

## 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. посвящена созданию и исследованию искусственных биокатализаторов *de novo*, а также разработке способов направленной модификации биокатализаторов для обеспечения заранее заданных свойств, специфичности и каталитической активности. Автор провел целый комплекс исследований, который решает фундаментальные задачи современной энзимологии и молекулярной биологии. Результаты имеют очевидное практическое применение. Разработанные автором новые подходы конструирования биокатализаторов позволяют вплотную подойти к проблеме получения терапевтических препаратов пролонгированного действия с заранее заданными параметрами каталитической функции, а также «каталитических вакцин» на основе антител.

Основные направления исследований, представленные Смирновым И.В. включают в себя исследование биокатализаторов с эстеразной, протеолитической, ДНК-гидролизующей активностями; направленной индукции и изучение каталитической активности биокатализаторов на основе антител; проведение направленной эволюции каталитической активности существующих ферментов и получение новых биокатализаторов, способных к нейтрализации и гидролизу токсичных веществ; создание биокатализаторов терапевтического назначения с улучшением их фармакокинетических параметров, в частности бутирилхолинэстеразы – биологического антидота при отравлениях фосфорорганическими токсинами.

Работа изложена на 200 страницах и содержит 74 рисунка и 21 таблицу. Она построена по классическому принципу и включает в себя разделы «Введение», «Литературный обзор», «Материалы и методы», «Результатов и обсуждение»,

«Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Литературный обзор занимает чуть более 20% от общего объема диссертации и включает в себя обзор современных методов индукции и направленного изменения каталитической активности ферментов и антител. Достаточно подробно описаны способы получения каталитических антител, что очень полезно для корректного понимания и интерпретации результатов, полученных автором в процессе работы. Отдельно рассмотрены методы комбинаторного поиска биокатализаторов, методы экспериментального и компьютерного рационального дизайна их структуры и свойств. Автор уделил особое внимание проблеме отравлений фосфорорганическими соединениями, описанию современных методов терапии, в том числе с использованием антидотов биологического происхождения. Один из которых, бутирилхолинэстераза, является объектом исследований. В целом обзор современной литературы демонстрирует уровень сложности материала, с которым столкнулся автор. Количество ссылок 239, большая часть относится к работам последнего десятилетия. Раздел «Материалы и Методы» составляет около 20% от общего объема диссертации и описывает как стандартные процедуры, использованные при проведении исследований, так и совершенно новые, в частности работу с микрофлюидной системой для высокопроизводительного скрининга биокаталитической активности. Описание использованных методов и подходов дано достаточно подробно, что позволяет оценить качество экспериментальных и расчетных данных и обеспечивает возможность воспроизведения отдельных этапов работы. Раздел «Результаты и обсуждение» занимает основную долю в общем объеме диссертации. Исследования Смирнова И.В. можно разделить на три направления, которые логично связаны друг с другом.

Первое направление посвящено разработке технологий получения биокатализаторов на основе антител. В данном разделе автор представляет результаты по получению каталитических и нейтрализующих антител к поверхностному гликопротеину человека белку gp120. Особый интерес представляет собой разработка способа

иммунизации мышей комбинированным ДНК-белковым препаратом на основе липосом, которые способны к таргетной доставке антигенов в иммунные клетки человека. Важность данного результата подтверждается началом клинических испытаний полученного липосомального препарата для терапии ВИЧ-заболеваний.

Еще одним важным результатом первого направления исследований является усовершенствование метода индукции каталитических антител, которые действуют по механизму ковалентного катализа. В результате работы было получено антитело, способное гидролизовать пестицид параоксон.

Крайне интересным является подход, примененный для искусственного «созревания» антител, основанный на квантово-механических/молекулярно-механических расчетах химических реакций, которые катализируются антителами. С использованием разработанного алгоритма автору удалось более чем на два порядка увеличить эффективность взаимодействия с параоксоном упомянутого выше параоксон-гидролизующего антитела. Эта технология, примененная к антителам, была реализована впервые в мире.

Второе направление работы нацелено на разработку технологии высокопроизводительного скрининга биокаталитической активности. Эта технология поистине революционна. С использованием оригинальных микрофлюидных чипов и широко распространенных систем клеточного сортирования автор создал изящную систему, с помощью которой получил фермент бутирилхолинэстеразу, способную каталитически гидролизовать фосфорорганические токсины, в частности параоксон. Иными словами, создал биокатализатор с новой, не свойственной ему активностью.

Третье направление исследований решает проблему создания препаратов пролонгированного действия. Автор предлагает два взаимодополняющих пути улучшения фармакокинетических характеристик препарата бутирилхолинэстеразы. Согласно литературным данным, представленным в литературном обзоре, БУХЭ является одним из

перспективных биологических антидотов против отравления широким спектром фосфорорганических токсинов. Автору удалось получить варианты рекомбинантного фермента, которые обладали сравнимыми или лучшими, по сравнению с природным ферментом, фармакокинетическими показателями и были способны защищать организм модельного животного от токсичного действия ФОТ, таких как боевое отравляющее вещество VR и пестицид параоксон.

