ингибиторов, или деградация этого фермента, если он становится опасным для организма. Спасибо.

**Ефремов Роман Гербертович:** Пожалуйста, еще вопросы? Если позволите, у меня есть несколько вопросов, они в основном относятся к первой части доклада.

Если я правильно понимаю, все-таки выход на этот новый белок A17, нельзя сказать, что он был открыт на кончике пера. Сначала была экспериментальная работа, вы проверили активности большого набора антител, и выбрали белок, который показал наибольшую активность. Дальше выделили, кристаллизовали, поняли, как устроен активный центр, и начали проводить собственный дизайн. А вот как вы считаете, нельзя было бы пойти полностью путем рационального дизайна, то есть от параоксона? Вы потом сравнили активный центр этого A17 с известными активными центрами. Существует просто базы данных активных центров, и просто попробовать совместить параоксон, с известными уже в другие белках активными центрами, понять, как это устроено. И дальше начинать уже продолжать этот рациональный дизайн.

**Смирнов Иван Витальевич:** Спасибо за вопрос, это действительно очень интересная область, в которой мы сейчас активно начинаем работать. Мы сейчас проводим такую серию исследований, экспериментов, в которых мы используют в белковую молекулу как фолд, исключительно как некую структурную единицу, для структурной организации активного центра совершенно не свойственного антителам. То есть, например, мы стараемся принести активный центр фермента, его архитектуру активного центра фермента, в фолд антитела. Эти работы у нас сейчас идут, об их результатах, я думаю, мы узнаем в самое ближайшее время. Потому что действительно, это очень интересная тема, и мы действительно этим занялись. Это возможно, на наш взгляд, мы попробуем.

**Ефремов Роман Гербертович:** Еще один вопрос тогда, а, пожалуйста.

**Демидкина Татьяна Викторовна – д.х.н., профессор, официальный оппонент:** Иван Витальевич, я хотела спросить, а какие перспективы улучшения каталитических свойств клона, вы собираетесь ли вы этим заниматься, четырнадцатым клоном бутирилхолинэстеразы.

**Смирнов Иван Витальевич:** Для этого клона, соответственно, две перспективы для клона №14. И отдельная перспектива для метода, которым он получен. Для клона №14 у нас первое, что мы хотим попробовать, мы хотим проверить его, он все-таки каталитические антидот, и мы хотим проверить, может ли он обладать каким-то биологическим протективным действием, по сравнению с бутирилхолинэстеразой дикого типа. Причем эффективность. По крайней мере, эффективность взаимодействия, то есть, связывание субстрата, у них не отличается. Соответственно, по идее не должен быть хуже, должен быть лучше. С точки зрения эффективности катализа, мы сейчас проводим анализ, компьютерный анализ по методологии, которые мы используем для антител, для того чтобы определить условия, которые могут нам позволить увеличить ее каталитическую эффективность, и эти исследования сейчас идут.

**Демидкина Татьяна Викторовна д.х.н., проф., официальный оппонент:** Квантово-механические расчеты, возникает вопрос о том, какова человеческая и может быть материальная стоимость этих расчетов?

**Смирнов Иван Витальевич:** Так как наука – это все-таки такой, она в основном связана с энтузиазмом исследователя, поэтому человеческие ресурсы, их очень тяжело оценить, как-то монетизировать. С точки зрения использования оборудования, наши коллеги, с которыми мы проводим эту работу, они имеют свободный доступ к суперкомпьютеру «Ломоносов», и в своей лаборатории образовали кластер, который позволяет проводить достаточно эффективные исследования. И часть работ можно проводить у них. В этом случае, насколько это дорого, можно оценить скорее бытовом уровне, но это не настолько баснословно дорого, чтобы это было препятствием для этих исследований.

**Ефремов Роман Гербертович:** Если позволите, Сергей Кириакович, пожалуйста.

**Завриев Сергей Кириакович – д.б.н., профессор, член-корр. РАН, член совета:**  
1) У меня такой вопрос, если время вывода препарата у мыши 30 часов приблизительно. То в принципе действие защитное теряется, скорее всего, правильно? А что само пребывание этой молекулы в организме, 30 часов, оно не дает побочных эффектов? А если в принципе пролонгировать действие еще сильнее, каждые сутки колоть его, будет какой-то отрицательный результат? В смысле отрицательное воздействие на организм или нет? Потому что если говорить о том, что такой подход может лечить, детоксикацию

организма проводить, просто интересно понять, когда его применять? Перед химической атакой, например, или сразу после нее? Насколько долго можно без последствий применять его в организме проявляя само появление опасности, с одной стороны?

2) Второй вопрос вдогонку. Есть ли перспективы увеличения времени жизни в организме, мутация этого препарата так, чтобы увеличить время жизни его в организме, на неделю, например, на месяц? Для того, чтобы можно было действительно постараться предотвратить возможную интоксикацию. Потому что сразу никто не знает, когда проводится и сколько.

**Смирнов Иван Витальевич:** Я понял вопрос, спасибо большое.

1) Касательно первого вопроса, мы проводили исследования в процессе доклинических исследований, мы проводили исследования по хронической и субхронической токсичности этого препарата. Мы делали многократное введение, и в поведенческих тестах, животные, которые получали этот препарат, их поведение не изменилось, единственным моментом, который мы наблюдали – это возникновение раздражения, в месте введения этого препарата. Это понятно, потому что постоянно препарат вводится. Поэтому, мы в принципе, можем утверждать, что препарат при многократном введении, он также не вызывает каких-то серьезных токсических эффектов. С точки зрения его использования, при различных отравлениях, тут какая ситуация. Достаточно известный такой факт, который я обнаружил при изучении литературы, что во время конфликта, по-моему, в Ираке, был использован так называемый гидролазный коктейль, который включал в своем составе ферменты типа бутирилхолинэстеразы, ацетилхолинэстеразы, карбоксилэстеразы, по-моему. Который вводили солдатам, американским солдатам, перед тем как отправляли их в атаку. Собственно, когда там были какие-то боевые действия. Это было сделано для того, чтобы снизить возможные последствия при химической атаке. Химическая атака, если это боевое применение вещества, то она, конечно, очень быстрый процесс. Ввести антидот после этого, практически бесполезно, потому что человек погибает крайне быстро. В случае бытовых отравлений это имеет смысл как профилактический, так и для целей детоксикации. А в плане бытовых отравлений, это действительно возможно, потому что большое количество пестицидов, которые используются, это все-таки фосфорорганические соединения.

2) С точки зрения дальнейшего увеличения активности этого препарата, здесь надо, пролонгировать. Здесь можно рассмотреть еще альтернативные способы, которые я не рассматриваю в своей диссертации, в частности конъюгации с какими-то белками крови, например, с сывороточным альбумином, что также описано и приводит к хорошим результатам. То есть можно в этом направлении также работать.

**Ефремов Роман Гербертович:** Еще есть вопросы? Если позволите, я. Все-таки работа очень многоплановая, интересная и много расчетов. И, соответственно, возникают вопросы, не могу удержаться. Вот когда вы использовали гибридные технологии: и квантово-механические, и молекулярно-механические, я уже спрашивал один раз, Анастасию Степанову, когда она защищалась по сходной теме, ваша аспирантка. Все-таки вопросы об устойчивости получаемых решений, когда вы используете протокол докинга, мишень у вас была неподвижной, или вы учитывали конформационную подвижность?

**Смирнов Иван Витальевич:** Да, мы учитывали конформационную подвижность активного центра.

**Ефремов Роман Гербертович:** То есть, докинг делали не в одну мишень, а в большой набор состояний.

**Смирнов Иван Витальевич:** Да, варианты состояний. Безусловно, это принципиальный момент, потому что, конечно, здесь сильно зависит от того, насколько корректно мы выберем стартовое состояние. Нам может повезти, чаще всего может не повезти.

**Ефремов Роман Гербертович:** Вопрос. Дальше для гибридного расчета вы брали какую-то вполне определенную структуру, потому что расчет действительно очень дорогой. Тут даже дело не в том, что это дорогой расчет, просто задача должна быть сформулирована корректно, потому что найти сейчас суперкомпьютерный ресурс – не такая большая проблема. Пробовали ли вы такой QMMM расчет проводить с разных стартовых ориентаций? И как решение, как механизм реакции, переходное состояние и так далее зависели от выбора старта. Были ли чувствительны результаты к тому, какой старт вы задавали?

