

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук



На правах рукописи

Смирнов Иван Витальевич

НАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ  
БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

Специальность 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
доктора химических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в лаборатории биокатализа и группе комбинаторных методов конструирования биокатализаторов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институте биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

**Официальные оппоненты:**

**академик РАН, д.б.н. Дебабов Владимир Георгиевич**, научный руководитель ФГБУ "Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов";

**чл.-корр. РАН, проф., д.х.н. Пышный Дмитрий Владимирович**, зам. директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН);

**д.х.н. Демидкина Татьяна Викторовна**, заведующий Лабораторией химических основ биокатализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН),

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Защита состоится «28» июня 2017 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета Д.002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Макля, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан \_\_ \_\_\_\_\_ 2017 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук

Олейников В. А.



## **I. ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.**

### **Актуальность проблемы.**

Биокаталитическая функция – это одна из наиболее совершенных функций свойственных живым системам. Эта функция реализуется в ограниченном наборе биологических объектов, основная доля из которых приходится на белковые молекулы – ферменты и антитела. Биокаталитическая активность находит широкое применение в различных сферах современной промышленной и фармацевтической биотехнологии.

Среди биологических лекарственных препаратов антитела занимают одну из ведущих ролей. Разработаны способы получения антител фармацевтического назначения и существует большое количество лекарственных препаратов на их основе. Таким образом, индукция и исследование новых функциональных свойств антител является важной биотехнологической задачей. В частности, создание каталитического антитела способного не только связывать, но и катализировать распад токсичных антигенов может существенно увеличить эффективность терапии, позволит снизить дозировки препарата, и как следствие нагрузку на здоровье пациента. В настоящее время описано большое количество антител с различными типами каталитической активности, как к низкомолекулярным химическим соединениям, так и к биополимерам.

Применение современных методов генетической инженерии, молекулярного скрининга и экспрессии ДНК делает рекомбинантные антитела удобным объектом для индукции каталитической активности.

«Ковалентный катализ» является одним из основных механизмов, определяющих свойства ферментов как наиболее эффективных эволюционно совершенных биокатализаторов. Такой тип катализа реализуется в широком спектре биокаталитических процессов, среди которых сигнальные киназные каскады и каталитические процессы передачи нервного импульса. Таким образом, разработка способов создания биокатализаторов, способных к ковалентному катализу, является актуальной задачей. Она имеет принципиальное значение не только для фундаментальной энзимологии, где ее решение позволит понять пути эволюционного развития биокаталитических функций, но и прикладной биохимии и молекулярной медицины.

Применение методов комбинаторной биологии и химии, способность создания и скрининга высокорепрезентативных библиотек существенно раздвинуло рамки современной биотехнологии и облегчило поиск биоактивных молекул. Использование

библиотек генов антител имеет очень важное преимущество – возможность отбора связывающих и каталитических антител к высокотоксичным соединениям, что невозможно при использовании классических методов иммунизации животных. С другой стороны, использование систем скрининга комбинаторных библиотек антител ограничено возможностями методов отбора, что требует сужения размеров библиотеки, а также не позволяет осуществлять «созревание» антитела, что свойственно живым системам. Необходимо учитывать, что одним из основных требований к биологическому терапевтическому препарату является необходимость его существования в организме в течение времени достаточного для осуществления терапевтического действия.

Таким образом, очевидно, что для успешной реализации исследований по созданию и направленному изменению функциональной активности биокатализаторов необходимо разрабатывать новые методы индукции каталитической активности и адаптации ее под заданный биокаталитический процесс, а также создавать новые технологии поиска биокаталитической активности и способов обеспечения пролонгации терапевтического действия препаратов на основе биокатализаторов. Представленная диссертация посвящена и новым принципам создания биокатализаторов с новыми функциональными активностями, и результаты полученные в ходе ее выполнения решают упомянутые выше задачи фундаментального и прикладного характера.

### **Цель работы и основные задачи исследования.**

Целью работы является разработка новых принципов создания биокатализаторов с заранее заданными функциональными активностями. Для достижения заявленной цели были поставлены и решены следующие экспериментальные задачи:

1. Разработка новых технологий получения биокатализаторов на основе антител;
2. Разработка технологии высокопроизводительного скрининга биокаталитической активности;
3. Разработка технологии получения биокатализаторов пролонгированного действия.

### **Научная новизна и практическая значимость работы.**

В ходе выполнения диссертационной работы была усовершенствована технология получения биокатализаторов на основе антител. Предложенный в диссертационной работе метод получения «реактибоди», позволяет получать эволюционно более совершенные биокатализаторы на основе антител, реализующие механизм «ковалентного»

катализа. В частности, использование этого подхода позволило получить первое каталитическое антитело, способное гидролизовать фосфорорганическое соединение параоксон (POX) по механизму ковалентного катализа. Разработана и представлена новая, не имеющая аналогов в мире, технология направленного изменения активности биокатализаторов на основе антител с использованием квантово-механических расчетов реакций ими катализируемыми, позволяющий создавать и проводить широкомасштабный скрининг виртуальных библиотек антител с целью направленного улучшения их функциональной активности. Был получен мутант L-S35R, который проявляет 170-кратное увеличение эффективности взаимодействия с фосфорорганическим пестицидом параоксон по сравнению с исходным антителом A17.

Создана платформа для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической активности в каплях двукратной микрофлюидной эмульсии. Высокая селективность и чувствительность платформы позволили детектировать различные типы биокаталитической активности, а также дискриминировать уровни активности одного типа. С использованием разработанной платформы были найдены новые каталитические антитела на основе рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека (рчБуХЭ), способные к самореактивации при ингибировании пестицидом параоксон.

Представлены два независимых подхода к созданию препаратов пролонгированного действия на основе биокатализаторов. Впервые успешно осуществлено химическое полисиалирование гидролитического фермента с целью создания на его основе терапевтического препарата пролонгированного действия. Подобраны условия реакции, позволяющие получать конъюгат рчБуХЭ–ПСА27 с 80%-ным выходом. Применение химического полисиалирования существенно улучшило фармакокинетические параметры рекомбинантного фермента, увеличив время полувыведения модифицированной рчБуХЭ в 5.5 раз. Успешно проведены доклинические исследования препарата. Полисиалированный препарат показал высокую эффективность в качестве профилактического биологического антитоксина. Защитный индекс по веществу VR составил 4.2 ЛД50, что сопоставимо с препаратом БуХЭ плазмы крови человека. При реализации альтернативного подхода были получены новые экспрессионные конструкции для получения тетрамерной рекомбинантной БуХЭ человека (4рчБуХЭ) с уровнем продукции до 70 мг/л. Разработанная технология продукции 4рчБуХЭ является уникальной и не

была реализована ни в одной лаборатории мира. Создание тетрамерной рчБуХЭ позволило увеличить время полувыведения препарата в 10 раз по сравнению с олигомерной рчБуХЭ и в 2 раза по сравнению с конъюгатом рчБуХЭ-ПСА27. Внутривенное введение препарата 4рчБуХЭ в дозе 50 мг/кг обеспечивало 100% и 75% выживаемость мышей BALB/c и КО (нокаутных по гену БуХЭ), получивших абсолютно летальную дозу РОХ 600 мкг/кг ( $\approx 1.2$  LD50) и 550 мкг/кг ( $\approx 1.1$  LD50), соответственно.

### **Публикация и апробация работы.**

Основные научные результаты диссертации опубликованы в 23 статьях в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертаций, из них - 3 монографии, 3 обзора, имеется три патента. Работа доложена на целом ряде российских и международных научных конференций, включая симпозиальные доклады на конгрессе FEBS и других съездах.

### **Структура и объем работы.**

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 200 страницах и содержит 74 рисунка и 21 таблицу.

