

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01

на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по диссертации на соискание ученой степени доктора наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 28 июня 2017 года № 15

О присуждении **Смирнову Ивану Витальевичу**, гражданину Российской Федерации, ученой степени доктора химических наук.

Диссертация «Направленное изменение функциональных свойств биокатализаторов» по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) принята к защите 27 марта 2017 г., протокол №9 диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, Российская Федерация, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г.

Соискатель Смирнов Иван Витальевич, 1982 г. рождения. Диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук «Структурно-функциональное исследование искусственного биокатализатора, полученного на основе антиидиотипического антитела» защитил в 2008 году в диссертационном совете Д 501.001.41 по химическим наукам при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (диплом кандидата наук: серия ДКН № 065146). Работает старшим научным сотрудником, руководителем группы комбинаторных методов конструирования биокатализаторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Диссертация выполнена в лаборатории биокатализа и группе комбинаторных методов конструирования биокатализаторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Дебабов Владимир Георгиевич, академик РАН, профессор, доктор биологических наук, научный руководитель ФГБУ "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов";

Пышный Дмитрий Владимирович, член корреспондент РАН, профессор, доктор химических наук, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения

Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН);

Демидкина Татьяна Викторовна, профессор, доктор химических наук, и.о. заведующего Лабораторией химических основ биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН),

дали положительные отзывы на диссертацию

Ведущая организация Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва, в своем положительном заключении, составленном Савицким Александром Павловичем, доктором биологических наук, профессором, заведующим лабораторией физической биохимии и утвержденном директором, чл.-корр. РАН, профессором Поповым Владимиром Олеговичем, указала, что по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне диссертация Смирнова Ивана Витальевича полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями постановления Правительства РФ от 24.04.16 №335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), а ее автор, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Соискатель имеет 34 опубликованные работы по теме диссертации, из них 21 научная работа общим объемом 22 п.л. опубликована в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертаций, имеется три патента. Результаты работы отражены в материалах 11 всероссийских и международных конференций и симпозиумов. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации, в которые автор внес основной либо существенный вклад:

1. **Smirnov IV**, Vorobiev II, Belogurov AA, Genkin DD, Deyev SM, Gabibov AG. Chemical Polysialylation of Recombinant Human Proteins. *Methods Mol Biol.* 2015;1321:389-404.

2. **Smirnov I**, Belogurov A Jr, Friboulet A, Masson P, Gabibov A, Renard PY. Strategies for the selection of catalytic antibodies against organophosphorus nerve agents. *Chem Biol Interact.* 2013 Mar 25;203(1):196-201. doi: 10.1016/j.cbi.2012.10.011. Epub 2012 Nov 2. Review.

3. **Smirnov IV**, Golovin AV, Chatziefthimiou SD, Stepanova AV, Peng Y, Zolotareva OI, Belogurov AA Jr, Kurkova IN, Ponomarenko NA, Wilmanns M, Blackburn GM, Gabibov AG, Lerner RA. Robotic QM/MM-driven maturation of antibody combining sites. *Sci Adv.* 2016 Oct 19;2(10):e1501695.

4. Stanislav S Terekhov, **Ivan V Smirnov***, Anastasiya V Stepanova, Tatiana V Bobik, Yuliana A Mokrushina, Natalia A Ponomarenko, Alexey A Belogurov, Maria P Rubtsova, Olga V Kartseva, Marina O Gomzikova, Alexey A Moskovtsev, Anton S Bukatin, Michael V Dubina, Elena S Kostryukova, Vladislav V Babenko, Maria T Vakhitova, Alexander I Manolov, Maja V Malakhova, Maria A Kornienko, Alexander V Tyakht, Anna A Vanyushkina, Elena N Ilina, Patrick Masson, Alexander G Gabibov and Sidney Altman. A microfluidic droplet platform for ultrahigh-

throughput single-cell screening of biodiversity. Proc Natl Acad Sci USA. 2017 Mar 7;114(10):2550-2555

5. Ilyushin DG, **Smirnov IV***, Belogurov AA Jr, Dyachenko IA, Zharmukhamedova TI, Novozhilova TI, Bychikhin EA, Serebryakova MV, Kharybin ON, Murashev AN, Anikienko KA, Nikolaev EN, Ponomarenko NA, Genkin DD, Blackburn GM, Masson P, Gabibov AG. Chemical polysialylation of human recombinant butyrylcholinesterase delivers a long-acting bioscavenger for nerve agents in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Jan 22;110(4):1243-8. doi: 10.1073/pnas.1211118110. Epub 2013 Jan 7.