**Смирнов Иван Витальевич:** Ситуация следующая. Да, действительно мы проверяли, мы проводили квантово-механические расчеты для нескольких состояний положения субстрата. Чаще всего мы наблюдали два варианта, в которых у нас реализовывалась реакция. Чаще всего это было именно то состояние, которое я привел, и был некий кластер состояний, в которых проходила квантово-механическая реакция, с точки зрения, именно, расчетов. Но в этом случае положение уходящей группы было как бы под углом. И с точки зрения современных представлений химии эта реакция должна протекать таким образом, что атакующий тирозин должен находиться в оппозитном положении от уходящей группы. Вот таких состояний у нас было больше всего, но тем не менее, действительно, встречались состояния, когда эта геометрия не реализовывалась.

Мы не стали включать это в расчеты, потому что такая ситуация, наверное, может быть объяснена за счет каких-то последующих типологий. Но в дальнейшем расчет, мы



решили все-таки сосредоточить на том, что встречаются чаще всего, а именно такое положение субстрата.

**Ефремов Роман Гербертович:** Еще один вопрос, он такой более технический. Вы сказали, что выбирали параметры динамики таким образом, чтобы степень успеха, вероятность реализации переходного состояния была 50%. На самом деле вероятность реализации переходного состояния, она не зависит от того, какие параметры и какую динамику вы используете. Это есть физическая характеристика процесса. Вы просто протокол оптимизировали, чтобы поймать вот это переходное состояние, я правильно понимаю?

**Смирнов Иван Витальевич:** Верно. Когда я говорил эту фразу, что я имел в виду? У нас есть несколько независимых запусков реакции. И в этой ситуации у нас реакция может пройти, то есть, переходное состояние может образоваться, а может не образоваться. Для того чтобы увеличить вероятность образования этого состояния, мы насильно приближали субстрат.

**Ефремов Роман Гербертович:** То есть вы ограничения какие-то использовали?

**Смирнов Иван Витальевич:** Да, мы использовали ограничения, и вот выбирали такие ограничения, чтобы было 50%, для чего? Чтобы впоследствии можно было как-то оценить вероятность, эффективность будущих вариантов мутантов. То есть если они будут меньшей вероятностью образовываться, то, наверное, нам такие варианты не нужны. Мы это сделали, мы действительно накладывали ограничения для того, чтобы выбрать критерии последующего отбора.

**Ефремов Роман Гербертович:** Понятно. И еще, наконец, один вопрос, такой более общий. Может быть, я упустил что-то. Все-таки потом, вы во второй части работы рассказывали о бутирилхолинэстеразе, а не о вашем сконструированном A17\* с мутациями. Вы с ним планируете дальше как-то развивать?

**Смирнов Иван Витальевич:** Как я вам сказал, что сейчас у нас одно из направлений исследований, направлено на..., мы обнаружили, уже обнаружили новые мутанты, которые взаимодействуют чуть даже более эффективно, чем этот мутант S35R. Сейчас наши исследования направлены на, все-таки с попыткой обеспечить эффективное дефосфорилирование этого ковалентного комплекса. Потому что использование антитела A17 S35R мутанта в каких-то практических целях, оно нецелесообразно. Эффективность взаимодействия, конечно, выше почти в 200 раз, чем у антитела исходного, но его все равно недостаточно для того, чтобы использовать в качестве потенциального терапевтического средства. Мы проводили эти исследования. Фармакокинетика, как у

всех антител, она очень хорошая, а вот защитное действие, оно не отличается от физраствора.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо. Если вопросов нет, тогда предлагаю двигаться дальше, Владимир Александрович, ознакомьте, пожалуйста, с поступившими отзывами и с отзывом ведущей организации.

**Олейников Владимир Александрович:** *(Оглашает отзыв ведущей организации. Отзыв положительный. Отзыв прилагается).* Ведущая организация у нас Федеральный исследовательский центр «Фундаментальной основы биотехнологии». Отзыв положительный, и значит, что пишут. Предложенная к рассмотрению диссертационная работа, представляет собой раздел белковой инженерии, в котором предлагается подходы, к преданию белковым молекулам новых, нетипичных им ранее свойств биокаталитической активности. В работе предлагаются новые принципы создания биокатализаторов, с новыми функциональными активностями, и решаются задачи, представляющие как фундаментальный научный, так и прикладной интерес. С точки зрения развития фундаментальной и науки в ходе выполнения автор усовершенствовал технологию получения катализаторов на основе антител. Предложен новый метод получения каталитических антител. Метод новый получил название «Метод получения реактибоди», и он был успешно опубликован в виде научной статьи в высокорейтинговом журнале. С использованием метода автору впервые удалось получить антитело способное гидролизовать фосфорорганический пестицид параоксон.

Логичным продолжением этой работы был разработан комплекс квантово-механических и молекулярно-механических расчетов. 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, дискриминировать уровни одинаковой активности.

Работа сочетает в себе не только фундаментальные научные исследования, но и разработки, которые могут быть внедрены в биотехнологическое производство. Примером этого является создание препарата пролонгированного действия на основе рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека.

Автор предложил два независимых подхода, один из которых представляет собой химическое присоединение полимера сиаловых кислот к ферменту. Метод позволил впервые получить полисиалированные производные гидролитического фермента.

Результатом, еще одним, представляющим прикладной интерес, является разработка способа индукцией, 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.

В целом, работа представляет собой комплексное исследование, включающее в себя как индукцию биокаталитической активности, направленную на изменение специфичности и кинетических параметров биокатализаторов, а также их фармакокинетических характеристик.

В качестве объекта рассмотрены два больших класса биологических молекул: антитела и ферменты.

Структура диссертации 200 печатных страниц, 74 рисунка, 21 таблица. Литературный обзор написан хорошим языком, просто и доступно читается. Материалы и методы описывают все использованные в исследованиях методики, сомнений в возможности воспроизвести полученные результаты нет, нет сомнений.

Результаты обсуждения – это три логичных блока. В целом диссертация представляет собой пример научной работы, высочайшего класса, и полученные результаты выводы не вызывает сомнения.

Однако имеется ряд замечаний и недостатков:

1. Работа изобилует орфографическими ошибками и стилистическими неточностями.

2. В работе имеются ошибки по форматированию текста, например, на таких-то, таких-то страницах. Вполне возможно, что автор хотел привлечь внимание, но по логике текста, скорее всего, это ошибка.

3. Большинство рисунков выполнено на высоком уровне, однако встречаются исключения. В частности, рисунок 45, описывающий масс-спектрометрическое исследование. Качество рисунка плохое, подписи и оси не читаются.

4. В диссертации 74 рисунка, однако встречаются ссылки на рисунок 81.

5. Таблицы имеет различное форматирование, это не мешает анализу полученных результатов, но визуально выглядят странно.

6. В разделе материалы и методы, приведен раздел, посвященный кристаллизации фрагмент антитела и его рентгеноструктурный анализ. Однако автор не приводит условия кристаллизации, которые представляют собой первый пример антитела реактибоди, является важной части исследования. Кристаллизация с исходным антителом A17.

7. В диссертации недостаточно подробно приведены методы и параметры, используемые в расчетных методах. В частности, учитывали ли молекулярную динамику на стадии проведения докинга. Также неочевидно учитывали ли молекулярную динамику при проведении квантово-механических расчетов.

8. Одним из значимых результатов является доказательством механизма индуцированного соответствия, однако из приведенных данных неочевидно, на основании чего автор делает такое заключение.

Отмеченные недостатки не снижают общей оценки рецензируемой работы.

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

Диссертация Смирнова соответствует Положению «О присуждении ученых степеней». Автор ее, Смирнов Иван Витальевич, заслуживает присуждения искомой степени доктора химических наук по специальности 03.01.06 - «Биотехнологии, в том числе бионанотехнологии».

Обсуждена работа на межлабораторной конференции Института биохимии имени Баха, подписана профессором доктором технических наук Александром Павловичем Савицким. И утверждено директором Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Владимиром Олеговичем Поповым.