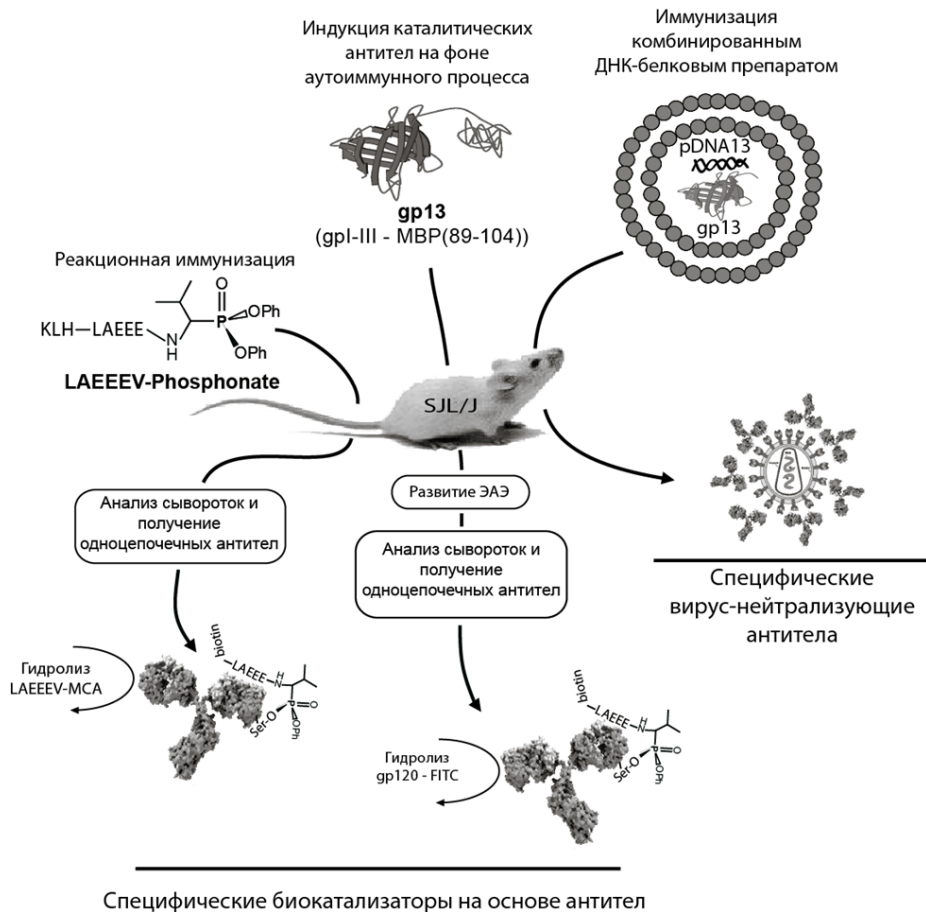
## **II. СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.**

### **1. Разработка технологий получения биокатализаторов на основе антител.**

#### ***1.1. Получение каталитических и нейтрализующих антител к поверхностному гликопротеину ВИЧ-1 gp120.***

Поверхностный гликопротеин gp120 вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) является одним из ключевых антигенов вируса ВИЧ-1 и принимает участие в системе подавления вирусом иммунного ответа организма. Безуспешность попыток нейтрализации ВИЧ-1 *in vivo* антителами, полученными классическими методами иммунизацией животных поверхностными антигенами, а также существование ограниченного количества вируснейтрализующих антител требует разработки новых подходов к терапии заболевания. Таким образом, создание протеазы на основе каталитического антитела, способной узнавать и гидролизовать заданный белковый эпитоп, а также новых методов индукции антител с высоким уровнем вируснейтрализующей активности представляет, как фундаментальный, так и прикладной интерес.

Для создания антител, способных к гидролизу gp120, были использованы подходы по индукции специфических каталитических антител на фоне аутоиммунного процесса и метод «реакционной иммунизации». Для поиска нейтрализующих антител был применен подход, основанный на использовании комбинированного ДНК-пептидного липосомального комплекса, содержащего маннозилированный пептид для направленной доставки в антиген презентующие клетки (АПК) (Рис. 1).



**Рис. 1.** Общая схема получения каталитических и нейтрализующих антител к поверхностному глико-протеину ВИЧ-1 gp120.

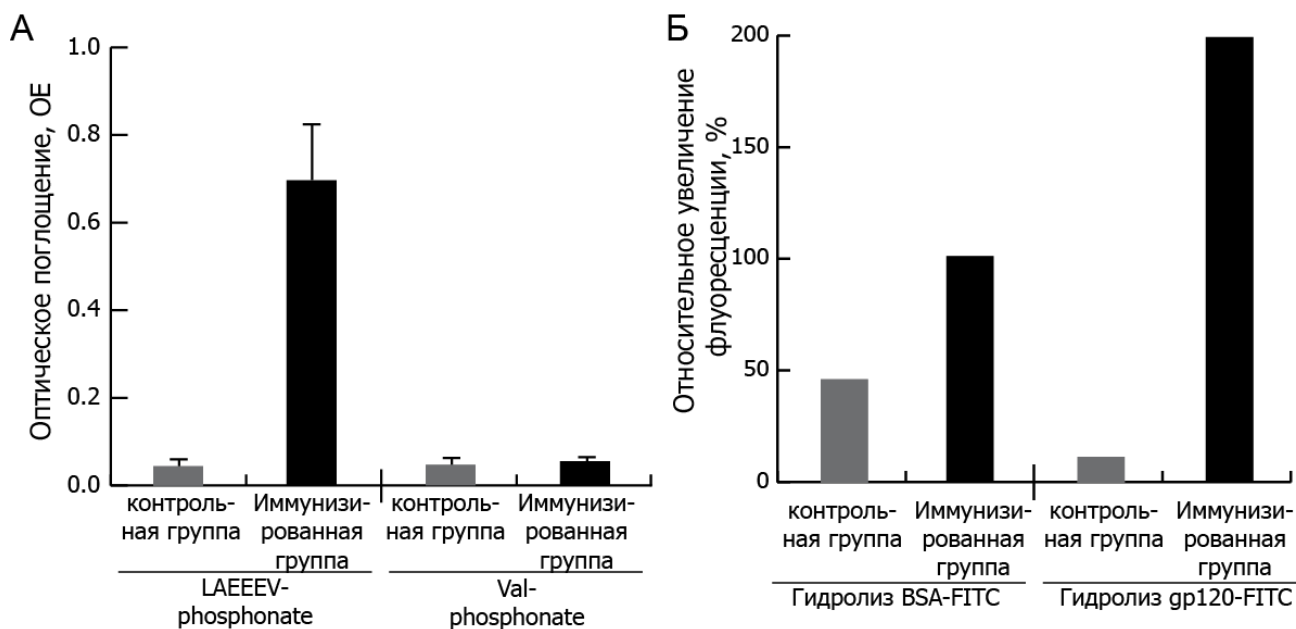
**Индукция специфических каталитических антител методом «реакционной иммунизации».**

Метод «реакционной иммунизации» основан на использовании химически активных гап-тенов, как правило механизм-зависимых ингибиторов протеаз, способных к ковалентной модификации ак-

тивного центра выбранного фермента. Реакционный гаптен при этом может быть конъюгирован с белком или пептидом, соответствующим последовательности выбранного эпитопа для увеличения специфичности продуцируемых антител. В своей работы мы использовали дифенил-фосфонаты – ковалентные ингибиторы сериновых протеаз и эпитоп, соответствующий аминокислотным остаткам 265-270 gp120 – LAEEEEV. Ранее было показано, что гидролиз gp120 по этому сайту приводит к потере способности вируса инфицировать CD4+ клетки, поэтому нами был получен химический конъюгат LAEEEEV-Phosphonate (Рис. 1). Было показано, что сыворотки иммунизированных мышей обладали высоким статистически отличимым уровнем ковалентного связывания со специфическим субстратом (Рис. 2А).

### **Индукция специфических каталитических антител на фоне аутоиммунного процесса.**

Для проведения данного исследования в качестве специфического антигена мы использовали препараты химерного полипептида, состоящего из трех фрагментов gp120 (с аббревиатурой I, II, III), которые соответствуют консервативным участкам белка с делецией первого, второго и третьего гипервариабельных регионов. Для иммунизации были созданы генетические конструкции, кодирующие гены белков gp120 I-III (gp13) и gp120 I-III-mbr (gp15). Результаты иммунизации показали, что протеолитическая активность препаратов поликлональных антител, выделенных из сыворотки мышей, иммунизированных gp15, увеличивается, по сравнению с контрольными мышами линии SJL/J, для обоих субстратов (Рис. 2Б). Также очевидна антигенная специфичность протеолитической активности по сравнению с активностью антител из группы неиммунизированных мышей. Для специфического субстрата gp120-FITC увеличение сигнала по сравнению с контрольной группой мышей составило порядка 10-20 раз, тогда как увеличение в случае BSA-FITC составило 2 раза. Прединкубация полученных поликлональных антител из иммунизированных и контрольных групп мышей с анти-видовыми антителами полностью ингибирует протеолитическую активность, что доказывает ее абзиматическую природу.

