О Т З Ы В

официального оппонента 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)

Представленная к защите работа Смирнова И.В. поражает воображение объёмом и качеством проделанной работы, обилием использованных методов и подходов. На самом деле представленный в диссертации материал даже шире общего заглавия диссертации «Направленное изменение функциональных свойств биокатализаторов», так как в работе представлен и подход, связанный с селекцией, т.е. отбором мутантных форм и методы генетической трансформации.

Весь представленный материал можно отнести к двум направлениям: теоретическому, заключающемуся в разработке методологии получения и рационального дизайна каталитических антител (абзимов) и практическому – разнообразным попыткам получения антидота против фосфорорганических токсинов (отравляющих веществ и гербицидов). И в том и в другом направлениях получены новые и интересные результаты.

Исследование каталитических антител – это традиционное направление работ лаборатории Александра Габибовича Габибова.

В работе Смирнова И.В. предложено и опробовано несколько оригинальных подходов к совершенствованию методологии получения каталитических антител. Некоторые из них имеют отношение просто к более эффективной индукции любых антител. Эффективным оказался подход использования для иммунизации маннозилированных липосом адресно доставляющих антиген в дендритные клетки (АПК). Иммунизация мышей такими липосомами, содержащими химерный белок gp13 и ДНК-конструкцию, обеспечивающую экспрессию этого гена, привела к получению нейтрализующих вирус антител. Получение нейтрализующих вирус ВИЧ-антител с лечебным или профилактическим эффектом до сих пор не решенная задача и результаты данной работы — это шаг в этом направлении.

В диссертации также описано получение абзимов с протеолитической активностью с определенной специфичностью к белку gp120 вируса ВИЧ. Однако активности были не высоки, специфичность тоже (разница гидролиза BSA всего в 5 раз ниже, чем gp120).

Основная часть работы посвящена получению антител, связывающих и гидролизующих фосфорорганические токсины (ФОТ) и получению рекомбинантной бутирилхолинэстеразы с теми же активностями.

Ни в реферате, ни в диссертации не описано в деталях получение одноцепочечных антител, способных ковалентно взаимодействовать с арилфосфонатом и, в частности, антитела А17 с которым в дальнейшем, и работал автор. Это антитело было описано в 2007 г. в совместной работе лаб. Габибова А.Г. с иностранными соавторами (J. Am. Chem. Soe). Однако в диссертации эта работа упоминается лишь в обзоре и в связи с использованием фосфонатов как молекул, имитирующих тетраэдрический углерод в переходном комплексе ферментативных реакций.

Заслугой автора является получение полноразмерных антител Fab фрагментов А17, сохранивших специфичность и каталитическую активность. Рентгеноструктурный анализ Fab фрагмента А17 и Fab фрагмента в комплексе с арилфосфонатом показал сходство активного центра с активным центром фермента холинэстеразы.

Далее автор очень эффектно провел расчеты структуры вариантов комплекса антитело А17-параоксон с целью выявления расчетным путем аминокислотных замен в активном центре, усиливающих связывание ФОТ и каталитическую активность.

Я не специалист в области квантовой механики и молекулярной динамики. Нужно думать, что эти расчеты проведены на хорошем уровне, так как опубликованы в достойном журнале. Это новый подход, который в принципе позволяет применить рациональный дизайн к «созреванию антител» и к улучшению каталитических свойств ферментов. Однако конкретные результаты не впечатляют. Действительно получен вариант L-S35H, который лучше связывает параоксон (в 170 раз), но улучшить каталитические свойства не удалось.

Большой заслугой диссертанта является разработка платформы массового скрининга в микрокаплях двойной эмульсии вода/масло/вода. С помощью этого метода удалось за один раунд селекции получить мутанты бутирилхолинэстеразы с каталитической активностью к параоксону (ФОТ). Такого результата не удалось добиться за многие годы методом рационального дизайна. Очевидно, что разработанная методика может иметь широкое применение в различных областях прикладной и фундаментальной науки. Метод дает возможность перейти к изучению биологии отдельной клетки. 23 мая 2017 г. Иван Витальевич Смирнов провел семинар в ГосНИИгенетике, где подробно рассмотрел возможности разработанной платформы, и мы обсудили её применимость для исследований в области микробиологии. Мечтой исследователей является анализ

генетически однородных популяций микроорганизмов на уровне отдельных клеток. Практическое применение таких знаний может существенно улучшить микробиологические производства.