Работа выполнена на очень высоком экспериментальном уровне. Принципиальных замечаний по представленной работе нет. Однако можно выделить ряд замечаний и недостатков:

В литературном обзоре встречаются ссылки на основополагающие работы прошлых лет. В частности, на работы Н. Эрни 1974 года и А.Г. Габибова 1994 года, которые автор, видимо по ошибке, называет недавними.

На стр. 11 ошибочно отмечено, что подобранный в результате гибридных расчетов мутант фермента 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 в написаниях названий химических соединений и химических процессов, например, ошибки в обозначении: производного капроновой кислоты (в начале стр. 16); энантиомера лактона (в начале стр. 17); реакции ®-элиминирования (стр. 20 и стр. 26) и др.

На рисунке 8 (стр. 25) не указано наличие положительного заряда на кватернизованных атомах азота. На странице 38 ошибка в форматировании чисел, представляющих количество атомов в системе. Вместо  $10^6$ - $10^9$  атомов указано 106-109.

На стр. 107 ошибочно дана ссылка на рисунок 1, вместо рисунка 25. Аналогично, рисунок 71 Б при описании в тексте ошибочно назван рисунком 82 Б (стр. 178).

На стр. 122 нет ссылки на первоисточник формулы, связывающей величин изменения теплоемкости ( $\Delta C_p$ ) и изменения величин площадей участков белковой молекулы недоступных растворителю.

Вопрос по рисунку 42. на стр. 135. В чем причина столь высокого разброса величин ошибки расчета коэффициентов диффузии параоксона для различных белковых мутантов и можно ли строить анализ, используя значения, рассчитанные со столь низкой достоверностью (например, как в случаях мутантов Н-Р98R, Н-А107К или Н-S35К)?

Спорным представляется использование словосочетания «профилактика отравлений ФОТ» (стр.48 и далее) в контексте каталитического удаления отравляющего вещества, находящегося в организме. С профилактической же точки зрения целесообразно не допускать контакт с токсичным химическим агентом.

К типичным недочетам в оформлении работы стоит отнести и использование различных шрифтов (ошибка форматирования, например, на стр. 51, 75, 81 и далее часто по тексту); немногочисленные опечатки, например, стр. 122 - изотермическая калориметрия названа изометрической; неоправданный переход на англоязычную аббревиатуру (РОХ вместо ФОТ на стр. 185 и 186).

Некоторое удивление вызывает негативный эффект химического полисиалирования на фармакокинетические характеристики 4pчБуХЭ. Проверили ли стабильность полисиаловых фрагментов в составе белкового препарата в биологических жидкостях? Данные рисунка 71А показывают реализацию полисиалирования препарата, но не могут служить доказательством сохранения тетрамерной формы белка, учитывая, что низкая электрофоретическая подвижность соответствующего препарата в представленных условиях сопоставима с таковой для мономерной формы pчБуХЭ-ПСА (рисунка 71А, дорожка 2).

В материалах и методах одна из глав (стр. 89) называется «микрофлюидная платформа для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и

антимикробной активности». Название выглядит несколько неудачным, так как в самом разделе автор описывает только отбор биокатализаторов. С другой стороны, в заключении автор упоминает, что данная платформа является универсальной и может быть адаптирована для поиска других типов функциональной активности, например, антимикробной активности.

В автореферате диссертации полностью отсутствуют ссылки, даже в упрощенном виде, на литературные источники, материалы из которых были использованы автором при постановках задач или реализации исследований.

Указанные замечания не снижают крайне хорошего впечатления о представленной работе. Поражает число методов и подходов, привлеченных автором для выполнения данного комплексного междисциплинарного исследования. В работе решена важная научная задача по разработке технологии направленного изменения активности биокатализаторов на основе антител с использованием квантово-механических расчетов реакций и высокопроизводительных систем биомолекулярного отбора на микрофлюидной платформе.

Полученные Смирновым Иваном Витальевичем результаты не вызывают сомнений, представленные в работе выводы являются обоснованными.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация полностью отражена в научных статьях, опубликованных автором в ведущих российских и зарубежных журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Минобрнауки РФ для опубликования основных результатов диссертаций, результаты работы доложены на отечественных и международных конференциях.

Диссертация Смирнова И.В. «Направленное изменение функциональных свойств биокатализаторов» полностью соответствует требованиям пп. 9-14 «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 Смирнов Иван Витальевич заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

9 июня 2017 года.

Официальный оппонент:

Директор  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения  
Российской академии наук  
чл.-корр. РАН, д.х.н.

630090, Россия, г. Новосибирск,  
пр. Ак. Лаврентьева, 8  
Тел. (383) 363-51-51  
E-mail: pyshnyi@niboch.nsc.ru



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской академии наук  
Подпись Д.В. Пышного  
Заведующий  
Ученый секретарь  Д.В. Пышного