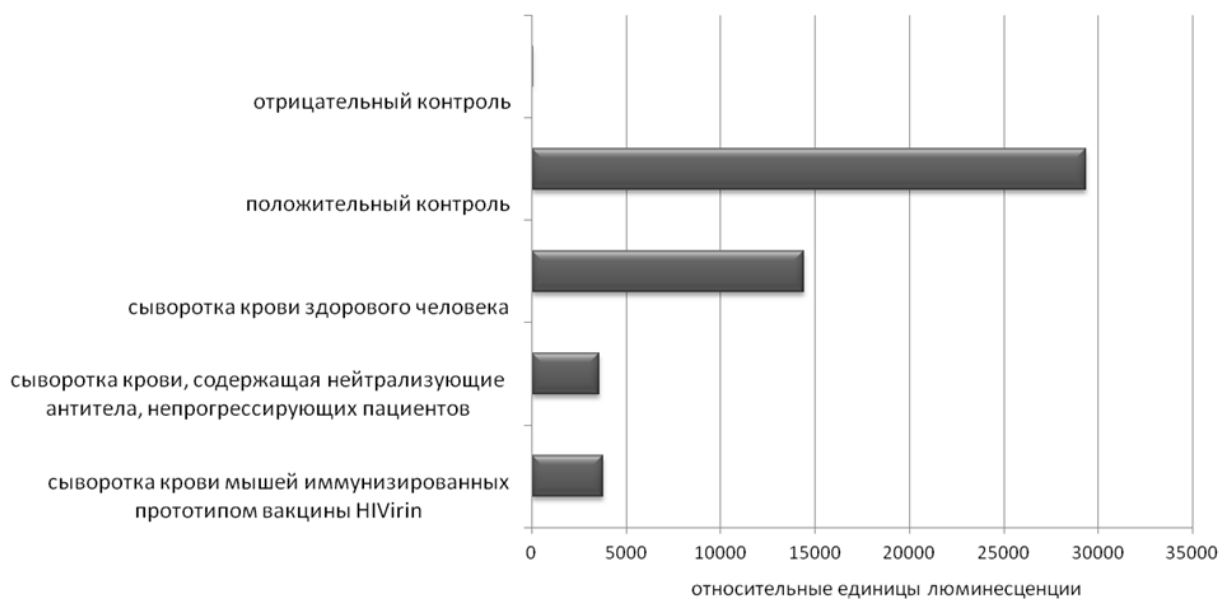


**Рис. 2.** (А) ИФА-анализ сывороток мышей, иммунизированных препаратом KLH-LAEEEEV-Phosphonate, Val-phosphonate и контрольных групп. (Б) Количественная характеристика каталитической активности антител по отношению к неспецифическому субстрату BSA-FITC и специфическому субстрату gp120-FITC.



**Индукция нейтрализующих антител с использованием комбинированного ДНК-белкового липосомального препарата направленной доставки.**

Для увеличения титра специфических антител к gp120 был создан комбинированный ДНК-белковый препарат, состоящий из белковой компоненты – химерного белка gp13, ДНК-компоненты – плазмидной ДНК pDNA13, несущей последовательность гена белка gp13 под управлением сильного эукариотического промотора цитомегаловируса человека (CMV), заключенных в однослойные липосомы (SUV), содержащие маннозилированный липид для адресной доставки липосом в дендритные клетки и клетки АПК, которые имеют высокую плотность рецепторов маннозы. Полученные липосомальные препараты использовали для иммунизации мышей линии SJL/J. Анализ сыворотки мышей после иммунизации проводили методом ИФА, где в качестве антигена использовали белок gp13. Он показал, что титр специфических антител при иммунизации липосомальным препаратом более чем на два порядка выше, в сравнении с иммунизацией антигеном по классической схеме. Образцы сыворотки с наивысшим титром анти-gp120 антител были использованы для оценки ее нейтрализующей активности по отношению к трансдуцированному Env-псевдовирусу с использованием репортерного гена люциферазы в TZM-BL клетках. Согласно данным, представленным на рисунке 3, только комбинированная ДНК-белковая липосомальная композиция, прототип анти-ВИЧ-1 вакцины HIVirin, приводила к получению антител с детектируемой нейтрализующей активностью на модели вируса ВИЧ-1.



**Рис. 3.** Определение нейтрализующей активности сыворотки крови модельных животных после иммунизации комбинированным ДНК-белковым липосомальным препаратом.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о значительном преимуществе липосомальных композиций при индукции заданного гуморального ответа. Полученные результаты стали обоснованием проведения НИОКР «Доклинические исследования иммунобиологического средства пептидной природы для лечения ВИЧ инфекций», шифр «2.1.Пептид ВИЧ 2011» в рамках ГК № 11411.1008700.13.074 от 13.09.2011г. Проведенные доклинические исследования доказали высокий уровень специфической активности и безопасности разработанного липосомального препарата.

### ***1.2. Разработка технологии получения «реактибоди» - антител, предрасположенных к ковалентному катализу.***

«Ковалентный катализ» является одним из основных механизмов, определяющих свойства ферментов, как наиболее эффективных, эволюционно совершенных биокатализаторов. Такой тип катализа реализуется в широком спектре биокаталитических процессов, среди которых сигнальные киназные каскады и каталитические процессы передачи нервного импульса. Таким образом, разработка способов создания биокатализаторов, способных к ковалентному катализу, является актуальной задачей как фундаментальной энзимологии, где ее решение позволит понять пути эволюционного развития биокаталитических функций, так и прикладной биохимии, молекулярной медицины. Ферментативные реакции зачастую проходят через стадии трансформации нескольких переходных состояний, что, естественно, делает метод иммунизации аналогом переходного состояния реакции (АПСР), связанный с имитацией лишь одного состояния (Рис. 4А), достаточно ограниченным. В данной диссертационной работе было проведено усовершенствование существующего метода АПСР и создание условий для образования динамической структуры активного центра антитела, включая наличие аминокислотного остатка, непосредственно участвующего в образовании ковалентного интермедиата. Разработанный метод мы назвали – метод получения реактибоди (реакционно активных антител).

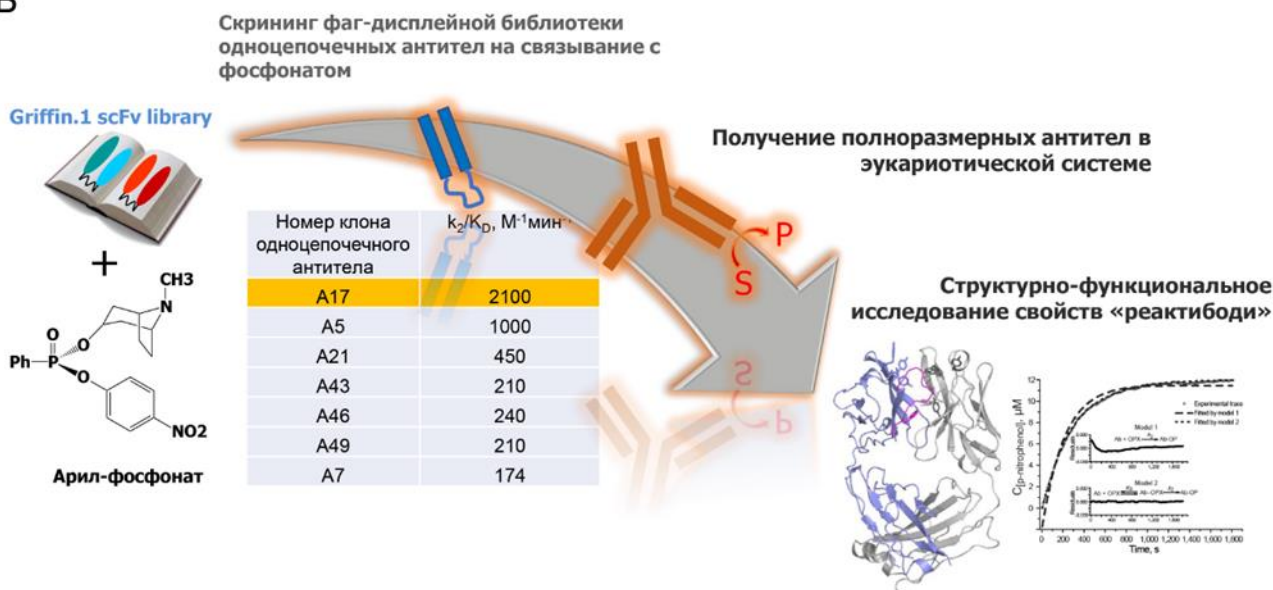
Схематично метод представлен на рисунке 4Б. Мы использовали полусинтетическую библиотеку одноцепочечных антител Griffin1 и проводили скрининг против механизм-зависимого ковалентного ингибитора сериновых протеаз и эстераз – 8-метил-8-азабицикло[3.2.1]октан фенилфосфоната – арил-фосфоната. Для проведения селекции и скрининга было использовано его биотинилированное производное (Bt-X). В

результате селекции была получена панель одноцепочечных антител способных ковалентно взаимодействовать с арил-фосфонатом. Для наиболее активного варианта – антитела A17 – было проведено детальное структурно-функциональное исследование.

**А**

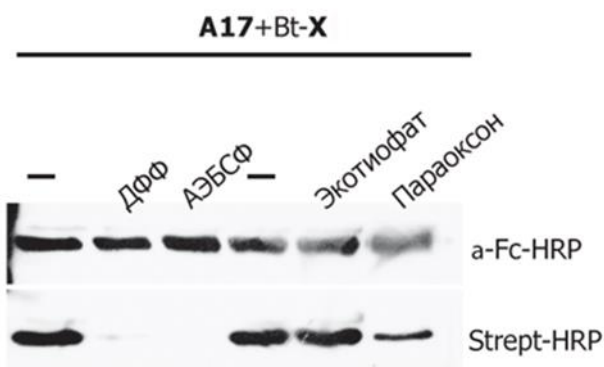


**Б**



**Рис. 4.** Метод получения «реактибоди», предрасположенных к «ковалентному катализу». (А) Общая схема «ковалентного катализа». Красной рамкой отмечены стадии реакции, на которые направлены методы индукции каталитических антител. (Б) Общая схема технологии получения и исследования «реактибоди».