**Ефремов Роман Гербертович:** Иван Витальевич, пожалуйста.

**Смирнов Иван Витальевич:** *(Ответ на замечания ведущей организации).*  
Спасибо, Александр Павлович, за столь подробное изучение моей работы. И, безусловно, я согласен со всеми замечаниями, которые имеют оформительский характер. И, действительно, это моя недоработка, которую я в последствии в других работах постараюсь каким-то образом избегать. Из замечаний, которые относятся к таким существенным экспериментальным вещам. Действительно, в материалах и методах я пропустила раздел, посвященный кристаллизации антитела Fab-фрагмента антитела A17, это так. Однако условия кристаллизации этого антитела можно найти в публикации в ПНАСе, которая, собственно, является частью, в которой описаны результаты диссертации. И отличие в условиях кристаллизации на самом деле только в рН-буфере, который был использован. В диссертации приведена кристаллизация Fab-фрагмента мутанта S35R и не приведено антитела A17. Там отличие только в рН-значении использованного буфера. Однако, действительно, это моя ошибка, но в случае необходимости, эта информация не секретная, она открытая, ее действительно можно получить.

По поводу использования молекулярной динамики, на стадии проведения докинга и при квантово-механических расчетах, это как раз вопрос Романа Гербертовича. Действительно, вся эта молекулярная динамика учитывалась.

И по поводу параметров, часть параметров, она не приведена в материалах и методах, но она приведена, например, в тексте диссертации, на странице 127 эти параметры указаны.

По поводу доказательства механизма индуцированного соответствия – это доказательство строилось на известных расчетах, часть этих расчетов опубликована в статье, на которую я ссылаюсь это статья Фут и Мильштейн, которая была опубликована в ПНАС 1994 года. В принципе, эти расчеты основываются на использовании следующей формулы. В этом случае предсуществующих конформеров наблюдаемая скорость реакции описывается следующей формулой. И в этом случае при увеличении концентрации субстрата очевидно, что наблюдаемая скорость реакции будет снижаться. В случае механизма индуцированного соответствия наблюдаемая константа скорости реакции при увеличении концентрации субстрата будет увеличиваться. В нашем случае, как я приводил в докладе, наблюдается именно такая ситуация, что подтверждает реализацию механизма индуцированного соответствия.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо, теперь слово предоставляется научному руководителю. Не руководителю, а консультанту. У нас консультанта нет. Владимир Александрович, тогда огласите отзывы на автореферат, если они имеются.

**Олейников Владимир Александрович:** К сожалению, отсутствуют отзывы на автореферат.

**Ефремов Роман Гербертович:** Понятно, тогда, коллеги, переходим к дискуссии, и слово предоставляется официальному оппоненту, первому. Владимир Георгиевич Дебабов, пожалуйста.

**Дебабов Владимир Георгиевич – д.б.н, официальный оппонент:** *(Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается).* Уважаемые коллеги, уважаемые председатель. Я бы сказал, что работа, которую вы слышали, она, конечно, поражает вообще даже воображение разнообразием подходов, уровнем методологическим. И даже, вы прослушали хороший доклад. И тут вообще, конечно, я бы сказал, даже на несколько работ бы хватило, наверно, докторских. Потому что достаточно разнообразные затронуты проблемы. Что для простоты, конечно, можно разделить всю эту работу на две части. Одна – это такая теоретическая часть, где были попытки квантово-механические, с помощью молекулярной динамики рассчитать активные центры. Про эту часть работы уже очень много как раз сегодня дискутировали. И нужно сказать, что я не являюсь

специалистом ни по молекулярной динамике, ни по тем более квантовой химии. А когда я кончал очень давно химфак, мне казалось, что с помощью квантовой механики можно рассчитать только молекулы водорода и то не очень точно. Здесь я ошибался, прогресс большой, оказалось, что можно что-то еще.

Так что работа у вас состоит из двух частей, про первую часть я бы даже, я вам сказал, что я не являюсь специалистом, но поскольку здесь была хорошая дискуссия. Работа опубликована в очень хороших, достойных журналах. Наверное, это вообще определенной шаг в рациональном дизайне. Мечта вообще всех энзимологов и вообще всех биохимиков, особенно биотехнологов. Я, скорее, биотехнолог. Это конструировать молекулы по заранее известному плану.

Кстати, с точки зрения биотехнологии и практических результатов, я бы сказал, что не так уж и впечатляюще эти результаты, потому что удалось, как было доложено, одну часть проиллюстрировать – это созревание антител. Потому что практически удалось с помощью этого дизайна и мутагенеза рассчитать и получить экспериментально антитело, которые в 170 раз более эффективно абсорбирует параоксон, субстрат. Вообще-то никаких изменений в каталитической активности так и не удалось получить, в общем-то.

Хотя этот расчет может приводит к созреванию антител и улучшить каталитическую активность, но он пока, в данном случае, каталитическую активность не увеличил.

Конечно, мне ближе та часть работы, которая связана с практическими вещами. Многие методологические находки, которые в этой работе есть, они имеют более общий характер, не только приложимый к данной работе, но и вообще ко многим скажем исследованиям. В частности, трансформация скажем антигенов поверхностного белков, вместе с экспрессивной системой в липосомах, адресных липосомах, которые были направлены на антиген презентующей клетки, которые имеют много маннозных рецепторов. И вот этот их эффект – получение нейтрализующих антител для ВИЧ вируса, то, что вообще на порядке увеличивается количество специфических антител, это очень такая важная вещь вообще для иммунологии. Если вы знаете, что и до сих пор практически нейтрализующих антител для ВИЧ-инфекции не получено, это какой-то шаг в этом направлении.

Практическая часть этой работы, она связана вообще-то с разными способами получение антител: и как на базе антител, так и на базе бутирилхолинэстеразы. Здесь тоже получены очень интересные результаты. Это вот очень такая длинная история, и попытки получения рекомбинантной бутирилхолинэстеразы, они насчитывают, наверное, 30 лет. И вообще, что греха таить, даже у меня в лаборатории как-то однажды попытались

получить бутирилхолинэстеразу. Малыми силами, естественно, это привело к не очень хорошим результатам, забросили. Но в мире-то, вообще говоря, это получают. И, так сказать, отсутствие стабильности в рекомбинантных молекулах, которые получают, видимо – это большая проблема.

Здесь было несколько попыток ее решить, на очень хорошем уровне. Сегодня как обычно пролонгируют белковую молекулу? ПЭГилированием. Даже в России выпускается ПЭГ-интерферон и ПЭГ другие всякие вещи. ПЭГилирование имеет ряд недостатков, конечно. Потому что в печени все это застревает, это не метаболизируется. Хотя пролонгирование хорошее по времени.

Была осуществлена реакция химического сиилирования, на очень хорошем уровне, опубликовано это в прекрасном журнале. И нужно сказать, работа доведена до достаточного, доклиника была проведена. Очень серьезная работа, там прекрасные выходы. Но нужно сказать, что, наверное, перспективы все-таки такой клинической особо нет. Это клиническую перспективу подорвал сам автор, потому что он дальше получили тетрамерную бутирилхолинэстеразу, которая, в общем-то, гораздо эффективнее как антидот, чем даже сиилированный продукт.

Но нужно сказать, что получение... Как генный инженер, я просто получаю эстетическое удовольствие, когда смотришь, как была сделана вообще это работа, где были сконструированы векторы, был взят пептид. Все это вообще в СНО клетках было сделано. Красиво вообще все сделано, все как надо: подобраны нуклеотиды, прекрасные выходы. Я считаю, что это большое достижение практическое. Это, наверное, лучший антидот, который сегодня в мире известен. У бутирилхолинэстеразы есть один недостаток, как у антидота, она же должна просто ковалентно, связывает субстрат. Сама она большая, отравляющее вещество молекулы маленькое. И значит, на одну молекулы. И все. То есть практически, для того чтобы она была антидотом, это нужно вкатать несколько грамм очень чистой бутирилхолинэстеразы человеку, тогда это, вообще говоря, хорошая защита.

Вот тут был вопрос, когда. Нужно до того, до отравляющих веществ, потому что оно не лечит, оно просто перехватывает в крови отравляющее вещество, не дает им дойти до нервных тканей. Она просто перехватывает его, а когда уже это, она не реанимирует. Поэтому это очень, конечно, ценная такая работа чисто практическая.

