



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: jsinfo@eimb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

21.03.2017 № 123/12-21/11

На № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки Институт молекулярной биологии им.
В.А.Энгельгардта

Член-корреспондент РАН, профессор
В.Л.Карпов



«...» февраля 2017 года

ОТЗЫВ

**Ведущей организации на диссертационную работу Степановой Анастасии Валерьевны
«Направленное изменение функциональных свойств антител, полученных из
комбинаторных библиотек генов иммуноглобулинов», представленную на соискание ученой
степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.**

Актуальность темы

Существующие методы и подходы к созданию и отбору комбинаторных библиотек позволили осуществить прорыв в дизайне белковых структур, в том числе лекарственных соединений. Однако, нередко обычный размер библиотеки на много порядков больше, чем количество вариантов белка, которые могут быть подвергнуты скринингу. Это требует разработки, с одной стороны, методов высокоэффективного скрининга, и с другой стороны, способов рационального снижения представительности комбинаторных библиотек без потери функциональной активности.

Появление современных методов компьютерного анализа сделало возможным моделировать молекулярные механизмы взаимодействия белок-лиганд. Более того, с помощью

гибридных молекулярно-механических/квантово-механических исследований можно не только изучать структуры исходных соединений и продуктов реакции, но и следить за динамикой происходящих взаимодействий. Детальное понимание механизма взаимодействия позволяет определить не только наиболее выгодные позиции для проведения мутагенеза, но и тип аминокислотного остатка, который необходимо ввести в активный центр для улучшения реакции. Также вычислительные методы дают возможности для создания широкого спектра новых белков. Прорывом в создании рекомбинантных белков *de novo* является создание биокатализаторов на основе антител, катализирующих реакции, для которых не существует природных ферментов.

Связь темы диссертации с общим направлением развития направления науки и народного хозяйства

Востребованность антидотов к фосфорорганическим токсинам (ФОТ) обусловлена все возрастающим бесконтрольным применением пестицидов, опасностью техногенных катастроф и достаточно высокой вероятностью террористических атак. До 10% всех случаев бытовых отравлений приходится на долю отравлений бытовыми инсектицидами, противомоскитными препаратами, которые так же относятся в ФОТ. За последние 60 лет исследований методы медикаментозного лечения отравлений фосфорорганическими токсинами активно развивались. Тем не менее, они все еще несовершенны, так как позволяют избежать смерти, но не потери трудоспособности и необратимых поражений головного мозга. Альтернативным подходом в терапии и профилактике отравлений ФОТ является использование биологических антидотов на основе антител. Таким образом, дальнейшее совершенствование существующих подходов или же разработка новых перспективных методов поиска белков с улучшенными свойствами, в частности разработка эффективных биокатализаторов фосфорорганических токсинов, является задачей первостепенной важности.

Общий анализ диссертационной работы

Диссертационная работа Степановой А.В. посвящена проблеме разработки способов направленной модификации антител к фосфорорганическим токсинам, с целью улучшения эффективности их взаимодействия с ФОТ. В качестве основы было выбрано антитело A17, способное гидролизовать фосфорорганический пестицид - параоксон.

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения и выводов.

Автором представлен обширный литературный обзор, в первых двух частях которого описано сравнение существующих методов модификации рекомбинантных антител с получением

новых белков с заданными свойствами. Последняя часть посвящена получению антител, нейтрализующих ФОТ. Обзор написан четко, логично и подготавливает читателя к пониманию выполненной работы.

Наибольший интерес представляет глава результаты и обсуждение.

В первой части работы диссертантом была проведена детализация механизма реакции антитела A17 с пестицидом параоксоном. С использованием методов квантовой механики/молекулярной механики было показано, что реакция взаимодействия антитела A17, связывающегося ковалентно с фосфорорганическими токсинами и пестицидами, в частности, с параоксоном протекает по классическому S_N2 механизму. Ключевой стадией инициации процесса является перенос протона с нуклеофильного остатка на фосфорильный атом кислорода параоксона.

