

ОТЗЫВ
официального оппонента
о диссертации **Ивана Витальевича Смирнова**
«Направленное изменение функциональных свойств биокатализаторов»,
представленной на соискание ученой степени доктора химических наук
по специальности «03.01.06 – биотехнология»

Диссертационная работа И.В. Смирнова, несомненно, вносит существенный вклад в одну из очень актуальных проблем биотехнологии – в разработку новых принципов создания биокатализаторов, в том числе с неизвестными для ферментов и каталитических антител активностями. В работе предложена и экспериментально проверена оригинальная технология направленного изменения биокаталитической активности. Все полученные результаты являются приоритетными как в области биотехнологии, так и фундаментальной энзимологии.

Диссертация построена по традиционному плану: включает обзор литературы, непосредственно связанный с тематикой работы; раздел, подробно описывающий использованные и разработанные экспериментальные методы; раздел, обсуждающий полученные результаты, заканчивающийся весьма полезным для читателя заключением; и список цитированной литературы.

В обзоре литературы, названном «Искусственные биокатализаторы», цитируются 189 источников, в нем подробно рассмотрены существующие способы создания новых биокатализаторов, их характеристики. Особое внимание в обзоре уделено биологическим антидотам. Обзор, как и диссертационная работа в целом, изложены хорошим, ясным языком, хорошо иллюстрированы. Создание искусственных биокатализаторов является относительно новым разделом физико-химической биологии, поэтому обзоры литературы, имеющиеся на эту тему, немногочисленны. Практически все они опубликованы в международных изданиях, т.е. на русском языке (включая рассмотрение некоторых аспектов о дизайне искусственных катализаторов, опубликованных И.В. Смирновым и соавторами) отсутствуют. Рекомендую Ивану Витальевичу опубликовать обзор в российском издании. Как пожелание к этой части – может быть, было бы уместно в начале текста (или в заключительной части) в одном месте привести схемы реакций, катализируемые вновь созданными биокатализаторами.

Результаты работы и их обсуждение приводятся в трех разделах: разделе 1 – «Разработка технологий получения биокатализаторов на основе антител», разделе 2 – «Разработка микрофлюидной технологии высокопроизводительного скрининга биокаталитической активности в каплях двойной эмульсии», разделе 3 – «Разработка технологии получения биокатализаторов пролонгированного действия».

Экспериментальная работа, изложенная в этих разделах, выполнена с использованием многочисленных и самых современных методов физико-химической биологии, включая такие ее разделы, как генетическая инженерия, иммунология, химия белка, биоинформатика, рентгеноструктурный анализ. Объем экспериментальной работы очень большой. В частности, диссертантом созданы несколько десятков генетических конструкций. Хочу отметить очень высокий уровень экспериментального мастерства И.В. Смирнова. В качестве примера (стр. 168) можно привести очень высокий выход (80%) полисиалированного препарата бутирилхолинэстеразы с сохранением более чем 90% активности. Результаты работы опубликованы в изданиях с высокими импакт-факторами, в том числе в журналах Science Advances, Proceedings of National Academy of USA, Acta Crystallographica D, что, конечно, отражает высокие теоретический и экспериментальный уровни диссертации И.В. Смирнова.

Одним из основных результатов, полученных в работах раздела 1, следует считать предложенную и реализованную И.В. Смирновым технологию получения антител, предрасположенных к ковалентному катализу, получивших название «реактибоди». Для создания «реактибоди» предложена концепция получения и исследования антител на ковалентный ингибитор сериновых протеаз и эстераз – арилфосфонат. Выбор гаптена очевиден, поскольку, помимо вклада в фундаментальную проблему создания новых биокатализаторов, получение антидотов является очень насущной задачей человечества.

Получение полноразмерного антитела A17, катализирующего параоксон, подтвердило правомочность предложенной диссертантом стратегии получения каталитических антител. И.В. Смирнов использовал для этой цели ковалентные ингибиторы и получил приоритетные, весьма весомые результаты. Для полноразмерного антитела A17 было проведено исследование функциональных и структурных характеристик и установлено, что полноразмерное антитело сохранило способность взаимодействовать с биотинилированным производным арилфосфоната и имело субстратную специфичность по отношению к аналогам фосфорорганических токсинов, сравнимую с известной специфичностью для одноцепочечного антитела A17. Показано, что в обоих случаях модификация фосфонатом ингибируется диизопропилфосфатом, аминоэтилсульфонилфторидом. Был доказан *катализ* расщепления параоксона, при этом установлено, что дефосфорилирование является скоростью-лимитирующей стадией реакции. Участие остатка тирозина 37 легкой цепи в катализе было установлено на основании того, что антитело, модифицированное арилфосфонатом, и антитело A17 с заменой этого остатка на фенилаланин, не взаимодействовали с параоксоном.