Что я еще хотел бы сказать? Не стоит, наверное, повторять, работа было прекрасно доложена, еще раз прочитано в отзыве, что здесь было сделано. Опубликована она в прекрасных журналах.

Я хвалю, хвалю, но ведь задачи оппонента обязательно найти какие-то недостатки. Я бы сказал, что есть недостатки технического характера, при всем том, что работа прекрасно оформленная, хорошим языком написана, иллюстрирована, таких возражений нет. Но всегда есть какие-то вообще такие. Уже тут говорили, что появляется рисунок 81, когда всего 74 рисунка. Или есть такое выражение, как раз по поводу белка A17, где-то говорится, что недавно был получено вот такое антитело. Недавно был получен ряд антител, включая каталитическое антитело A17, его мутант, даны две ссылки. На 1974, 1994 год, как-то это вроде не совсем недавно. Кстати, ссылка там это не про A17, совсем про другое. Вообще A17 – это антитело, которое получено давно достаточно, где-то в 2011 году, по-моему, получено в совместной работе лаборатории Габибова, иностранных авторов.

Заслугой автора являлось... Конечно, здесь много работы сделано. То, что это было одноцепочечное антитело, полученное фаговым дисплеем. Автор получил полноценный Fab-фрагмент, полноценное антитело, которое сохранило все вещи, закристаллизовало, сделал рентген, структуру, расчеты квантовые, то есть очень много было сделано.

Нужно сказать, что для меня очень большое впечатление и большой интерес вызвало эта методология скрининга, высокой продуктивного скрининга с помощью этих микрокапель, которые микрофлюидным чипом продуцируются. Настолько меня заинтересовало. И, мне кажется, что это вообще прекрасный метод, который открывает очень много возможностей. Мы даже пригласили Ивана Витальевича к нам в институт, 23 мая у нас семинаров был, где он нам все это рассказал, и мы примеряли этот метод на предмет использования его в микробиологии и микротехнологии. Действительно, у нас очень много задач, которые, может быть, с этим методом, можно будет решать. В частности, нас волнует продуктивность всех процессов микробиологических, она находится, клетки находятся в стадии поздней логарифмы, ранний стационар. В это время обычно идет синтез и ферментов, и всего на свете.

Что такое стационар? Там клетки синтезируются и умирают, и та популяция этих клеток, нам бы очень хотелось вообще эту популяцию разобрать по одной клетке и посмотреть, как вообще, из чего она состоит. Этот метод как раз мне кажется, для этого и создан. И много, наверное, других приложений можно сделать.

Поэтому, мне кажется, что работа не только важна тем, что она важные результаты принесла теоретические и практические, но она, как настоящая такая докторская работа, она открывает или там приоткрывает новые возможности, новые пути в новых областях. Поэтому, я считаю, что, конечно, работа выполнена на очень высоком уровне, очень интересная, заслуживает.



Можно зачитать, так не вспомнишь, что диссертация направлена на изменение функциональных свойств биокатализатора, отвечает, как мне сказали, требованиям Положения «О присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства №842. Диссертант Иван Витальевич, конечно, заслуживает присуждения степени доктора химических наук. Спасибо.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо, Владимир Георгиевич. Я честно говоря не понял, есть там какие-то, кроме технических замечаний, по сути дела, на что отвечать соискателю?

**Дебабов Владимир Георгиевич. – д.б.н, официальный оппонент:** Вы знаете, я бы мог еще такую вещь сказать, тут, может быть, общее такое. Мне показалось, что нужно все-таки свои результаты прекрасные, хорошие, поставить в контекст того, что в мире известно. Здесь этого вообще так особенно нету, в явном виде. Но почему? Например, есть антитела 17, но в принципе есть подобные антитела в 2014 году они опубликованы, какие-то свойства у них, наверное, есть вообще, связанные. Сравнить бы хотя бы, что есть. И есть какие-то работы по микрокаплям, другие. Тоже хотелось бы, чтобы здесь сравнили бы то, что вы получили, что другие люди получили. То есть вот это, мне кажется, немножко такое недостаток. Хотя, конечно, при таком огромном материале, как-то трудно требовать, чтобы еще и все это обсуждалось не только свои, а чужие работы. В принципе, конечно, сделано так много и так хорошо, что это бы только выиграло, если бы это было в контексте мировых достижений.

**Ефремов Роман Гербертович:** Еще раз спасибо, но у нас все-таки защита, поэтому соискатель пусть защищается. И ответит на глобальной вызов.

**Смирнов Иван Витальевич:** Спасибо большое за замечания. Наверное, я начну свою защиту с того, что, действительно, антитело, которое мы получили, оно в 170 раз более эффективно взаимодействует с параоксоном. И при этом оно действительно потеряло способность к катализу. Однако данный факт, данного исследования, все-таки было сделано намеренно, потому что в ковалентном катализе, который мы хотели реализовать в этом антителе, существуют две стадии: стадии присоединения и стадии гидролиза. Понятное дело, что по максимуму нужно рассчитывать обе этих, стадий, но на данный момент, стадия дефосфорилирования, она оказалась существенно более сложной для расчетов. И только сейчас у нас есть определенные наметки на то, как это все происходит. И мы это, безусловно, включим и закончим получение каталитических антител, реализующих метод ковалентного катализа полной схемой. Поэтому на первом этапе, который я представил, у нас все-таки была направлена на получение, именно реализации первой стадии – увеличение эффективности первой стадии.

С точки зрения контекста с другими исследователями, действительно, Вы абсолютно правы. Я недостаточное внимания уделил существующим каталитическим антителам. Я внимательно изучил работу Подесты, и там действительно получили антитела, которые обладали ацетилхолинэстеразной активностью. Однако там у них направление было – получение именно антител, которые гидролизуют субстрат ацетилхолинэстеразы. Это ацетилтиохолин, бутирилтиохолин, пропионилтиохолин. И в этой же работе они указали, что данные антитела не ингибируются с фосфорорганическими соединениями, такими как параоксон. В этом случае это действительно надо было указать, что существуют такие подходы и такие антитела, я этого не сделал. Однако представленные в той работе антитела, не гидролизуют, не взаимодействует с параоксоном, а наши – взаимодействует. Но Вы правы, да, для того чтобы потенциальный читатель и потенциальный исследователь, который будет изучать мою работу, имел полное представление, это действительно необходимо делать.

С точки зрения микрофлюидных капель, там действительно такие работы проводятся. И в литературном обзоре существует относительно небольшая глава, которые описывает современные методы, современное состояние дел в текущей области. Однако в обсуждении результатов я их действительно не привел. Буду исправляться, спасибо.

**Ефремов Роман Гербертович:** Владимир Георгиевич, вы удовлетворены ответом Ивана Витальевича?

**Дебабов Владимир Георгиевич. – д.б.н, официальный оппонент:** Абсолютно.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо. Согласно списку, следующий оппонент у нас Пышный Дмитрий Владимирович. Пожалуйста.

**Пышный Дмитрий Владимирович – д.х.н, официальный оппонент:** *(Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается).* Спасибо. В первую очередь, коллеги, я хотел бы поблагодарить этот диссертационный совет за то, что пригласили меня в качестве оппонента этой работы, совершенно фантастической. Я постараюсь формализовать свой отзыв, потому что уже очень много было сказано. Я буду исключать из произносимой части некоторые аспекты, которые уже озвучены. Но вначале постараюсь не согласиться с Владимиром Георгиевичем в пункте того, что работа состоит в основном из 2-х частей. Я явно вижу в этой работе 3 части. И дополнительная часть – это часть, посвященная планированию эксперимента, так сказать, дизайн исследования. Это очень важный пункт здесь. Это прослеживается и в самом тексте диссертации, сначала идет обоснование необходимости проведения тех или иных экспериментов, даются все предпосылки, а потом разворачивается эксперимент, теория, и так далее. Говорить о том, что это работа актуальна никакого смысла не имеет, потому что это так. В

работе реально предлагаются и разрабатываются комплекс технологий, ведущих к созданию методов получения каталитических антител и катализаторов, биокатализаторов, с направленными активностями – абсолютная мечта науки.

В работе рассмотрен невероятно широкий спектр объектов исследования. Это биокатализаторы с эстеразной, протеолитической, ДНК-гидролизующей активностью. Широкий спектр катализаторов, что показывает уникальность разрабатываемых подходов.

