

## **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 кандидата наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 15 марта 2017 г. № 5

О присуждении **Степановой Анастасии Валерьевне**, гражданке РФ ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Направленное изменение функциональных свойств антител, полученных из комбинаторных библиотек генов иммуноглобулинов» по специальности 03.01.01 – «молекулярная биология» принята к защите 12.10.2016 г., протокол №12 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, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10, действующим на основании приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г.

Соискатель Степанова Анастасия Валерьевна, 1986 года рождения, в 2009 году соискатель окончила Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (бывший Санкт-Петербургский государственный политехнический университет). С 2009 по 2012 гг. обучалась в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. В настоящее время работает научным сотрудником лаборатории биокатализа 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 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научные руководители – доктор биологических наук Пономаренко Наталья

Александровна, лаборатория биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, ведущий научный сотрудник; кандидат химических наук Смирнов Иван Витальевич, руководитель 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, старший научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

**Шайтан Константин Вольдемарович**, доктор физико-математических наук, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»:

**Тиллиб Сергей Владимирович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярных биотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, г. Москва, в своем положительном заключении, подписанном Кочетковым Сергеем Николаевичем, членом-корреспондентом РАН, профессором, главным научным сотрудником, заведующим лабораторией молекулярных основ действия физиологически активных соединений и утвержденном заместителем директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, членом-корреспондентом РАН, профессором Карповым Вадимом Львовичем, указала, что диссертационная работа Степановой Анастасии Валерьевны полностью соответствует критериям, установленным "Положением 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), а сам автор, безусловно,

достоин присуждения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 «Молекулярная биология».

Соискатель имеет 13 опубликованных работ, из них по теме диссертации – 11, в том числе пять работ объемом 5,75 печ.листов, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, входящих в международные базы данных Web of Science и Scopus. Наиболее значимые работы по теме диссертации, в которые автор внес основной вклад:

1. Ivan V. Smirnov\*, Andrey V. Golovin\*, Spyros D. Chatziefthimiou\*, **Anastasiya V. Stepanova\***, Yingjie Peng, Olga I. Zolotareva, Alexey A. Belogurov Jr., Inna N. Kurkova, Natalie A. Ponomarenko, Matthias Wilmanns, G. Michael Blackburn, Alexander G. Gabibov, Richard A. Lerner. Robotic QM/MM-driven maturation of antibody combining sites. \* - равнозначный вклад. Science Advances, 2016, 2(10)
2. А. В. Захаров, И. В. Смирнов, М. В. Серебрякова, М. А. Дрони́на, **А. В. Казначеева (А. В. Степанова)**, И. Н. Куркова, А. А. Белогуров, A. Friboulet, Н. А. Пономаренко, А. Г. Габибов, Т. В. Бобик. Экспрессия каталитических антител в эукариотических системах. Молекулярная биология, 2011, том 45, No 1, с. 86–95.
3. Ponomarenko N, Chatziefthimiou SD, Kurkova I, Mokrushina Y, **Stepanova A**, Smirnov I, Avakyan M, Bobik T, Mamedov A, Mitkevich V, Belogurov A Jr, Fedorova OS, Dubina M, Golovin A, Lamzin V, Friboulet A, Makarov AA, Wilmanns M, Gabibov A. Role of kappa - lambda light - chain constant - domain switch in the structure and functionality of A17 reactibody. Acta Crystallographica, 2014, D70 (Pt 3), p. 708–719.
4. Ю.А. Мокрушина, **А.В. Степанова**, Т.В. Бобик, И.В. Смирнов, А.Г. Габибов. Новые генетические конструкции для получения стабильных терапевтических антител против фосфорорганических токсинов в метилотрофных дрожжах *Pichia Pastoris*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2016, том 161, №1, с. 83-7.
5. С.С. Терехов, Т.В. Бобик, Ю.А. Мокрушина, **А.В. Степанова**, Н.М. Александрова, И.В. Смирнов, А.А. Белогуров, Н.А. Пономаренко, А.Г. Габибов. Экспрессия ДНК-кодируемого антидота к фосфорорганическим токсинам в метилотрофных дрожжах *Pichia Pastoris*. Прикладная биохимия и микробиология, 2016, том 52, № 2, с. 1–9.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Официального оппонента д.ф.-м.н. Шайтана К.В., отзыв положительный. Со стороны оппонента имеются следующие замечания: использования англицизмов и забавных выражений типа: «Поверхность потенциальной энергии показала...» (с.28), «замена его может повлиять на электронную среду...» (с.29), «происходит протонный перенос в атомах углерода...» (с.34), «депротонирует углерод и рассеивает получившийся отрицательный заряд...» (там же), и др. Так же возник

ряд вопросов относительно параметров квантово-химических расчетов, базиса, в котором они проводились, выбора силовых полей, термостатов, длины траекторий и др. Так же в качестве выбора температуры указана “температура человеческого тела” без указания точной температуры. На рисунках 22, 25, 27 не указана цветовая шкала значений энергии.