6. **Smirnov I**, Carletti E, Kurkova I, Nachon F, Nicolet Y, Mitkevich VA, Débat H, Avelle B, Belogurov AA Jr, Kuznetsov N, Reshetnyak A, Masson P, Tonevitsky AG, Ponomarenko N, Makarov AA, Friboulet A, Tramontano A, Gabibov A. Reactibodies generated by kinetic selection couple chemical reactivity with favorable protein dynamics. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Sep 20;108(38):15954-9. doi:10.1073/pnas.1108460108. Epub 2011 Sep 6.

7. Terekhov S, **Smirnov I***, Bobik T, Shamborant O, Zenkova M, Chernolovskaya E, Gladkikh D, Murashev A, Dyachenko I, Palikov V, Palikova Y, Knorre V, Belogurov A Jr, Ponomarenko N, Blackburn GM, Masson P, Gabibov A. A novel expression cassette delivers efficient production of exclusively tetrameric human butyrylcholinesterase with improved pharmacokinetics for protection against organophosphate poisoning. *Biochimie*. 2015 Aug 1. pii: S0300-9084(15)00246-1. doi: 10.1016/j.biochi.2015.07.028.

8. Durova OM, Vorobiev II, **Smirnov IV**, Reshetnyak AV, Telegin GB, Shamborant OG, Orlova NA, Genkin DD, Bacon A, Ponomarenko NA, Friboulet A, Gabibov AG. Strategies for induction of catalytic antibodies toward HIV-1 glycoprotein gp120 in autoimmune prone mice. *Mol Immunol*. 2009 Nov;47(1):87-95. doi:10.1016/j.molimm.2008.12.020. Epub 2009 Feb 6.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента Дебабова В.Г., отзыв положительный, содержит следующие замечания:

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.

Работа написана хорошим языком, прекрасно проиллюстрирована, но, тем не менее, содержит незначительные погрешности технического характера. 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. Эти замечания не носят принципиального характера и не снижают общего впечатления от работы выполненной на высочайшем, методологическом и научном уровне.

2. Отзыв официального оппонента Пышного Д.В., отзыв положительный, содержит следующие замечания:

На стр. 11 ошибочно отмечено, что подобранный в результате гибридных расчетов мутант фермента обладал «наибольшей энергией». По-видимому, имелось ввиду, 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.

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-S35K)?

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. Проверяли ли стабильность полисиаловых фрагментов в составе белкового препарата в биологических жидкостях?

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.

3. Отзыв официального оппонента Демидкиной Т.В., отзыв положительный, содержит следующие замечания:

раздел «Литературный обзор» следует называть «Обзор литературы»; в «Оглавлении» (стр. 2) имеются ошибки в нумерации страниц разделов; повсеместно, вместо греческих букв (стр. 20, 26, 117 и другие), использован значок R в круге; вместо «p-нитрофениловый эфир» везде имеется «n-нирофениловый эфир»; следует писать «арилфосфонат», т.е. слитно, не «арил-фосфонат»; на стр. 115 названия ферментов не соответствуют правилам номенклатуры ферментов; автор вводит термин «предреакционный комплекс» вместо, по моему мнению, общепринятого и уместного в данном случае «комплекс Михаэлиса» без пояснения.

4. Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

Работа изобилует орфографическими ошибками и стилистическими неточностями.

Большинство рисунков выполнены на высоком уровне, однако рис. 45, описывающий масс-спектрометрическое исследование имеет плохое качество рисунка.