Касательно содержания работы, из того, что не произнесено, должен сказать, что работа построена по классическому образцу. Содержит введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты обсуждения, выводы, список литературы, безусловно. Список литературы обзор не очень большой, но абсолютно емкий, дает представление о всех, используемых в работе, или важных для автора для диссертации направлениях. Лаконично показывает различные аспекты, показывая в то же время ту проблематику, которая на данный момент существует. Что очень понятно и приятно затем при чтении результатов и обсуждений, когда демонстрируются те новаторства, которые использует автор.

Материалы и методы тоже не очень большие, примерно 20% от текста диссертации, но, опять же, подробные, лаконично оформленные, дающие всю основную информацию, необходимую для воспроизведения большей части экспериментов. Практически всех. Информация обо всех методах и расчетах есть, но, как уже было отмечено, порой нет некоторых вещей, которые позволили бы в полной мере воспроизвести, прочитав только текст диссертации, воспроизвести часть расчетов. Я думаю, что это и невозможно было бы это сделать.

По направлениям исследований, было очень много сказано. По первому направлению в этом разделе автор представляет результаты по получению каталитических нейтрализующих антител поверхностному гликопротеину человека, белку gp120. Единственное, что я, выходя за рамки протокола, должен сказать, что почему-то эта часть не оказалась включена в выводы. Никаких результатов по этой части не озвучено, но это за рамками протокола. Крайне интересным является подход, применяемый для искусственного созревания антител, основанный на квантово-механических, молекулярных расчетах химических реакций, которые катализируются антителами. Эта технология, как говорилось, она, в общем-то, была применена автором впервые, разработана.

Второй подход, основанный на технологии высокопроизводительного скрининга биокаталитической активности. С моей точки зрения это просто революционный, который позволяет решать очень большой спектр имеющихся задач.

Ну, а третье направление, где я, наверно, менее компетентен, но тем не менее, тоже могу сказать, что те усилия, которые были привлечены автором для создания производных бутирилхолинэстеразы и повышение их фармакокинетических характеристик, те эксперименты, то экспериментальное наполнение этой части, оно просто восхищает.

В то же время, я, опять же, вынужден сказать, что есть некоторые неточности. Мои замечания не несут принципиальный характер, но я вынужден также обратить некое внимание на технические недочеты оформления работы. В литературном обзоре тоже встречаются ссылки на основополагающие работы прошлых лет. В частности, на работе 1974 года Энри и Габибова, тоже 1994 года, которые автор, видимо по ошибке, называет недавними.

На странице 11 отмечено, что в результатах гибридных расчетов некий мутант обладал наибольшей энергией. По-видимому, имелось в виду, что комплекс оптимального мутанта с субстратом имел минимальное значение энергии среди других рассмотренных вариантов.

В тексте диссертации довольно часто встречаются ошибочные символы и ошибки форматирования, что уже тоже отмечалось, не буду детализировать.

На рисунке 8 (стр. 25) не указано наличие положительного заряда на кватернизованных атомах азота.

На странице 38 ошибка опять форматирование чисел, приведшая к тому, что вместо 10 в 6 и 10 в 9 степени атомов, указана 106 и 109, что несколько затрудняет восприятие материала для неспециалистов. На странице 107 ошибочно дана ссылка на рисунок 1, вместо рисунка 25. Про рисунок 71 уже говорили.

На странице 122 нет ссылки на первоисточник формулы, связывающий величины изменения теплоемкости и изменения величин площадей участков белковой молекулы, недоступных растворителю. Непонятно, либо это разработка автора, либо это откуда-то взятая формула.

На рисунке 42 на странице 133, там изображаются величины коэффициентов диффузии, лиганда в активном центре фермента. У меня вопрос возник, в чем причина столь высокого разброса величин ошибки расчетов коэффициентов диффузии параоксона для различных белковых мутантов? И можно ли строить анализ используя значения, рассчитанные со столь низкой достоверностью?

Исходно при прочтении мне спорным представлялся вариант использования словосочетания «профилактика отравлений фосфорорганическими токсинами». Сейчас, в ходе дискуссии, я уже понял, что, наверное, профилактикой трудно назвать, потому что если отравление есть, то это уже не профилактика. В этом контексте.

К типичным недочетам можно отнести использование различных шрифтов, ошибки форматирования, немногочисленные ошибки, опечатки.

На странице 122 изотермическая колориметрия названа изометрической. Это чисто, я понимаю, что это технические ошибки. Неоправданный переход на английскую аббревиатуру, в ряде случаев в контексте фосфорных отравляющих токсинов, перешедшие на покс. Некоторое удивление вызывает негативный эффект химического полисиалирования на фармакокинетические характеристики, в контексте тетрамера бутирилхолинэстеразы.

Проверяли ли стабильность полисиаловых ферментов в составе белкового препарата в биологических жидкостях. Данные рисунка 71а показывает реализацию полисиалирования препарата, но не могут служить доказательством сохранения тетрамерной формы белка, учитывая, что низкая электрофоретическая подвижность свойственна обоим этим препаратам.

В материалах и методах одна из глав, страница 89 называется микрофлюидная платформа для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и антимикробной активности, хотя речи об антимикробной активности в работе я не нашел.

Опять же, что очень важно, официально заявляю, что автореферат диссертации полностью соответствуют содержанию диссертационной работы. Все основные выводы опубликованы в хороших изданиях.

В соответствии, на основании всего анализа представленного материала, могу сказать, что диссертация Смирнова Ивана Витальевича «Направленное изменение функциональных свойств биокатализаторов» полностью соответствует требованиям пунктов 9.14 Положения «О присуждении ученых степеней», а непосредственно диссертант – Смирнов Иван Витальевич достоин присвоения ему искомой ученой степени доктора химических наук по специальности 030106 «Биотехнология, в том числе бионанотехнологии».

В заключение могу сказать, пожелать успехов безусловно автором этой работы. И в общем-то, наверное, можно как бы мечтать о том, что нужно вкладывать деньги не в расчеты биткоинов, а в расчеты построения каких-то кластеров, которые позволили считать что-то нужное людям. Удачи.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо, Дмитрий Владимирович. Иван Витальевич, ответьте, пожалуйста, на замечания оппонента.

**Смирнов Иван Витальевич:** Спасибо большое за такой отзыв. Как я и говорил, действительно, это такой недостаток моей диссертационной работы, в которой часто встречаются как стилистические, орфографические ошибки, ошибки форматирования, ошибки с ссылками. И это действительно не очень хорошо. Но, со временем, я думаю, что в любых других научных работах, буду стараться не допускать таких очевидных ляпов.

С точки зрения вопросов, по поводу, например, высокого разброса величина ошибки при расчете коэффициента диффузии параоксона. Действительно, там существует, в одном из вариантов существует достаточно высокая ошибка. И эти ошибки связаны все-таки с недостаточной статистикой расчетов для получения этого коэффициента диффузии. В данном случае мы использовали этот метод для того, чтобы каким-то образом ранжировать мутанты, чтобы их экспериментально проверить. Мы опирались в первую очередь на значение среднее значение диффузии. Безусловно, обращали внимание на ошибки. Поэтому 4 из 5 выбранных нами, мутантов они и с учетом ошибки попадали в нужную нам группу, а один был выбран нами, у него среднее значение хорошее, но шибко большая, и мы решили, что все-таки мы попробуем его посмотреть. И как показал результат, этот мутант он был неудачным. То есть ошибка, тоже имеет значение, и лишний раз мы в этом убедились.

С точки зрения вопроса по поводу полисиалированной тетрамерной бутирилхолинэстеразы. Действительно, я согласен с Дмитрием Владимировичем. Это проблема, мы не проверяли его стабильность в биологическом кровотоке после введения. Мы анализировали только тотальную каталитическую активность, когда мы подбирали пробы крови. И эта активность, соответственно, снижалась. По этой активности мы судили по введению этого препарата. Это может быть связано как с введением препарата, так и с его деградацией. Поэтому в данном случае, по идее, полисиалирование должно было привести, наоборот, к защите фермента от протеолитической деградации за счет того, что сиаловые кислоты, они большие, это мы использовали 27 килодальтон, длина полисиалированной кислоты. И она, по идее, должна как-то окутать белок, и таким образом препятствовать его протеолитической деградации. С другой стороны, вполне вероятно такая ситуация, что белок тетрамерный, он большой, и какие-то сайты для деградации, они, наоборот, стали более доступными. Это возможно так. Больше с остальными недостатками, которые в формальном характере, я, безусловно, соглашаюсь.