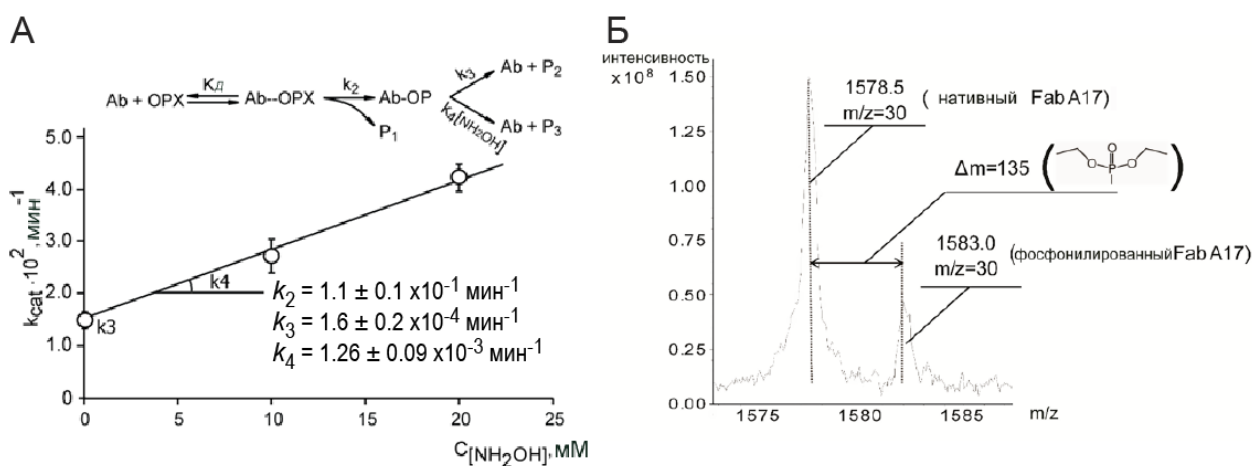
Было показано, что полноразмерное антитело сохранило способность взаимодействовать с биотинилированным производным арил-фосфоната (Vt-X) и имело субстратную специфичность по отношению к аналогам ФОТ, сравнимую с одноцепочечным A17. В обоих случаях модификация фосфонатом Vt-X ингибируется диизопропилфосфатом (ДФФ), аминоэтилсульфонилфторидом (АЭБСФ) и параоксоном, ингибирование в случае экотиофата отсутствует (Рис. 5).



**Рис. 5.** Анализ взаимодействия полноразмерного антитела А17 с необратимыми ингибиторами. Концентрация активных центров А17 составляла 1 мкМ, концентрация ингибиторов составляла 1 мМ. Длительность преинкубации для ДФФ и АЭБСФ составляла 1 час, для параоксона и эктоиофата - 12 часов, реакцию вели при 37°C. После чего смесь инкубировали с 1 мкМ биотинилированного арил-фосфоната (BtX) в течение часа. Продукты разделяли в ДСН ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Визуализацию осуществляли с использованием конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена. Концентрацию полноразмерных антител нормировали по окраске антителами, специфичными к Fc фрагменту тяжелой цепи антитела человека.

Исследование кинетики взаимодействия антитела с параоксоном показало, что скорость реакции линейно зависит от количества антитела А17, продукт реакции образуется в количестве, превышающем число активных центров антитела, оттитрованных в реакции с арил-фосфонатом. Эти данные позволили предположить, что реакция антитела А17 с параоксоном является каталитической. Для доказательства каталитической природы взаимодействия антитела А17 с параоксоном был поставлен кинетический эксперимент, в котором оценивали изменение наблюдаемой константы скорости реакции при добавлении различных концентраций гидроксиламина (Рис. 6А).

Исследование кинетики взаимодействия антитела с параоксоном показало, что скорость реакции линейно зависит от количества антитела А17, продукт реакции образуется в количестве, превышающем число активных центров антитела, оттитрованных в реакции с арил-фосфонатом. Эти данные позволили предположить, что реакция антитела А17 с параоксоном является каталитической. Для доказательства каталитической природы взаимодействия антитела А17 с параоксоном был поставлен кинетический эксперимент, в котором оценивали изменение наблюдаемой константы скорости реакции при добавлении различных концентраций гидроксиламина (Рис. 6А).

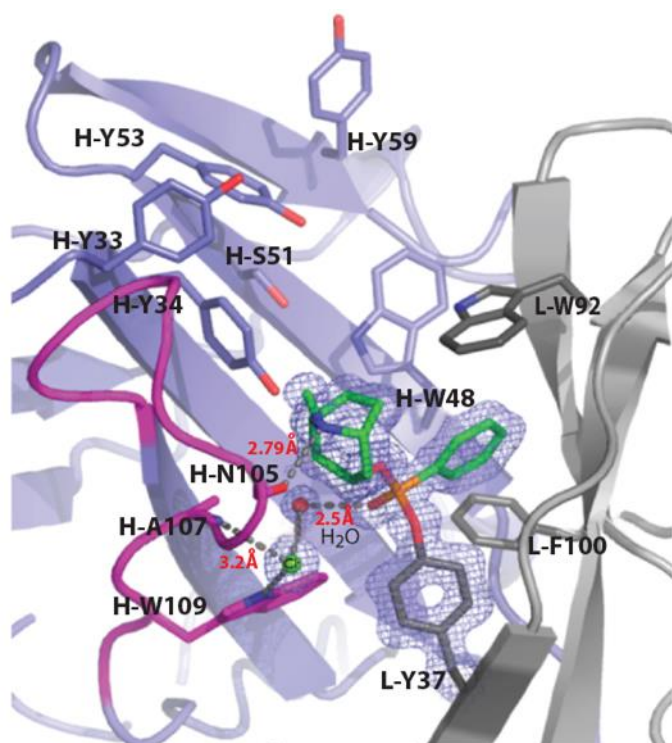


**Рис. 6.** (А) Кинетический анализ реакции гидролиза пестицида параоксон антителом А17 в присутствии гидроксиламина. (Б) Масс-спектрометрический анализ антитела А17, модифицированного параоксоном. Молекулярная масса первого пика соответствуют полноразмерному антителу, молекулярная масса второго пика соответствует модифицированному параоксоном антителу А17. Изменение массы составляет 135 Да, что соответствует массе остатка параоксона.

Полученные результаты однозначно свидетельствуют о том, что реакция антитела А17 с параоксоном является каталитической и проходит через стадию образования

ковалентного интермедиата. Оценка кинетических параметров реакции показала, что дефосфорилирование является скоростью-лимитирующей стадией. Медленная скорость дефосфорилирования позволила детектировать ковалентный интермедиат реакции – диэтоксифосфорильное производное антитела (Рис. 6Б).

Для кристаллизации использовали Fab фрагмент антитела A17, после обработки полноразмерного антитела папаином и дополнительной очистки из реакционной смеси методом гель-фильтрации. Были получены структуры Fab-фрагментов антитела A17 (pdb 2XZA) и его ковалентного комплекса с остатком арил-фосфоната (pdb 2XZC) с разрешением 1.5 Å и 1.36 Å, соответственно. Было установлено, что глубина активного центра антитела A17 составляет 15 Å, что не типично для каталитических антител и более характерно для активных центров холинэстераз. Анализ структуры 2XZC показал, что стабилизация ковалентного аддукта осуществляется за счет Т-стэкинг взаимодействия фенольной группы арил-фосфоната с L-W92 и L-F100 (Рис.7); атом азота тропинольного кольца арил-фосфоната формирует водородную связь с атомом кислорода основной цепи H-N105. За счет этого взаимодействия петля H-CDR3 стабилизируется в уникальной конформации и В-фактор снижается до 15–25 Å<sup>2</sup>. Фосфорильный атом кислорода стабилизирован молекулой воды w614, которая участвует в образовании кластера молекул воды. Этот кластер молекул воды может являться потенциальным участником гидролитической атаки фосфотирозинового аддукта.

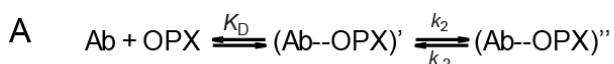


**Рис. 7.** Рентгеноструктурный анализ Fab A17 в модифицированном арил-фосфонатом состоянии. Легкая цепь отмечена серым, тяжелая цепь – сиреневым, петля H-CDR3 – малиновым, остаток арил-фосфоната – зеленым цветом. Атомы азота отмечены синим, кислорода – красным, фосфора – оранжевым цветами.

Одной из особенностей ковалентного катализа является реализация механизма индуцированного соответствия при взаимодействии со своими субстратами, в то же время для большинства изученных каталитических антител полученных методом иммунизации аналогом переходного состояния

реализуется механизм выбора одного из предсуществующих конформеров либо одновременно осуществляются оба варианта, но с различными вкладами.