Во второй части работы автор провел поиски алгоритма для получения мутантных форм антитела A17 заданной специфичности. С помощью разработанного алгоритма число мутантов было последовательно сокращено с 20^{23} всевозможных комбинаций до 9 активных мутантов. Для одного из мутантов – L-S35R – с помощью квантово-механического/молекулярно-механического анализа было показано максимальное увеличение вероятности формирования водородной связи между нуклеофильным остатком и фосфорильным атомом кислорода по сравнению с антителом дикого типа, а также наименьшее значение коэффициента диффузии, что отражает лучшее позиционирование параоксона в активном центре биокатализатора. Далее диссертант получил панель предсказанных мутантов, которые были экспериментально охарактеризованы по кинетике взаимодействия с параоксоном. Автором четко показано, что мутант L-S35R проявляет 170- кратное увеличение эффективности взаимодействия по сравнению с исходным антителом A17. Рентгеноструктурный анализ мутантного антитела L-S35R и его ковалентного аддукта с остатком параоксона подтвердил предположение что введение остатка аргинина в 35 положение легкой цепи улучшает позиционирование за счет образования водородной связи с фосфорильным атомом кислорода параоксона. Автор показал, что полученная кристаллическая структура активного центра модифицированного антитела L-S35R совпадает с теоретически предсказанной методами квантовой механики/молекулярной механики.

Значимость диссертационной работы для науки и практики

Представленная диссертационная работа содержит обоснованные инновационные предложения по созданию биокатализаторов с заранее заданными свойствами. На примере антительной матрицы автору удалось продемонстрировать возможности суперкомпьютерных расчетов активного центра биокатализатора. Полученные автором заключения позволяют сделать однозначный вывод о применимости данного подхода к расчету структур потенциально

важных для целей биофармпроизводства биокатализаторов. В частности, представляется очевидным возможность создания терапевтических антител с «улучшенными свойствами», что позволит уменьшить количества вводимого пациентам препарата.

Замечания

В ходе выполнения работы автором продемонстрирован новый подход, направленный на получение биокатализаторов с улучшенными свойствами. Тем не менее, к сожалению, в диссертации мало сказано о применимости данного подхода к другим биокаталитическим реакциям, отличным от метаболизма фосфорорганических соединений. Желательно было бы привести в работе больше рассуждений диссертанта по поводу возможностей предложенного метода.

В работе автором, кроме проанализированного мутанта получено еще несколько мутантных форм биокатализатора, которые далее не подвергались детальному исследованию. В диссертации нет существенных сведений о перспективах их использования.

Сделанные замечания не умаляют достоинств представленной работы и могут быть разъяснены в ходе защиты диссертации.

Заключение.

Диссертация Степановой Анастасии Валерьевны «Направленное изменение функциональных свойств антител, полученных из комбинаторных библиотек генов иммуноглобулинов» выполнена на высоком методическом уровне и в целом является завершенным фундаментальным исследованием. В рамках работы над диссертацией «Направленное изменение функциональных свойств антител, полученных из комбинаторных библиотек генов иммуноглобулинов». В работе Степановой А.В. предложен алгоритм, в котором вместо традиционного скрининга применяется виртуальный, при котором используются методы квантово-механических расчетов, позволяющие заметно сократить временные затраты экспериментатора. С помощью данных расчетов был выяснен детальный механизм реакции каталитического антитела A17 с пестицидом параоксон, что позволило определить позицию и тип аминокислотного остатка для проведения мутагенеза. С помощью предложенного алгоритма было предсказано 9 мутантов, обладающих лучшими характеристиками взаимодействия с параоксоном. Предсказанные мутанты были проэкспрессированы, очищены и охарактеризованы по кинетике взаимодействия с пестицидом параоксоном, и было показано, что один из мутантов проявляет 170-кратное увеличение эффективности взаимодействия по сравнению с антителом дикого типа. С помощью рентгеноструктурного анализа данного мутанта и его ковалентного аддукта с остатком параоксона было показано, что полученная кристаллическая структура активного центра

модифицированного мутантного антитела совпадает с теоретически предсказанной, несмотря на то, что все расчеты базировались на структуре антитела дикого типа.

Данные, полученные автором, докладывались на российских и международных конференциях, полностью опубликованы в рецензируемых научных журналах и могут быть использованы научными группами ряда ведущих институтов РАН – Федеральных государственных бюджетных учреждений науки: Институте молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Институте биохимии имени А.Н. Баха РАН, Институте белка РАН, Институте цитологии и генетики СО РАН и др., для биомедицинских исследований, направленных на поиск и разработку новых биокатализаторов.

Работа полностью удовлетворяет требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (с изменениями Постановления Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02 августа 2016 г. № 748), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сам автор, безусловно, достоин присуждения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 «Молекулярная биология». Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории молекулярных основ действия физиологически активных соединений 21 февраля 2017 г.

Главный научный сотрудник,

Заведующий лабораторией молекулярных основ действия

физиологически активных соединений

Член-корреспондент РАН, профессор

С.Н. Кочетков



Подпись С.Н. Кочеткова удостоверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

к.в.н. Бочаров А.А.



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)

ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

лаборатория молекулярных основ действия физиологически активных соединений

kochet@eimb.ru