**Ефремов Роман Гербертович:** Дмитрий Владимирович, у вас остались еще вопросы? Спасибо. И, наконец, слово предоставляется официальному оппоненту – Татьяне Викторовне Демкиной.

**Демидкина Татьяна Викторовна – д.х.н, официальный оппонент:** *(Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается).* Глубокоуважаемый Роман Гербертович, глубокоуважаемые члены диссертационного совета и уважаемые, глубокоуважаемые, дорогие коллеги и друзья. Я также, как Дмитрий Владимирович, благодарна за утверждение меня оппонентом на этой диссертации, поскольку читать ее было очень интересно и поучительно для меня, я бы сказала. Конечно, так же, как предыдущие коллеги, я хочу отметить, что невероятно большой объем использованных методов. Практически использованы все самые современные методы физико-химической биологии. Конечно, это очень высокий теоретический уровень Ивана Витальевича.

Хочу сказать, что результаты, которые представлены в диссертации, они свидетельствуют и о очень высоком экспериментальном уровне, наверное, Ивана Витальевича и сотрудников, которые работали вместе с ним. Хотя Иван Витальевич упоминал, я хочу сказать, что сиабиринный препарат бутирилхолинэстеразы был получен с 80% выходом сиабиринирования и с 90% сохранением активности. И при этом, кроме всего прочего, была создана для тетрамерной формы экспрессии система, которая позволяла получать 70 мг на литр целевого белка. В общем-то, практически все результаты, которые приводятся, еще раз повторяюсь, которые приводятся, свидетельствуют об очень высоком уровне, которому я, честно скажу, даже завидовала. Поскольку практически для всех целевых белков, имеются в виду антитела и все остальные белки, выходы составляли в среднем 80%. Но здесь уже говорилось о значении полученных результатов для биотехнологии, поэтому я немножко остановлюсь на том, что ближе мне – на теории реактибоды, которая несомненно вносит существенный вклад в фундаментальную науку. Хочу сказать, что очень важным, конечно, Ивана Витальевич предложил и экспериментально показал правомочность этой теории. И очень важно было то, что для развития этой концепции, что удалось получить пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы антитела A17. И были определены структуры антитела и его комплекс с арилфосфонатом. Структуры были определены с достаточно хорошим разрешением для антитела A17 – 1,5 ангстрема и для комплекса с арилфосфонатом 1,36 ангстрем.

И, в общем, статические данные, которые приводятся для характеризующей структуры, они свидетельствуют о высоком качестве решенных структур. Анализ этих

структур, собственно, и положил основу, для применения метода созревания, искусственного созревания антител.

Я надеюсь, что этот метод можно будет применять. Все-таки не поняла, какова его человеческая и материальная стоимость. Можно будет применять, как Иван Витальевич говорил, для любых химических, энзимологических реакций. И вот как результат применения метода искусственного созревания антител, Иван Витальевич об этом говорил, я хочу еще раз сказать, что была получена мутантная форма, которая обладала каталитической эффективностью в 170 раз выше, чем исходное антитело. И в этом я немножко не согласна с Владимиром Георгиевичем. По-моему, это весьма впечатляющий результат.

С точки зрения создания искусственных биокатализаторов на основе антител очень значимым фактом является то, как Иван Витальевич говорил в докладе, были для антитела и А17, и для мутантного антитела были определенные характеристики, которые характеризуют их как близкие аналоги ферментов. Это глубина активного центра, наличие механизма индуцированного соответствия, которое было показано данными предстационарной кинетики. И даже было показано, что предрасположенность этих биокатализаторов к стереоспецифичности. Для меня, как для человека, который занимается ферментами, это очень впечатляющие результаты, и свидетельствуют о правомочности предложенной концепции. И, конечно, служат стимулом для дальнейшего развития этой концепции.

Я не буду задерживать ваше внимание, но хочу сказать про обзор литературы, который назван Иваном Витальевичем, так же, как и очень многие называют литературный обзор. В нем очень подробно, простым ясным языком рассмотрены свойства имеющихся искусственных биокатализаторов. Я бы очень рекомендовала опубликовать этот обзор, тогда можно будет учесть пожелания Владимира или замечания Владимира Георгиевича о том, что можно будет туда ввести и последние собственные данные. И опубликование этого обзора на русском языке, мне кажется, очень желательно. Я предлагаю в этом обзоре, если Иван Витальевич сочтет нужным, поместить в каком-то одном месте, в начале или во введении, к этому обзору просто схему всех катализируемых искусственным биокатализатором реакций, для наглядности.

В качестве замечаний... Я, наверное, не буду зачитывать замечания, они относятся в основном к оформлению. Конечно, там имеются в оформлении недостатки, но при наличии такой огромной работы, это вполне естественно. И, конечно, никакого принципиального значения не имеют.



Хочу обсудить только вот что. Последнее замечание 7 в официальном отзыве, автор вводит термин «предреакционный комплекс», вместо, по моему мнению, общепринятой и зачитываемой и уместной в данном случае комплекс Михаэлиса, без пояснения. Вот мне бы хотелось, чтобы Иван Витальевич пояснил, имеет ли он какие-то возражения, против того чтобы заменить слово «предреакционный комплекс», можно даже в будущем опубликовать в обзоре, на комплекс Михаэлиса.

В заключении, я могу сказать, что, конечно, диссертация очень высокого уровня, и, несомненно, она заслуживает самой высокой оценки. И Иван Витальевич, конечно, заслуживает присуждения ему ученой степени доктора химических наук. Спасибо.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо, Татьяна Викторовна. Иван Витальевич, пожалуйста, ответьте. Вы, несомненно, видели эти технические замечания.

**Смирнов Иван Витальевич:** Конечно, все технические замечания, которые у меня имеются к моей работе, я с ними согласен. И, безусловно, их буду учитывать при дальнейшем написании научных работ, и возможно обзора, который предложила Татьяна Викторовна. Я по поводу именно термина комплекс Михаэлиса. Это действительно дискуссионный вопрос. Потому что изначально этот термин был придуман, как некое такое математическое описание к гетерогенному катализу. Потому что считали теорию Михаэлиса похожие формулы и все. В нашем случае мы все-таки используем предреакционный комплекс как некую такую структуру внутри активного центра, которая искусственным образом туда помещена и на которую наложены некоторые ограничения.

Я специально изучил достаточно большое количество литературы, где обсуждается использование термина предреакционное состояние или комплекс Михаэлиса, и работы, которые относились к квантово-механическим расчетам. И там, и там, к сожалению, такого единого мнения не существует. Поэтому в некоторых работах достаточно уважаемых людей этот комплекс так и называется, что это комплекс Михаэлиса, который предреакционное состояние, в некоторых случаях этот термин – комплекс Михаэлиса не используют, конкретизируют только на состоянии, именно предреакционном состоянии.

В нашем случае, я считаю, что термин комплекс Михаэлиса и термин предреакционного комплекса – они практически идентичны. Можно использовать и тот, и тот.

**Демидкина Татьяна Викторовна, д.х.н., официальный оппонент:** Я бы уважила Михаэлиса и использовала бы комплекс Михаэлиса.

**Ефремов Роман Гербертович:** Татьяна Викторовна, вы принимаете ответы на ваше замечание?

**Демидкина Татьяна Викторовна, д.х.н., официальный оппонент:** Да, спасибо.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо. Уважаемые коллеги, предлагается начать общую дискуссию по диссертационной работе Ивана Витальевича, Сергей Михайлович, пожалуйста.

**Деев Сергей Михайлович – д.б.н, профессор, чл.-корр. РАН, член совета:** Дорогие коллеги, начну с чувства сожаления, которое я испытал на прошлой неделе на пленуме ВАК. Мы с вами, на позапрошлом заседании ученого совета, дискутировали вопрос, стоит ли нам подавать на право присуждать степени в нашем институте. Я возражал, считал, что это преждевременно Сергей Анатольевич Лукьянов меня поддержал. И вот, к сожалению, сообщаю, что на последнем пленуме ВАК, который был с представителями Президиума ВАК, вместе с сотрудниками Министерства Образования было принято решение, что это преждевременно. И даже у тех 2-х наших ведущих ВУЗов – МГУ и Санкт-петербургский университет пока приостанавливается. Считается, что они не готовы к этой совершенно правильной и благородной инициативе. Второе сожаление я испытал...