Очень важно, что удалось получить пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы Fab-фрагментов антитела A17 и его ковалентного комплекса с остатком арилфосфоната, и пространственные структуры Fab-фрагментов антитела A17 и его ковалентного комплекса с остатком арилфосфоната были решены и уточнены с высоким разрешением - 1.5 Å и 1.36 Å. Анализ структур выявил интересный факт - оказалось, что глубина активного центра антитела A17 составляет 15 Å, что не типично для каталитических антител и более характерно для активных центров холинэстераз. Были установлены особенности строения антиген-связывающего центра и факторы, обеспечивающие стабилизацию ковалентного комплекса. Для петли H-CDR3, участвующей в формировании кармана активного центра, высокое значение В-фактора (40-50 Å²) свидетельствовало о подвижности этого фрагмента, поскольку средний В-фактор для структуры равнялся 19 Å². Нужно отметить, что такое значение В-фактора говорит о высоком качестве решенной структуры. Очень интересным фактом является то, что, судя по строению активного центра, стереохимическая конфигурация арилфосфоната свидетельствовала о наличии у антитела стереохимической специфичности – факт, далеко не тривиальный для каталитических антител. Глубина активного центра антитела, подвижность фрагмента кармана активного центра и его стереоспецифичность – это характеристики, присущие ферментам. Их обнаружение у каталитического тела A17 несомненно подтверждает правомочность предложенной И.В. Смирновым стратегии создания каталитических антител.

Дальнейшее подтверждение сходства характеристик каталитического антитела и ферментов было получено при сравнительном исследовании термодинамики взаимодействия антитела A17, его мутантного варианта A17 L-Y37F и бутирилхолинэстеразы и кинетического анализа реакции антитела в предстационарном режиме. Эти исследования показали, что наблюдаемые различия в структурах антитела и его комплекса с арилфосфонатом следует отнести к конформационному изменению при взаимодействии антитела с фосфонатом. Причем данные предстационарной кинетики показали, что антитело взаимодействует с фосфонатом по механизму индуцированного соответствия, что также характерно для ферментативного катализа.

Полученные данные, несомненно, послужили основой и стимулом для дальнейшего улучшения каталитических параметров антител. И.В. Смирновым была разработана технология квантово-механических/молекулярно-механических расчетов для искусственного «созревания» антител. Предложенный в работе метод направленного изменения свойств каталитических антител на примере антитело A17+ параоксон включает пять стадий квантово-механических/молекулярно-механических расчетов и

экспериментальную проверку предложенных вариантов мутантных антител. Большой объем расчетной работы был бы нереален без возможностей уникального для московских научных учреждений компьютера «Ломоносов» и глубокого знания И.В. Смирновым биоорганической химии, термодинамики и ферментативного катализа. В результате расчетных работ были предложены и далее получены и исследованы шесть вариантов антитела А17. Кинетические параметры их взаимодействия с параоксоном, приведенные в таблице 9 (стр. 137), наглядно демонстрируют успех предложенной И.В. Смирновым технологии квантово-механических/молекулярно-механических расчетов для создания биокатализаторов на основе антител и для улучшения свойств ферментов. Для мутантного варианта антитела А17 с заменой остатка серина легкой цепи на аргинин показано более чем 170-кратное увеличение эффективности взаимодействия с параоксоном по сравнению с антителом дикого типа.

Очень ценно, что для этого варианта были получены данные рентгеноструктурного анализа – как самого антитела, так и его ковалентного комплекса. Анализ трехмерных структур позволил объяснить наблюдаемое в стационарной кинетике значительное увеличение скорости реакции с параоксоном и выявил очень интересный факт – оказалось, что структура активного центра антитела имеет высокую степень сходства со структурами ферментов, которые содержат фосфорилируемый остаток тирозина. Кроме того, наложение двух структур – антитела и его комплекса с параоксоном (рис. 46 В, стр. 140) подтвердило ранее выдвинутое и подтвержденное результатами данных предстационарной кинетики существование для антитела механизма индуцированного соответствия.

В разделе 2 приводится разработка микрофлюидной технологии высокопроизводительного скрининга биокаталитической активности в каплях двойной эмульсии. Это актуальный вопрос для отбора наилучшей каталитической активности из библиотек генов вновь создаваемых биокатализаторов.