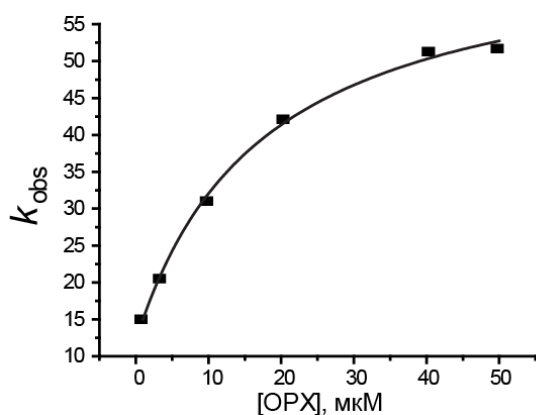
Для уточнения механизма взаимодействия антитела А17 с арил-фосфонатом был проведен кинетический анализ в предстационарных условиях при использовании метода «остановленного потока». Детекцию изменения флуоресценции триптофана в молекуле антитела А17 измеряли при длинах волн  $\lambda_{ex}=280$  нм и  $\lambda_{em}=330$  нм. Обработку результатов экспериментов осуществляли с помощью программного обеспечения DynaFit software (BioKin, США). Экспериментальные данные позволили рассчитать значения наблюдаемой константы скорости  $k_{obs}$  в зависимости концентрации арил-фосфоната. Были рассмотрены крайние случаи взаимодействия: механизм предсуществующих конформеров, описываемый уравнением А1 (Рис. 8А) и механизм индуцированного соответствия, описываемый уравнением А2 (Рис. 8А). Наблюдаемая в эксперименте зависимость имела гиперболический вид и описывалась уравнением А2, которое соответствует механизму индуцированного соответствия (Рис. 8Б).



$$A1) k_{obs} = k_1 + k_{-1} \times \left( \frac{k_2 \times [OPX]}{[OPX] + K_D} \right), \text{ где } K_D = k_{-2}/k_2$$

$$A2) k_{obs} = k_{-2} + \frac{k_2 \times [OPX]}{[OPX] + K_D}, \text{ где } K_D = k_{-1}/k_1$$

Б



**Рис. 8.** Кинетическое описание механизма взаимодействия антитела А17 с арил-фосфонатом. (А) Схема реакции и уравнения, описывающие: А1 – механизм предсуществующих конформеров, А2 – механизм индуцированного соответствия. Б – кривая зависимости наблюдаемой скорости изменения флуоресценции триптофана в зависимости от концентрации добавленного арил-фосфоната (OPX) и соответствующие элементарные константы взаимодействия (справа).

Таким образом, совокупный структурный, кинетический и термодинамический анализ взаимодействия А17 с арил-фосфонатом указывает на динамическое изменение активного центра в процессе реакции. Несмотря на то, что нам не удалось достигнуть высоких значений каталитической эффективности, можно утверждать, что метод получения «реактибоди», предложенный в данной дис-

сертационной работе позволяет получать эволюционно более совершенные биокатализаторы на основе антител. В частности, в результате использования этого подхода удалось получить каталитическое антитело, способное гидролизовать фосфорорганическое соединение параоксон по механизму ковалентного катализа. Полученные на данном этапе работы результаты явились необходимой основой для проведения исследований по направленному изменению функциональных свойств антитела A17.

### ***1.3. Разработка технологии квантово-механических/молекулярно-механических расчетов для искусственного «созревания» антител.***

Использование библиотек генов антител имеет очень важное преимущество – возможность отбора связывающих и каталитических антител к высокотоксичным соединениям, что невозможно при использовании классических методов иммунизации животных. С другой стороны, использование существующих систем скрининга комбинаторных библиотек антител ограничено возможностями методов отбора, что требует сужения размеров библиотеки, а также не позволяет осуществлять «созревание» антитела, свойственного живым системам. Для решения этого комплекса проблем мы разработали технологию направленного изменения свойств каталитических антител с использованием методов квантово-механических/молекулярно-механических расчетов и применили его для системы антитело A17 – параоксон. Так как антитело A17 можно рассматривать как потенциальный антидот против отравления параоксоном, то на первый план выходит способность антитела быстро и необратимо связывать фосфорорганический токсин. Исходя из этого, основное внимание было сконцентрировано на первой стадии процесса – образовании стабильного ковалентного интермедиата A17-параоксон. Разработанный алгоритм можно разделить на несколько последовательных этапов:

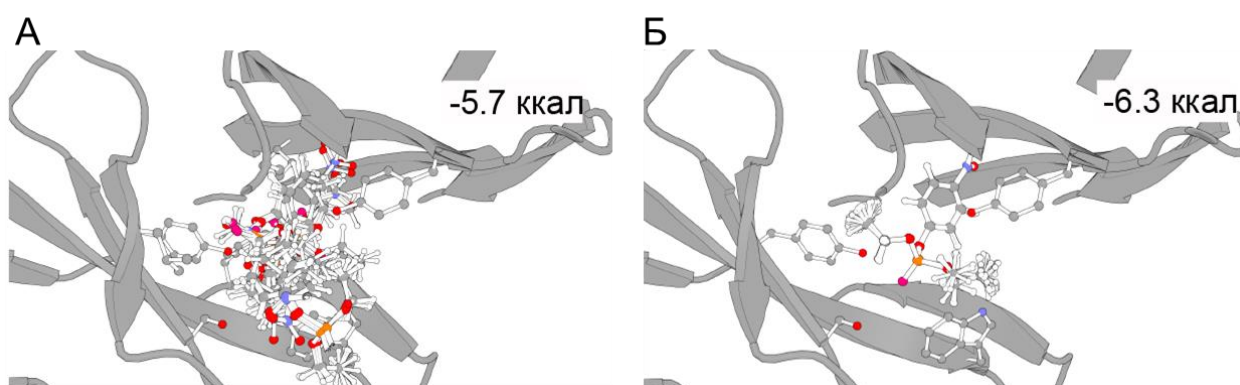
- Определение стартовой ориентации субстрата в активном центре биокатализатора методом докинга;
- Квантово-механическое описание реакции с использованием полученной стартовой ориентации субстрата и определение вектора эволюции, выбранной исходной матрицы;
- Определение позиций для потенциальных замен на основании знаний о механизме реакции, полученных на предыдущем этапе. Создание виртуальной библиотеки активного центра биокатализатора;



- Определение критериев отбора и проведение скрининга виртуальной библиотеки с применением методов рационального сокращения вариантов и компьютерных расчетов вероятности образования, требуемого ковалентного продукта;
- Проведение дополнительного раунда скрининга с использованием более строгих критериев образования ковалентного продукта;
- Экспериментальное подтверждение результатов скрининга;

Для определения стартовой ориентации параоксона внутри активного центра антитела А17 был использован метод молекулярного докинга. Результаты экспериментальных исследований реакции антитела А17 с параоксоном позволяют утверждать, что реакция осуществляется при непосредственном участии остатка L-Y37, который образует ковалентную связь с остатком параоксона. Таким образом, основным критерием выбора стартовой конформации субстрата было такое его расположение, при котором атомы кислорода L-Y37 и фосфора параоксона находились на расстоянии не более 3.5Å. В таком случае стартовое состояние признавали «корректным».

Были найдены пять кластеров возможных положений параоксона, обладающих энергией -6.3 до -5.8 ккал/моль (Рис. 9). Кластеры с энергией, превышающей -5,7 ккал/моль, показали неупорядоченные положения субстрата (рис. 9А). Расчет конформаций показал, что только в кластере с энергией -6,3 ккал/моль возможно *in-line* позиционирование параоксона в предреакционной ориентации, что необходимо для образования переходного состояния (Рис. 9Б).



**Рис. 9.** Кластерный анализ состояний молекулы параоксона в активном центре антитела А17. Атомы кислорода показаны красным цветом, атом фосфора показан оранжевым цветом. Неоднородность состояний в каждом кластере представлена в виде индивидуальных конформаций. Приведены значения энергии связывания для каждого кластера в расчете на один моль.



Реакция образования ковалентной связи между атомами кислорода тирозина и фосфором параоксона достаточно редкое события, поэтому для расчета реакции была использована метадинамика. При проведении расчетов был выбран такой набор параметров, который приводил к 50%-ой вероятности образования переходного состояния. В результате расчетов было установлено, что реакция протекает по классическому S<sub>N</sub>2 механизму (рис. 10).



**Рис. 10.** Квантово-механическое описание стадии образования ковалентного интермедиата в реакции антитела A17 и параоксона.