**Ефремов Роман Гербертович:** Извините, Сергей Михайлович, что прерываю, а почему к сожалению? Мы вроде бы тогда правильное решение...

**Деев Сергей Михайлович – д.б.н, профессор, член-корр. РАН:** Второе мое сожаление по поводу того, что ВАК дает отход, отзывает свои правильные инициативы. Второе сожаление такого же рода. Есть такой пресловутый список ВАКовских публикаций, которые засчитываются при присуждении кандидатских и докторских степеней. В свое время было у Михаила Петровича Кирпичникова, который член нашего совета, предложение, что все публикации, которые входят в базы, данных засчитывать. Опять пресловутый список ВАК утвержден, и кроме этих введен целый ряд журналов, с которым я лично 5 лет боролся, чтобы исключить целый ряд слабых журналов из публикаций. И вот у меня сожаление, что ВАК дает откат, отход. Большое сожаление. И вот, пользуясь термином сегодняшней диссертации, которую мы сегодня слушали, антидотом для моей такой большой печали и грусти, что ВАК идет на попятную, была сегодняшняя диссертация, которая, на мой взгляд, это какая-то такая очень высокая, очень трудно достижимая планка. Я горд, что я работаю в институте, где защищаются такие диссертации. Я получил не только очень глубокое удовлетворение от научной значимости, но и эстетическое, буддистское где-то наслаждение, впечатление от того, как был блестяще сделан доклад, какие были великолепные ответы на вопросы. Очень высокого уровня работа. Позволила диссертанту, его руководителю привлечь каких суперспециалистов, которые были. У нас сегодня 3 оппонента – это действительно

ведущие специалисты страны. Я бы побоялся рекомендовать кому-то со слабой диссертацией привлекать таких очень принципиальных людей.

Мы сегодня имели блестящий образец защиты. Я думаю, что это нелегко для всех тех докторантов, которые хотят защищаться, достижимая планка, но именно такая планка должна быть в нашем институте. И если мы когда-то, возвращаясь к началу, вернемся к вопросу о праве присуждения степени непосредственно в нашем институте, то давайте считать, что как есть степени, присуждаемые в Оксфорде, в Кембридже, так что давайте высокую планку ставить ИБХ. Блестящая защита, спасибо большое, получил большое удовольствие. Призываю всех активнейшим образом поддерживать данную диссертацию и диссертанта.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо, Сергей Михайлович. Напрашивается вывод, что такие диссертации надо слушать до похода в ВАК, до участия в заседаниях ВАКа. Пожалуйста, кто еще хотел бы высказаться по диссертации? Александр Габибович, да.

**Габибов Александр Габибович – д.х.н, профессор, академик, член совета:** Я хотел бы последний сказать. Я, в отличие от Сергея Михайловича, не могу оценивать работу и призывать даже, потому что я соавтор всех статей, вошедших в эту работу, поэтому я скажу. И вторая, так сказать, ограничительная деталь в моем выступлении, я сам всегда отказываюсь от консультационной помощи в докторских диссертациях. У меня не было консультанта, но Бронштейн уже ушел из жизни тогда. Я считаю, что доктор наук, уже весьма состоятельная единица, я всегда отказываюсь. Это не значит, что другие должны также делать. Я все-таки хочу два слова сказать. Во-первых, я поблагодарю, Ваня поблагодарит всех оппонентов, все-таки мы имели дело с действительно хорошим научным таким заседанием и ответами на вопросы. Вам самим оценивать, как далее это можно квалифицировать с точки зрения докторской диссертации.

Я хочу сказать, что Ваня пришел в нашу лабораторию очень молодым человеком, было, по-моему, 18 лет или на грани 19. Он получил очень хорошее образование и заведующий в те годы кафедрой присутствует здесь – это Алексей Алексеевич Богданов. Он является, в общем-то, учеником кафедры нашей лаборатории. И вот, опять же, не хочу уводить куда-то далеко, от самой сути диссертации. Он часто придумает всякие схемы, интеграции какие-то новые образовательные, хотя у нас очень хорошо все, благодаря Татьяне Владимировне. Но я хочу сказать, было и в старом Советском Союзе все нормально в этом плане. Члены академии часто были и профессора уважаемые, и заведовали кафедрами, и работали на кафедрах. Вся это интеграция была. Ваня является плодом этой собственной системы, кандидатскую диссертацию он выполнял как аспирант

кафедры химии природных соединений. И вот все, что он там приобрел, и уже приобрел в нашем институте, это явилось, мне кажется, плодом тех методических наработок, которые он смог реализовать.

Я все-таки вынужден сказать, здесь, может быть, не очень часто, не очень в явной форме это прозвучало, что сделано нового. Но, опять же, не хочу принизить членов ученого совета, потому что итак всем ясно. Все-таки действительно базовое антитело была получено, оно было уникальным. Сделал его тоже выпускник нашей кафедры химии и природных соединений – Андрей Решетняк, который является теперь research associate, состоит в Йеле. Инна Куркова, которая пришла, в зале, отсутствует на работе, в связи с приятным событием – рождением двух детей. Действительно, это была такая знаковая вещь, когда удалось получить удивительно такое специфическое антитело, с активным центром. Но далее все принадлежит Ване, конечно, с его учениками. Была поставлена задача. Можно сделать что-то лучше, потому что область антител каталитических она в известной степени заингибирована была, говоря химическим языком. И вот сейчас, наверное, мне так кажется, появилась новая возможность, когда квантово-химические расчеты, в этом случае не впервые была получена Нобелевская премия Воршела за квантово-химические расчеты ферментативных реакций. Но для антительных матриц это было сделано впервые. Вот Ваня является, собственно, соавтором, первым автором этой работы. И, наверное, здесь, почему это биотехнология. Все-таки это демонстрация практического результата, что так можно делать. Пока в 170 раз улучшили. Но я думаю, что будут перспективы.

С точки зрения микрофлюидики. Я обосновываю, почему это биотехнологии. Микрофлюидики вместе со своим учеником – Стасиком, которые здесь присутствует, также выпускник нашей кафедрой. Да, микрофлюидные системы имеются, но здесь удалось впервые все-таки добиться инкапсуляции фактически одного клона чего-то. Бактерии, но о бактериях он сегодня не говорил, а именно ферментативного клона, экспрессирующего. Возможно, эукариотических клеток. Эта система имеет серьезные преимущества по сравнению с тем, что было в частности опубликовано Деном Тафиком в 2007 году и нашим также выпускником химического факультета академиком американской Академии Наук – Клебановым. Все-таки, мне кажется, (мне неудобно говорить, я соавтор этой работы) но здесь могут быть большие перспективы. Итак, я скажу, что мне было очень приятно, о сиалировании уже здесь говорилось. Мне очень приятно было работать с Ваней, очень, действительно, талантливый, очень хороший человек, добрый человек, в тоже время достаточно требовательный ко мне и к своим

сотрудникам. Поэтому я желаю ему на научном поприще дальнейших успехов и надеюсь, что мы еще будем сотрудничать. Спасибо.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо, Александр Габибович. Кто-нибудь еще Уважаемые коллеги хотел бы? Лес рук. Пожалуйста, Лев Давыдович.

**Румш Лев Давыдович – д.х.н, профессор, член совета:** Я тоже хотел бы сказать пару слов, хотя после Александра Габибовича и нечего добавить, все сказано. Четко и сжато. Действительно великолепная работа. И великолепно доложено, красиво сделано, красиво представлена. И вот действительно абсолютно новые вещь, где вот Иван первый, это применение квантово-механических расчетов для объяснения получения функционирования каталитических антител. Потому что, наверное, это именно такой подход позволил прийти к успеху. Все очень хорошо, поэтому не могу не поздравить Ивана и Александра Габибовича, который вырастил такого хорошего ученого. Не надо агитировать голосовать за. Наверное, все за.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо, Сергей Кириакович, пожалуйста.