В разделе «Материалы и методы» автор не приводит условия кристаллизации и РСА с исходным антителом А17.

В диссертации недостаточно подробно приведены методы и параметры, используемые в расчетных методах, в частности учитывали ли молекулярную динамику на стадии проведения докинга?

Одним из значимых результатов является доказательство механизма индуцированного соответствия, однако и приведённых данных неочевидно на основании чего автор делает такое заключение.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их достижениями в областях науки, соответствующих теме представленной диссертации. Это подтверждается наличием у них значительного количества публикаций в ведущих российских и международных научных журналах, и изданиях. Стоит отметить, что сотрудниками ФИЦ Биотехнологии РАН ведутся работы по QM/MM расчетам ферментативных каталитических реакций. Научные интересы Дебабова В.Г. и сотрудников руководимого им института связаны с изучением биокаталитических процессов в области биотехнологии. Пышный Д.В. известен своими фундаментальными и прикладными работами по физико-химическому исследованию ферментов. Демидкина Т.В. является одним из ведущих специалистов в области энзимологии и структурных исследований ферментов. Наличие солидного опыта и высокой квалификации в приведенных выше областях позволяет им объективно судить о научной новизне, а также теоретической и практической значимости диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований соискателю удалось совершить ряд открытий в биотехнологии:

Была усовершенствована технология получения биокатализаторов на основе антител. Предложенный в диссертационной работе метод получения «реактибоди» позволяет создавать эволюционно более совершенные биокатализаторы на основе антител, реализующие механизм «ковалентного» катализа. Разработана и представлена новая, не имеющая аналогов в мире, технология направленного изменения активности биокатализаторов на основе антител с использованием квантово-механических расчетов. Создана платформа для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической активности в каплях двойной микрофлюидной эмульсии. С использованием разработанной платформы были найдены новые каталитические антидоты на основе рЧБуХЭ, способные к самореактивации при ингибировании пестицидом параоксон. Представлены два независимых подхода к созданию препаратов пролонгированного действия на основе биокатализаторов.

Диссертация Смирнова И.В. является важным научным исследованием и вносит существенный вклад в развитие технологий направленного изменения свойств

биокатализаторов. Результаты диссертации могут быть использованы для проведения фундаментальных исследований биокаталитических процессов, получения новых биокатализаторов на основе антител. Разработанный в ходе выполнения диссертационной работы метод *in silico* созревания антител является универсальным. Представленная в работе технология высокопроизводительного скрининга биокаталитической активности может быть использована для поиска и новых ферментов без ограничения на механизм каталитической реакции. Метод является универсальным и может быть адаптирован для поиска других типов функциональной активности, например, антимикробной активности. Предложенный метод комбинаторного поиска условий химической модификации биокатализаторов может быть использован для получения терапевтических препаратов пролонгированного действия на основе ферментов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что работы выполнены на высоком экспериментальном уровне, результаты воспроизводимы в различных условиях, а методы исследования, предложенные и разработанные соискателем, прошли независимую экспериментальную проверку в лабораториях по всему миру и используются повсеместно.

Личный вклад соискателя состоит в том, что он принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов. Весь экспериментальный материал получен лично автором и руководимыми им аспирантами и студентами, за исключением экспериментов по технической реализации компьютерных расчетов, которые были выполнены совместно с сотрудником Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова А.В. Головиным. Анализ полученных данных проведен лично соискателем, кроме того, подготовка основных публикаций по диссертационной работе выполнена лично или при активном участии автора.

На заседании 28 июня 2017 г. диссертационный совет принял решение присудить Смирнову Ивану Витальевичу ученую степень доктора химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 22 человек, из них 8 докторов наук (по специальности диссертации 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за присуждение учёной степени - 22, против присуждения учёной степени - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Заместитель председателя
диссертационного совета
доктор физ.-мат.наук

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор физ.-мат.наук



Ефремов Роман Гербертович

Олейников Владимир Александрович