Механизм реакции включал в себя следующие стадии:

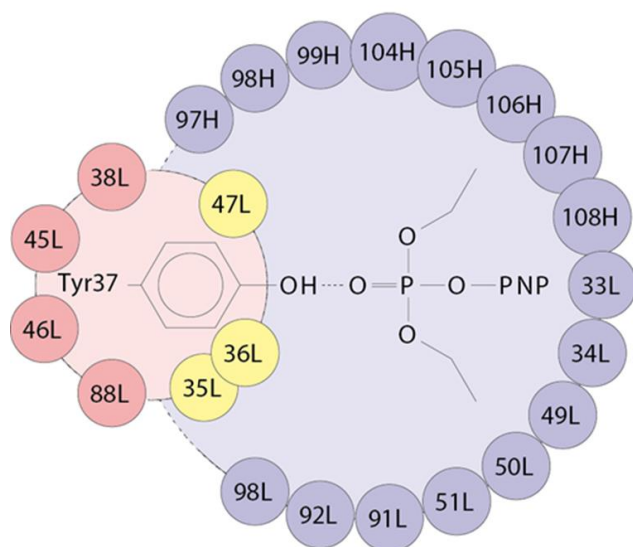
- 1) В предреакционном комплексе, установленном с помощью молекулярного докинга, происходит сближение атомов кислорода L-Y37 и фосфора параоксона на расстояние 2.2Å;
- 2) Происходит перенос протона с кислорода тирозина на фосфорильный атом кислорода, это приводит к образованию раннего переходного состояния. Эта стадия является ключевой, только в случае такого переноса протона наблюдалось образование переходного состояния реакции;
- 3) Затем следует быстрая атака кислорода тирозина на атом фосфора и происходит образование связи O–P. Это приводит к образованию позднего переходного состояния - классической тригональной бипирамиды;
- 4) На заключительном этапе происходит перенос электронной плотности на уходящую *n*-нитрофенольную группу, что приводит к образованию ковалентного производного и *n*-нитрофенола.

На следующем этапе нами была создана виртуальная библиотека для осуществления виртуального скрининга потенциальных мутантов. При создании библиотеки исходили из необходимости учесть максимальное количество потенциальных мутантных

форм. Поиск всех возможных позиций для потенциального мутагенеза был ограничен следующими условиями:

- 1) Механизм реакции должен остаться без изменений;
- 2) Количество контактов параоксона с аминокислотными остатками активного центра в предреакционном комплексе должно быть больше, в сравнении с антителом дикого типа;
- 3) Эффективность ключевой стадии переноса протона от L-Y37 на фосфорильный кислород должна быть выше, в сравнении с антителом дикого типа.

Для определения позиций, входящих в виртуальную библиотеку, был произведен поиск аминокислотных остатков, находящихся в сфере с радиусом не более 3.2 Å, в центре которой находится молекула параоксона (рис. 11). Радиус сферы равен сумме длин водородной связи и бокового радикала аргинина. Аргинин является аминокислотой с самой длинной боковой цепью, это позволяет ввести в библиотеку максимальное количество позиций аминокислот. В результате такого поиска было обнаружено 23 позиции.



**Рис. 11.** Схематическое изображение позиций аминокислотных остатков активного центра антитела A17, удовлетворяющих критериям создания виртуальной библиотеки (в тексте). Синяя сфера представляет позиции аминокислотных остатков, способных образовывать водородные связи с параоксоном. Красная сфера представляет позиции аминокислотных остатков, потенциально влияющих на нуклеофильность L-Y37. Желтые сферы удовлетворяют обоим условиям.

Расчет показывает, что общее количество мутантов при замене, обнаруженных 23 позиций на 20 аминокислот, составляет число  $8.39 \times 10^{29}$ . При использовании самых современных экспериментальных и расчетных методов скрининг библиотек такого размера не представляется возможным. Для рационального сужения репертуара мы ограничили количество возможных аминокислот 11 полярными остатками. Число одновременных замен было сокращено до четырех, а активный центр антитела был разделен на две сферы (Рис. 11):

- Для первой сферы были выбраны позиции и аминокислотные остатки, способные улучшить позиционирование субстрата. Для этого были выбраны аминокислотные остатки, способные быть донором водородной связи: Arg, His, Lys, Ser, Thr, Trp, Tyr в позициях, расположенных вблизи молекулы параоксона и с ориентацией боковых групп в направлении субстрата. В результате было обнаружено 19 позиций.
- Для второй сферы были выбраны позиции и остатки способные увеличить нуклеофильность L-Y37. Для этого были выбраны остатки Ser, Glu, Asp и позиции, расположенные вблизи L-Y37 с ориентацией боковых групп в направлении остатка тирозина. Было обнаружено 7 позиций.

В результате удалось достичь размера библиотеки в 167538 мутантов и приступить к проведению скрининга библиотеки.

Для каждого из выбранных 167538 мутантов с использованием алгоритма ММ Монте-Карло был произведен поиск возможных конформаций боковой цепи. Пятьдесят лучших конформаций для каждого мутанта были проанализированы на способность образовывать водородную связь между параоксоном и аминокислотными остатками получаемого активного центра, то есть расстояние между ними не должно превышать 3.0 Å. С другой стороны, в расчетах учитывали с возможное взаимное отталкивания атомов, выраженное в потенциале Ленарда-Джонсона. В качестве критерия выбора лучших мутантов для дальнейших КМ/ММ расчетов, ввели оценочную функцию F:

$$F = 100 \times \frac{N(\text{контактов})}{E(\text{отталкивания})}$$

Мы выбрали значение  $F > 1.25$ , это привело к сокращению количества мутантов до 375 вариантов. Все эти мутантные антитела были способны образовывать как минимум одну водородную связь между параоксоном и боковой группой введенного аминокислотного остатка.

Каждый из 375 мутантов был проверен на возможность образования переходного состояний методом метадинамики. В расчетах использовали идентичные с реакцией параоксона и антитела дикого типа параметры метадинамики, которые приводили к 50% вероятности образования переходного состояния. Таким образом, были установлены следующие критерии выбора лучших вариантов:

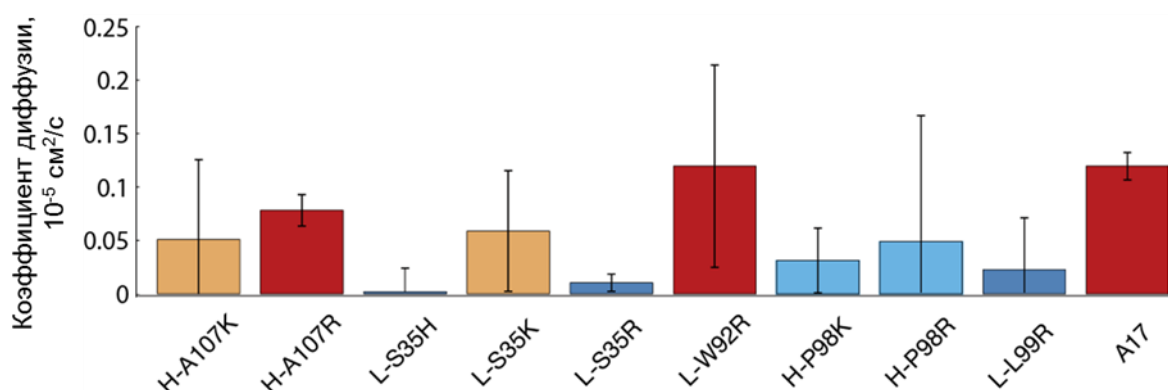
1. Вероятность образования переходного состояния реакции между мутантным антителом и параоксоном должна быть не менее 50%;

2. Время начала процесса переноса протона и образование переходного состояния должно быть минимально;
3. Количество состояний, соответствующих переносу протона в реакции выбранного мутанта с параоксоном должно больше, чем в случае реакции параоксона с анти-телом дикого типа.

Проведенные расчёты позволили сделать следующие выводы:

1. Образование переходного состояния реакции в случае мутантов с заменами на анионные аминокислоты не происходило ни в одном из случаев;
2. Наибольшее число успешных запусков системы обнаруживалось для замен на основные аминокислоты Arg, Lys и His в позициях 35, 92, 98 легкой цепи и 99, 107 тяжелой цепи;

Критериям отбора удовлетворяло девять вариантов с одиночными заменами. Все девять отобранных вариантов более чем на порядок чаще образовывали предреакционный комплекс. Этот факт свидетельствует о том, что в результате отбора были получены варианты антител, демонстрирующих более выгодное для реакции позиционирование субстрата в активном центре. Для оценки эффективности такого позиционирования были рассчитаны коэффициенты диффузии молекулы параоксона при моделировании молекулярной динамики (рис. 12). В качестве стартового состояния использовали состояние предреакционного комплекса. Очевидно, что меньшее значение коэффициента диффузии, свидетельствует о низкой скорости удаления субстрата от предреакционного состояния, тем самым увеличивается вероятность образования переходного комплекса реакции.



**Рис. 12.** Коэффициенты диффузии для параоксона в различных мутантах при классическом моделировании молекулярной динамики. Варианты, имеющие коэффициент в диапазоне  $(0-0.025) \times 10^{-5}$  выделены синим цветом,  $(0.025-0.05) \times 10^{-5}$  – голубым,  $(0.05-0.075) \times 10^{-5}$  – оранжевым,  $>0.075 \times 10^{-5}$  – красным.

Таким образом, полученные результаты отражают эффективность позиционирования параоксона в активном центре мутантных антител. Как видно из рисунка 12 вариант L-S35R имеет низкое значение коэффициента диффузии с наименьшим стандартным отклонением, это делает его наиболее привлекательным кандидатом для дальнейшего изучения.

Результаты исследования кинетических характеристик мутантных антител в реакции с параоксоном приведены в таблице 1.