**Завриев Сергей Кириакович, д.б.н., профессор, чл.-корр. РАН, член совета:** Я не буду повторяться, и говорить о том, насколько это большая и хорошая работа, насколько она объемная. Я хотел бы подчеркнуть, что в принципе перспективы практического применения этих результатов как средств борьбы с химическим оружием в частности, а также с биологическим оружием, в том плане того биологического оружие, которое производит токсины, это очень большая перспектива. Я надеюсь, что в этом направлении, Иван будет работать не менее успешно, потому что на самом деле, это очень серьезная и хорошая область практического применения, в перспективе этого направления в целом. Я желаю самых больших успехов и, может быть, какой-то кооперации дальнейшей.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо, еще есть желающие выступить? Тут сказано уже очень много. Тогда мы закрываем дискуссию, теперь нам предстоит выбрать состав счетной комиссии. Поступило такое предложение: Безуглов Владимир Виленович, Деев Сергей Михайлович и Олейников Владимир Александрович. Есть ли отводы, самоотводы? Прошу проголосовать. Кто за, против, воздержался? На этом мы завершаем заседание по первой диссертации. Предлагается, как мы обычно делаем, голосовать сразу за обоих соискателей.

**Смирнов Иван Витальевич:** Вне зависимости от результатов, потому что работа, которая была выполнена, она была выполнена, безусловно, с огромной помощью моих коллег, без участия которых, я бы ничего такого не сделал.

В первую очередь я хочу все-таки поблагодарить своих официальных оппонентов, потому что это действительно очень уважаемые люди, очень большие ученые и их критический взгляд на мою работу для меня действительно принципиально важен. Потому что если такие люди скажут, что работа ни о чем, значит, в принципе, вся сфера моей деятельности, я, видимо не готов. Если такие люди говорят, что работа она хорошая, то это вселяет в меня оптимизм. И для каких-то дальнейших всех действий и в работе в науке. Спасибо вам большое, я очень горд, что вы были моими оппонентами.

Я хочу сказать слова благодарности одному из своих учителей, это Наталье Александровне Пономаренко, которая, к сожалению, не так давно ушла из жизни. Этот человек, он очень много вложил в меня и мне очень печально, что она, к сожалению, не смогла присутствовать на моей защите, потому что она была бы тоже очень, я думаю, рада и удовлетворена продуктом своих рук.

Безусловно, я хочу сказать огромное спасибо Александру Габибовичу. Это для него, наверное, это не секрет, я думаю, для вас тоже, что этот человек, это действительно, учитель с большой буквы. Это человек, который воспитал меня как ученого, я пришел в лабораторию совсем-совсем молодым, и перспективы дальнейшей жизни, они были туманными. С таким научным руководителем, с таким учителем как в науке, так и в каких-то житейских вопросах, в жизни, вот перспективы моего развития они очень и очень радужные.

Я хочу сказать спасибо своим коллегам в лаборатории, которые присутствовали. Со многими из них мы знакомы очень долгие годы. В частности, с Алексеем Белогуровым, с Маратом Авакяном – это люди с которыми мы, можно сказать, начинали нашу научную карьеру. Мне чрезвычайно приятно, что они присутствует здесь. Я благодарен Инне Курковой, которая была тем самым человеком, который участвовал в работе по антителу A17 в первых исследованиях, и в чьем совместном соавторстве у нас опубликована статья в ПНАСе, которая посвящена этому подходу «реактибоди».

Я хочу сказать спасибо своим молодым коллегам, в частности Юлиане Макрушиной, чья работоспособность, собственно, позволила приблизить этот момент защиты, потому что без ее рук, без ее головы с точки зрения науки у меня бы действительно многие процедуры затянулись на долгие годы.

Я благодарен Насте Степановой, к сожалению, она не присутствует, она ухаживать за ребенком. Но ее супруг присутствует здесь. И поэтому я через него передам свою благодарность, потому что этот человек, с которым очень приятно работать, с которым многие вещи, они удавались.

Безусловно, я хочу сказать спасибо Станиславу Терехову – это человек с острым умом, острым языком. И человек, который такой мотор идей. И, собственно, работа, посвященная микрофлюидной компартиментализации, это по большей части его заслуга, потому что он инициировал в нас вот эту идею, зажег нас использовать и создавать такую платформу, которая позволит создавать скрининг любой функциональной активности. Будь то биокаталитическая активность, антимикробная. И, действительно, эта технология, она имеет очень широкие перспективы. И ее бы не было, если бы Стас не участвовал в этой работе.

Я хочу сказать огромное спасибо всем сотрудникам нашей лаборатории, потому что любое развитие какого-то научного труда, какой-то любой научный успех, он невозможен без ежедневных каких-то обсуждений на работе, научных, ненаучных около научных. Потому что, собственно, наша работа — это наша жизнь. Если коллектив хороший, то и жизнь хорошая. И успех, он точно будет.

Я хочу выразить благодарность Ольге Георгиевне Шамборант, потому что это человек, который научил меня работать с клетками. И благодаря ей, нам удалось действительно получить то, что не удавалось получить ни одной лаборатории в мире, а именно добиться, чтобы рекомбинантная бутирилхолинэстераза человека экспрессируется с таким огромным выходом. Спасибо вам большое.

Я также хочу поблагодарить. Тут большой список людей. И все эти люди, они играют огромную роль, огромное участие в моей работе. Я хочу поблагодарить Андрея Головина, я его не вижу, правда. Вот он. Это человек, благодаря которому, нам действительно удалось обычные компьютерные расчеты превратить в действительно работающие, действующие технологии, которые позволяют решать серьезные задачи в области биокатализа. И более того, мне очень приятно, что наше сотрудничество завязалась на этой работе, и оно продолжается. Хочется верить, что оно будет продолжаться и только расширяться. Спасибо большое.

Я хочу поблагодарить наших коллег из ФИБХа. Все эксперименты на животных, которые мы проводили, они проводились именно там. И эти люди, которые это делали, они действительно сделали очень много. И результатам, которые были получены там, можно верить. И это наши результаты.

Я хочу сказать спасибо сотрудникам из Центра нанотехнологий Санкт-Петербурга, которые помогли нам в организации. Если идея микрофлюидной платформы была выкристаллизована нами с участием Стаса, то некоторые практические элементы реализации ее были бы невозможны без их участия.

Огромное спасибо нашим иностранным коллегам, в частности Джордж Майклу Блекберну, Ричарду Лернеру, Сидни Альтману – это те люди, рядом с которыми публикация и какое-то обсуждение научных работ превращается в какой-то такой масштабный, очень интригующий процесс. И сразу видно, что это ученые такого мирового уровня. Не создается впечатление, а так и есть, что мы находимся на таком же высоком научном уровне, это приятно осознавать.

Спасибо всем, кто пришел сюда, кто присутствовал, слушала меня, и, надеюсь, что мой доклад вам понравился, и я вас не утомил. Спасибо вам большое.

**Ефремов Роман Гербертович:** Спасибо, Иван Витальевич. Есть предложение обсудить проект заключение по диссертации Смирнова Ивана Витальевича.  
(Проходит обсуждение проекта заключения)

**Ефремов Роман Гербертович:**

Уважаемые коллеги, объявляется перерыв на голосование.

(Проводится тайное голосование).

**Олейников Владимир Александрович:** (объявляет результаты работы счетной комиссии)

Защищал докторскую диссертацию Смирнов Иван Витальевич, соответственно, результаты работы счетной комиссии. Присутствовало на заседании членов совета 22. Роздано бюллетеней 22, оказалось в урне бюллетеней 22, «за» - 22, «против» - нет, «недействительных» – нет.

(Проходит голосование. Результаты работы счетной комиссии утверждены единогласно)

**Ефремов Роман Гербертович:**

Предлагается принять проект заключения с небольшими техническими поправками, которые в рабочем порядке соискатель внесет. Кто за то, чтобы принять это заключение? Против? Воздержались?

(Проходит голосование по проекту заключения совета. Заключение совета принято единогласно.)

Заместитель председателя  
диссертационного совета  
доктор физико-математических наук, профессор

Учёный секретарь  
диссертационного совета  
доктор физико-математических наук

Ефремов Р.Г.

Олейников В.А.