Технология основана на использовании микрофлюидных капель двукратной эмульсии вода/масло/вода. Система была использована для скрининга уровней активности биокатализаторов, представленных в дрожжевой системе *Pichia pastoris*. В работе было показано, что предложенная технология скрининга характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью по отношению к определенной реакции на примере скрининга искусственной библиотеки активностей, содержавшей смесь клеток, несущих три фермента – энтеропептидазу, ДНК-азу и бутирилхолинэстеразу. Для оценки селективности и эффективности отбора при различных уровнях активности биокатализатора была создана библиотека активного центра бутирилхолинэстеразы,

представлявшая собой статистическую замену аминокислот в ацил-связывающей петле фермента 284-TPLSV-288.

Для клеток, обладающих активностью более чем в 5 раз превышающей активность контрольных клеток, продемонстрирована возможность эффективного отбора из смеси, где их популяция менее 0.1%, для клеток с уровнем активности примерно в 2 раза превышающим контрольный эффективный отбор был возможен при концентрации такой популяции более 0.1%, для отбора высокоактивных ферментов популяция активных клеток может быть менее 0.001%.

Далее разработанная методика была применена для скрининга библиотеки мутантных вариантов бутирилхолинэстеразы при поиске вариантов, способных к *каталитическому гидролизу* фосфорорганических токсинов. Использовалась упомянутая выше библиотека активного центра фермента в районе 284-TPLSV-288 и фосфорорганические токсины – параоксон и кумариновый аналог зомана. Для трех клонов, *устойчивых* к ингибированию параоксоном, была получена экспрессия мутантных вариантов фермента в клетках млекопитающих и определены стационарные кинетические параметры (Таблица 13, стр. 161). Результаты оказались весьма впечатляющими и неожиданными. После проведения всего одного раунда селекции небольшого репертуара мутантных форм бутирилхолинэстеразы И.В. Смирновым получены варианты фермента, обладающие новой, не характерной для бутирилхолинэстеразы, каталитической активностью – новые формы *катализируют гидролиз* параоксона. Автор справедливо отмечает (стр. 161), что «использование разработанной микрофлюидной технологии скрининга позволило обнаружить несколько позиций для аминокислотных замен в активном центре БУХЭ, приводящих к индукции каталитического гидролиза ФОТ, чего не удавалось достигнуть классическими методами рационального дизайна более чем за двадцать лет поиска».

Раздел 3 диссертационной работы продолжает исследования возможностей совершенствования свойств биокатализаторов, используемых в медицине. Логично, что объектом была выбрана бутирилхолинэстераза человека, поскольку как биологический антидот фермент одобрен FDA. Кроме того, И.В. Смирновым в ходе выполнения диссертационной работы была получена новая каталитическая активность фермента, что позволяет применять бутирилхолинэстеразу как антидот против отравления фосфорорганическими ядами.

Как рекомбинантный негликозилированный фермент, полученный при экспрессии в клетках *E. coli*, так и мономерная форма рекомбинантной бутирилхолинэстеразы

человека быстро выводятся из крови, поэтому для улучшения фармакокинетических параметров фермента был применен метод полисиалирования.

В этом разделе работы, как и в предыдущих, проведена большая экспериментальная работа: 1) созданы генетические конструкции для экспрессии гена фермента человека в клетках линии CHO-K1. После котрансфекции двумя генетическими конструкциями был получен клон АЗ, который позволял получать до 30 мг/л активного фермента в олигомерной форме; 2) проведен анализ кинетических констант реакции гидролиза специфического субстрата - бутирилтиохолин йодида препаратами человеческого рекомбинантного фермента и фермента дикого типа из плазмы крови человека, который показал, что значения констант K_M и k_{cat} равны в пределах ошибки; 3) определены фармакокинетические параметры выведения препарата рекомбинантного фермента из кровотока мыши. Рассчитанные значения периода полувыведения, периода полураспределения и среднее время удерживания препарата рекомбинантного фермента в крови показали, что он быстро выводится из кровотока, что делает нецелесообразным использование его в качестве профилактического антидота против отравлений фосфорорганическими токсинами; 4) с вариацией многих параметров реакции полисиалирования определены оптимальные условия реакции; 5) исследованы фармакокинетические параметры полисиалированного препарата. Результаты исследования показали, что использование химического полисиалирования позволило увеличить время полувыведения препарата в шесть раз по сравнению с препаратом немодифицированной фермента; 6) определено, что препараты бутирилхолинэстеразы обладают высокой реакционной способностью по отношению к боевому отравляющему веществу «VR». Эта активность практически не зависела от типа используемого биокатализатора - величины констант ингибирования рекомбинантного фермента, полисиалированного фермента и фермента дикого типа из плазмы крови человека токсином VR оказались близки (таблица 19, стр. 171); 7) определены значения защитной эффективности препаратов полисиалированной бутирилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы дикого типа по отношению к токсину VR.