Наиболее значимые с практической точки зрения результаты получены автором при работе с рекомбинантной бутирилхолинэстеразой. Было известно, что рекомбинантная бутирилхолинэстераза синтезируется в животных клетках (CHO) преимущественно в виде мономера, тогда как в кровотоке человека – это тетрамер. Мономерная форма связывается с фосфорорганическими токсинами, но быстро выводится из организма.

Одно из направлений, разработанных автором – это химическое полисиалирование рекомбинантной бутирилхолинэстеразы. Разработанная технология может быть применена и к другим белкам, используемым в терапевтических целях. Этот подход имеет явное преимущество перед широко используемым пегелированием. Автором показано, что сиалирование пролонгирует пребывание препарата в крови и является безвредным для организма. Проведены доклинические испытания. Однако перспектива практического применения сиалированного белка невелика и, прежде всего, в силу того, что автор получил более перспективный препарат тетрамерную рекомбинантную бутирилхолинэстеразу.

Автором проделана огромная и виртуозная работа по созданию конструкций, обеспечивающих высокий выход бутирилхолинэстеразы в тетрамерной форме. Тетрамеризация достигается совместным клонированием пептида, обогащенного пролином. Достигнуты высокие показатели продуктивности тетрамерной бутирилхолинэстеразы в клетках CHO. Это белок обладает способностью прочно связывать фосфорорганические токсины и длительное время пребывать в организме (в 2 раза дольше сиалированного препарата). Неожиданно оказалось, что сиалирование тетрамерной формы не увеличивает время пребывания в организме. Возможно это лучший антидот, полученный на основе бутирилхолинэстеразы.

К общим недостаткам работы можно отнести отсутствие обсуждения автором известных в литературе альтернативных решений рассматриваемых в диссертации проблем.

В качестве примера можно привести результаты получения сиалированной бутирилхолинэстеразы. Автор обсуждает преимущества сиалирования по сравнению с пегелированием, но не обсуждает фьюз с сывороточным альбумином, хотя такой подход

довольно широко известен. Время пребывания такого фьюза в организме сравнимо со временем пребывания сиалированной бутирилхолинэстеразы.

Хотелось бы увидеть сравнение каталитических свойств моноклонального антитела А17 с описанными в литературе другими антителами (A. Podestra et al. m Abs, 2014, 6:1084-1099).

Работа написана хорошим языком, прекрасно проиллюстрирована, но, тем не менее, содержит незначительные погрешности технического характера. На стр. 11 фермент аденозиндеаминаза отнесен к пептидазам; на стр. 15 и 47 10 строчек текста являются дословным повтором с одним различием. На стр. 15 дана ссылка [24], а на стр. 47 ссылка [53]. Причем на стр. 15 ссылка верная, а стр. 47 нет. На стр. 47 написано «недавно был получен ряд антител, включая каталитическое антитело А17 и его мутантов, и даны ссылки 57 и 58, но эти ссылки на публикации 1974 и 1994 гг., т.е. это явно не недавно и это не антителе А17. На стр. 147 указано «микрокапли размером 15-40 мкм». Следовало бы добавить диаметром или радиусом. Возможно, их лучше характеризовать объемом, как и делают в ряде работ, так как именно с объемом легче оперировать при указании концентраций и т.д. На стр. 176 дана ссылка на рис. 81Б, хотя в диссертации всего 74 рисунка. Это на самом деле рис. 70Б. В тексте есть жаргонные выражения «усы» и «медийные значения», лучше бы сказать средние значения и максимальные. Эти замечания не носят принципиального характера и не снижают общего впечатления от работы выполненной на высочайшем, методологическом и научном уровне.

Работа Смирнова И.В. не только содержит ценные научные и практические результаты, но и открывает (или приоткрывает) возможность развития новых направлений науки, таких как биология единичной клетки, новые подходы к рациональному дизайну белков, получение антидотов с каталитической активностью.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация полностью отражена 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).

Официальный оппонент:

Академик РАН,
доктор биологических наук,
научный руководитель ГНЦ РФ ФГБУ
«Государственный научно-исследовательский
институт генетики и селекции
промышленных микроорганизмов»
(ГНЦ РФ ФГБУ «ГосНИИгенетика») Дебабов Владимир Георгиевич

Контактная информация:
Адрес: 117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, дом 1
Телефон:8-495-315-37-47
E-mail:debabov@genetika.ru

Подпись Дебабова Владимира Георгиевича заверяю

Ученый секретарь ФГБУ «ГосНИИгенетика»
к.х.н., доцент Воюшина Т.Л.

ВТ