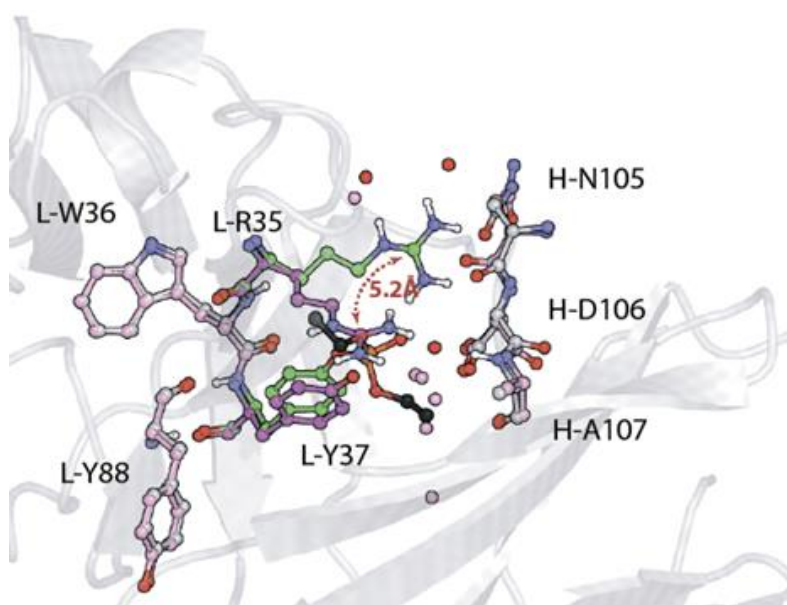
**Таблица 1.** Кинетические параметры реакции взаимодействия мутантов антитела A17 с параоксоном в условиях стационарной кинетики. Измерения проводили при 25°C, концентрация активных центров мутантов A17 – 10 мкМ, концентрацию параоксона варьировали от 20 до 1000 мкМ. Н. Д – не детектируется.

<b>Параоксон</b>				
	$k_2$ (мин <sup>-1</sup> )	$K_D$ (М)	$k_3$ (мин <sup>-1</sup> )	$k_2/K_D$ (М <sup>-1</sup> мин <sup>-1</sup> )
<b>L-S35R</b>	$7.8 \times 10^{-2}$	$3.40 \times 10^{-4}$	Н.Д.	229
<b>L-S35K</b>	$8 \times 10^{-2}$	$6.00 \times 10^{-4}$	Н.Д.	133
<b>L-S35H</b>	$1.2 \times 10^{-2}$	$6.00 \times 10^{-4}$	$1.2 \times 10^{-4}$	20
<b>H-L99R</b>	$0.6 \times 10^{-2}$	$5.10 \times 10^{-4}$	Н.Д.	11.7
<b>L-S35E</b>	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.	-
<b>L-S35A</b>	Н.Д.	Н.Д.	Н.Д.	-
<b>A17</b>	Н.Д.	Н.Д.	$1.6 \times 10^{-4}$	1.35

Анализ кинетических данных по взаимодействию антител с параоксоном показал, что мутант L-S35R проявляет более чем 170-кратное увеличение эффективности взаимодействия с параоксоном по сравнению с антителом дикого типа A17 со значениями бимолекулярной скорости реакции ( $k_2/K_D$ ) 229 М<sup>-1</sup> мин<sup>-1</sup> и 1.35 М<sup>-1</sup> мин<sup>-1</sup> соответственно (Таблица 1), что согласуется с компьютерными расчетами и, по всей видимости, связано с наиболее выгодным позиционированием субстрата в активном центре, увеличением вероятности образования переходного состояния реакции и, как следствие, скорости всего процесса. Детализация механизма взаимодействия наиболее активного мутанта L-S35R показала, в реакции с параоксоном реализуется механизм индуцированного соответствия, который включает в себя две стадии – стадию нековалентного связывания субстрата и затем стадию перестройки комплекса абзим/субстрат, при этом скорость лимитирующей является первая стадия нековалентного связывания

параоксона в активном центре. Рассчитанные индивидуальные константы были равны  $360 \pm 20 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$  и  $76 \pm 5 \text{ мин}^{-1}$  для  $k_{\text{obs}1}$  и  $k_{\text{obs}2}$ , соответственно

Анализ структур L-S35R (pdb 5ADP) и L-S35R-Par (pdb 5ADO) показал, что остаток L-R35 в структуре ковалентного комплекса образует широкую сеть водородных связей с участием молекулы параоксона, остатка H-N105 и молекул воды. Очевидно, что эти взаимодействия стабилизируют фосфорилированный белок. Наложение структур L-S35R и L-S35R-Par позволило установить, что остаток L-R35 смещается  $5.2 \text{ \AA}$ , и в освободившееся пространство укладывается остаток параоксона (рис. 13). Это наглядно демонстрирует реализацию механизма индуцированного соответствия, показанного выше.



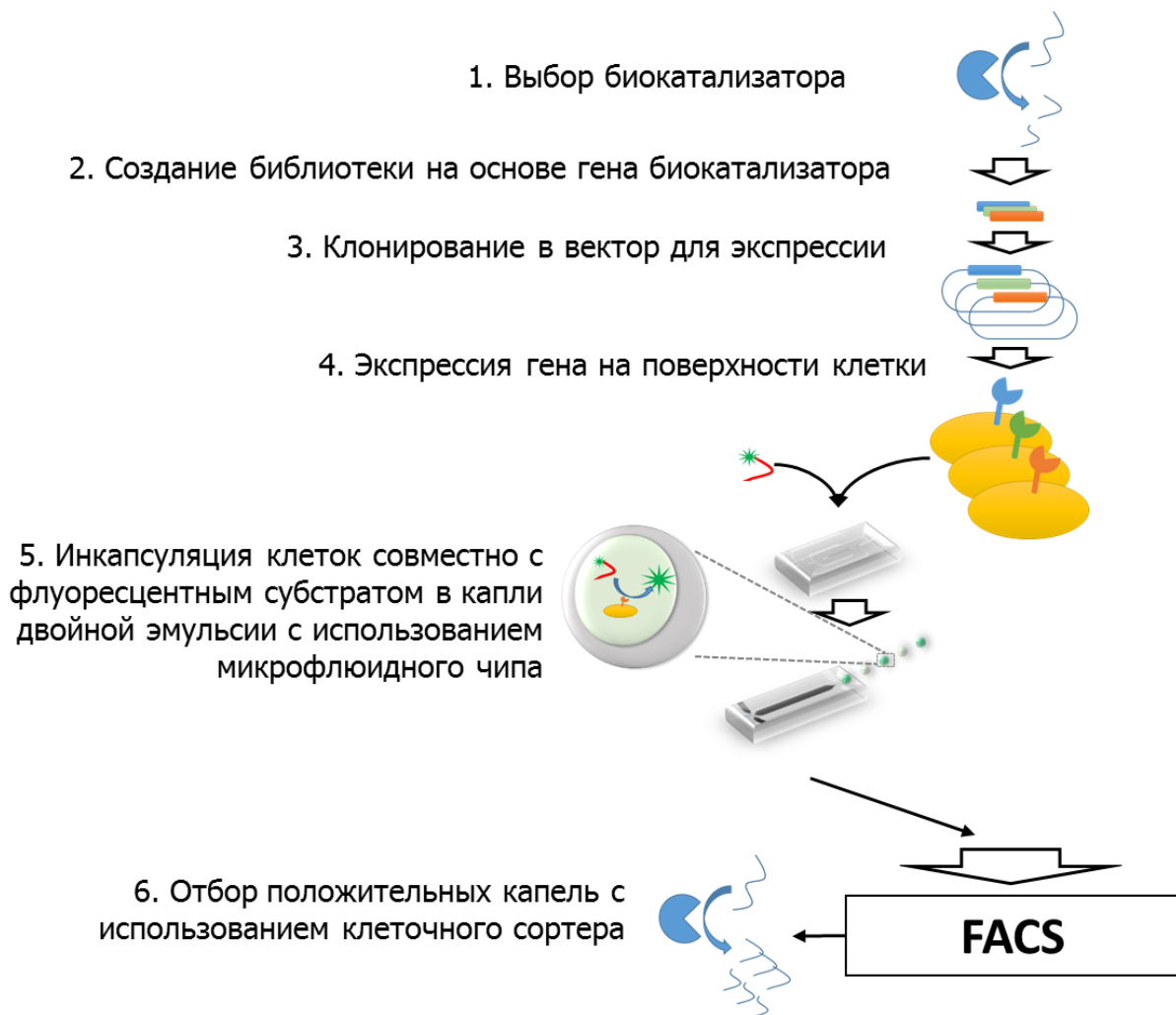
**Рис. 13.** Рентгеноструктурный анализ антитела L-S35R. Показана суперпозиция структур активных центров L-S35R (розовый) и L-S35R-Par (зеленый). Каталитический остаток L-Tyr37 показан зеленым, аминокислотные остатки – серым, остаток параоксона – черным, смещение остатка L-R35 – пунктирной линией.

## 2. Разработка микрофлюидной технологии высокопроизводительного скрининга биокаталитической активности в каплях двойной эмульсии.