Проведенное комплексное исследование свойств полисиалированного фермента в сравнении с ферментом из плазмы крови человека показало, что полученный препарат полисиалированной бутирилхолинэстеразы безопасен для животных и удовлетворяет требованиям к биологическому антидоту.

Стоимость полисиалированного фермента достаточно высокая, поэтому для получения препарата пролонгированного действия И.В. Смирновым был разработан альтернативный способ улучшения фармакокинетических характеристик

бутирилхолинэстеразы. Для получения высокого уровня продукции фермента с сохранением высокой активности была создана серия генетических конструкций нового поколения, обеспечившая эффективную экспрессию гена фермента в тетрамерной форме. В результате нескольких этапов улучшения генетических конструкций был получен клон-суперпродуцент – «клон б», с очень высоким уровнем экспрессии гена бутирилхолинэстеразы - более 70 мг/л в полностью тетрамерной форме. Такой уровень экспрессии позволил получить гомогенный фермент (Рис. 70, стр. 175) в препаративных количествах и всесторонне изучить его характеристики. Стоит упомянуть, что для изучения влияния химического полисиалирования на профиль биораспределения и накопления препарата тетрамерной полисиалированной бутирилхолинэстеразы были проведены эксперименты с использованием препаратов, меченных радиоизотопом ^{125}I . В таблице 21 (стр. 179) приводится сравнение фармакокинетических параметров смеси мономерной и димерной, а также тетрамерной форм фермента и полисиалированных смесей мономерной и олигомерной форм бутирилхолинэстеразы. Данные таблицы показывают, что полученный тетрамерной препарат обладает наилучшими фармакокинетическими параметрами. Защитное действие препарата было проверено на мышинной модели отравления параоксоном, в том числе на мышах, нокаутных по гену бутирилхолинэстеразы. Результаты испытаний показали хорошее защитное действие препарата (Рис. 74, стр. 182). Внутривенное введение препарата в дозе 50 мг/кг приводило к увеличению LD50 как у нокаутных мышей, так и у мышей дикого типа. Было отмечено значительное снижение тяжести симптомов отравления нокаутных мышей и мышей дикого типа. Внутривенное введение препарата в дозе 50 мг/кг обеспечивало 100% и 78% выживаемость мышей дикого типа и нокаутных мышей, получивших летальную дозу параоксона - 600 мкг/кг (около 1,2 LD50) и 550 мкг/кг (около 1,1 LD50).

Таким образом, большая и сложная работа по созданию тетрамерного рекомбинантного препарата бутирилхолинэстеразы человека привела к созданию эффективного антидота и обеспечила экономически выгодный биотехнологический способ его получения.

Как упоминалось выше, диссертационная работа написана хорошим, ясным языком. Результаты хорошо иллюстрированы.

Несколько замечаний к оформлению работы:

- 1) раздел «Литературный обзор» следует называть «Обзор литературы»;
- 2) в «Оглавлении» (стр. 2) имеются ошибки в нумерации страниц разделов;
- 3) повсеместно, вместо греческих букв, использован значок ®;
- 4) вместо “*p*-нитрофениловый эфир” везде имеется “*n*-нитрофениловый эфир”

- 5) следует писать «арилфосфонат», т.е. слитно, не «арил-фосфонат»;
- 6) на стр. 115 названия ферментов не соответствуют правилам номенклатуры ферментов;
- 7) автор вводит термин «предреакционный комплекс» вместо, по моему мнению, общепринятого и уместного в данном случае «комплекс Михаэлиса» без пояснения.

Конечно, эти замечания не снижают очевидных актуальности и весомости вклада диссертационной работы И.В. Смирнова как в фундаментальную, так и в прикладную области науки.

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).

Официальный оппонент

И.о. зав. лабораторией химических основ биокатализа
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук (ИМБ РАН),
доктор химических наук, профессор

Татьяна Викторовна Демидкина

119991, г. Москва,
ул. Вавилова, д. 32. ФГУБУН ИМБ РАН
Тел. 7 (499) 1359858
E-mail: tvd@eimb.ru

Подпись проф., д.х.н. Т.В.Демидкиной
«Удостоверяю»
Ученый секретарь ФГБУН ИМБ РАН
к.в.н. А.А. Бочаров

13.06.2017