2. Официального оппонента д.б.н. Тиллиба С.В., отзыв положительный, содержит следующие замечания: Из представленных результатов очевидно, что расчетные мутанты потеряли способность к катализу. Связано ли это с алгоритмом расчета и можно ли предсказывать каталитические мутанты? И как продолжение замечания недостаточно ясно насколько универсален алгоритм и может ли он быть использован для других антител или ферментов. Известно, что большое количество ферментов, гидролизующих фосфаты - металл зависимые, и ключевую роль в катализе играет именно ион металла. Есть ли примеры ферментов в природе, которые имеют механизм взаимодействия с фосфорорганическим субстратом аналогичный с описанными в диссертации антителами?

3. Отзыв ведущей организации, отзыв положительный. Содержит следующие замечания: в диссертации мало сказано о применимости разработанного 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.

На автореферат поступил отзыв к.х.н., зам. заведующего кафедрой химии природных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, доцента Бачевой Анны Владимировны, отзыв положительный, содержит замечания о наличии в автореферате опечаток, а также вопросы: на странице 10 указано, что стояла задача по «перепрограммированию реакционного механизма», что противоречит первому из условий, которым должна удовлетворять библиотека мутантов: механизм реакции должен остаться без изменений, на странице 12 указано, что в результате виртуального скрининга было отобрано 9 мутантов, в то

время как в таблице 1 их только восемь.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их достижениями в областях науки, соответствующих тематике представленной диссертации, в частности, в области молекулярно-механических/квантово-механических расчетов, молекулярного моделирования, экспрессии рекомбинантных белков и их всестороннего анализа, что подтверждается наличием у них большого количества публикаций в высокоцитируемых российских и зарубежных журналах по теме диссертации соискателя. Все это позволяет им объективно судить о научной новизне, а также теоретической и практической значимости диссертационной работы.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований разработан алгоритм направленной эволюции антител с целью улучшения их функциональных характеристик. С помощью данных расчетов был выяснен механизм реакции антитела A17 с параоксоном, 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 охарактеризованы по кинетике взаимодействия с 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 наличие дополнительной водородной связи, что улучшает позиционирование параоксона в активном центре.

Теоретическая значимость исследования состоит в получении новых знаний о возможности использования квантово-механических/молекулярно-механических методов для расчета реакций взаимодействия антител с их субстратами. Данная работа вносит существенный вклад в разработку новых методов поиска белков с улучшенными свойствами, в частности для разработки эффективных биокатализаторов фосфорорганических токсинов.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработана методика быстрого и эффективного поиска

активных биокатализаторов. Кроме того, отработаны протоколы экспрессии рекомбинантных Фас-фрагментов антител в дрожжах *Pichia Pastoris* и их очистки.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что экспериментальные работы были проведены с использованием сертифицированного оборудования и материалов, показана воспроизводимость результатов исследования. Теоретические предположения и концепции, использованные в работе, построены на основе современных опубликованных экспериментальных данных по теме диссертации, а полученные автором результаты с ними согласуются. В ходе выполнения работы были использованы современные методы биоорганической химии, биотехнологии и молекулярной биологии.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в выборе основных направлений и методов исследования, получении и анализе экспериментальных данных. Основные экспериментальные манипуляции осуществлялись лично соискателем. Расчетные данные получены совместно с д.х.н. Головиным А.В. из Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, рентгеноструктурные данные получены совместно с коллегами S. D. Chatziefthimiou и M. Wilmanns из EMBL, Hamburg. Автор лично участвовал в апробации результатов работы на научных конференциях. Подготовка основных публикаций по выполненной работе проводилась лично соискателем или при его непосредственном участии.

На заседании 15 марта 2017 года диссертационный совет принял решение присудить Степановой Анастасии Валерьевне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 27 человек, из них 8 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 03.01.03 - молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 27, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель диссертационного совета

академик РАН Иванов В.Т.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