Для решения проблемы скрининга биокаталитической активности в данной диссертационной работе была предложена новая технология, основанная на использовании микрофлюидных капель двукратной эмульсии вода/масло/вода. Схематично она представлена на рисунке 14 и состоит из следующих этапов:

1. Выбор биокатализатора;
2. Создание библиотеки на основе гена биокатализатора;
3. Клонирование в вектор для экспрессии;
4. Экспрессия гена на поверхности клетки;

5. Инкапсуляция клеток в капли двойной эмульсии с использованием микрофлюидного чипа;
6. Отбор положительных капель с использованием клеточного сортера.



**Рис. 14.** Общая схема микрофлюидной платформы для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической активности.

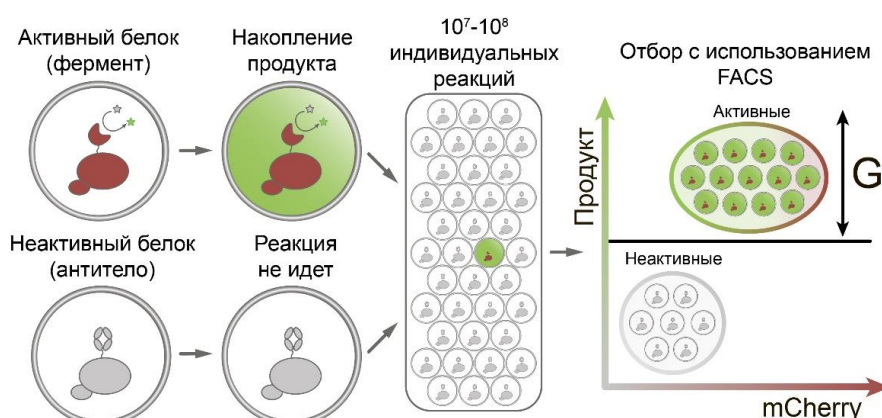
При создании платформы был использован принцип компартиментализации *in vitro* в капли двукратной эмульсии. Однако, в отличие от методов, опубликованных ранее, разработанная платформа использует принцип микрофлюидной генерации капель. Это позволяет добиться высокой степени монодисперсности капель. Использование капель одного размера имеет ряд преимуществ, основными среди которых являются:

- Обеспечение равных условий проведения реакции внутри каждой эмульсионной капли, за счет создания одинаковых концентраций реагентов. Это позволяет многократно снизить соотношение сигнал/шум, повысить чувствительность и специфичность отбора, что особенно важно для проведения отбора биокатализаторов;



- Возможность использовать мягкие условия инкапсуляции, что позволяет использовать технологию для живых клеток;
- Возможность программировать управление условиями генерации капель, что позволяет точно контролировать количество клеток в каждой капле.

Для доказательства применимости разработанной системы скрининга мы использовали дрожжевой дисплей в системе *Pichia pastoris*. Для того, чтобы показать принципиальную возможность отбора биокатализаторов заякоренных на поверхности дрожжевых клеток с помощью микрофлюидной технологии был поставлен следующий эксперимент (Рис. 15). Смесь дрожжевых клеток в соотношении 1:10 «активных», продуцирующих заякоренный фермент ДНКзаI и внутриклеточный красный флуоресцентный белок-репортер mCherry, и «неактивных» клеток, продуцирующих Fab-фрагмент антитела A17, инкапсулировали совместно с субстратом в капли двукратной эмульсии. После протекания реакции, полученные капли анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии и отбирали с помощью FACS.



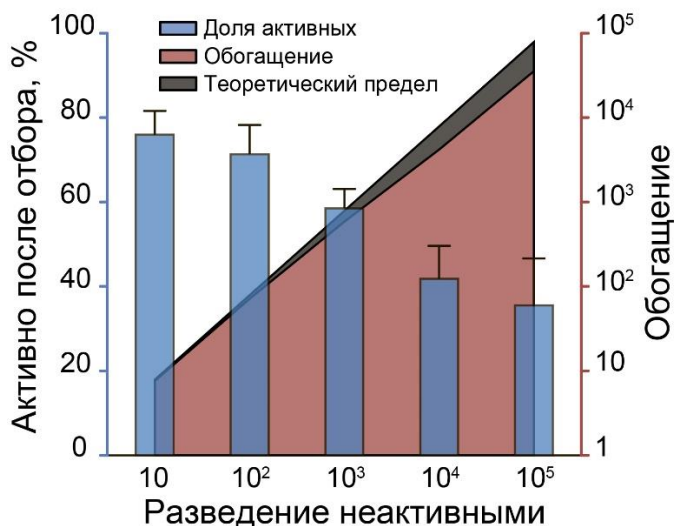
**Рис. 15.** Общая схема отбора дрожжевых клеток с заякоренными биокатализаторами с применением микрофлюидной технологии скрининга биокаталитической активности.

Для того чтобы оценить эффективность скрининга биокаталитической активности от соотношения «активных» и «неактивных» клеток, была проведена серия отборов клеток с заякоренным ферментом ДНКзаI из смеси с различным соотношением неактивных клеток в диапазоне от 1:10 до 1:100000 (Рис. 16).

Для каждого соотношения был проведен один раунд отбора. Как видно из рисунка 16 для соотношений 1:10 и 1:100 степень обогащения «активных» клеток из смеси с «неактивными» была близка к теоретическому пределу. Теоретический предел – максимальное количество «активных» клеток, которое может быть реализовано при заданной величине степени заполнения  $\lambda$ . Для использованной в данном эксперименте степени заполнения  $\lambda=0.5$  максимальная специфичность отбора составляет 78.7%. Для



максимального анализируемого разведения 1:100000 было обнаружено более 35% «активных» клеток, что лишь в 2 раза меньше, чем теоретический предел. Таким образом, с использованием разработанной микрофлюидной платформы скрининга можно проводить отбор клеточных библиотек генов биокатализаторов с размером не менее  $1 \times 10^5$  за один раунд скрининга.

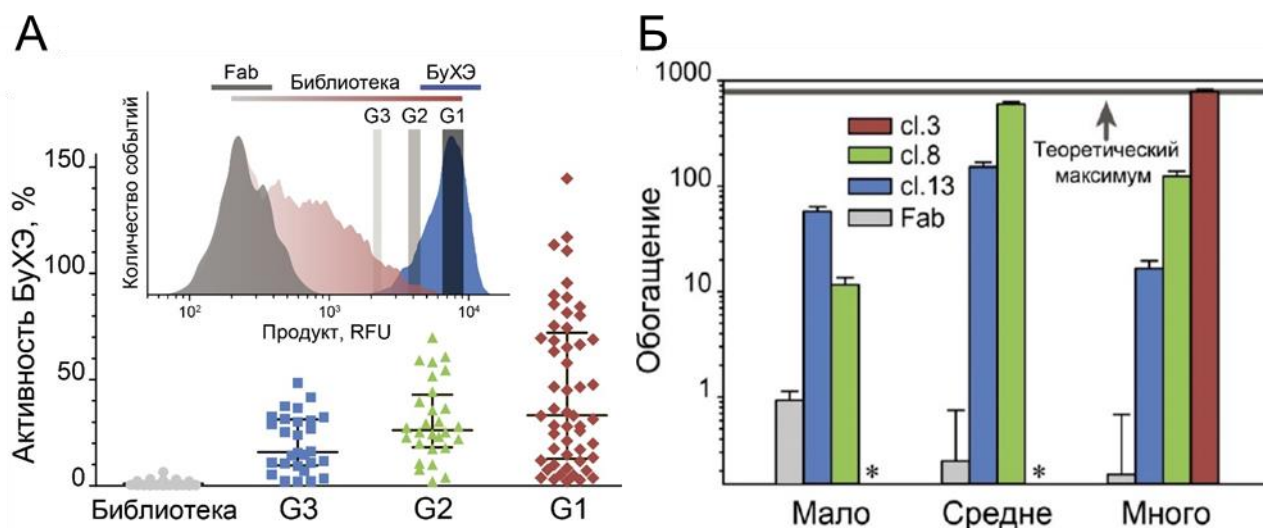


**Рис. 16.** Анализ эффективности отбора биокаталитической активности от соотношения «активных» и «неактивных» клеток.

При скрининге библиотек ферментов возможна ситуация, когда варианты одного и того же фермента, представленные в библиотеке, могут обладать различным уровнем ферментативной активности. Для того чтобы оце-

нить селективность и эффективность отбора при различных уровнях активности биокатализатора была создана библиотека активного центра БуХЭ. Библиотека представляла собой статистическую замену аминокислот в ацил-связывающей петле 284-TPLSV-288. Размер библиотеки составил  $3 \times 10^5$  вариантов. Полученная библиотека была клонирована в вектор для клеточного дисплея pPic9k- $\alpha$ -Lib\_VChE-FLAG-anchor и инкапсулирована в капли двукратной эмульсии совместно с соответствующим флуорогенным субстратом. Было установлено, что библиотека БуХЭ 284-TPLSV-288 обладала существенно более низким средним уровнем специфической активности (Рис. 17А, врезка), который составил менее 0.5% от активности фермента дикого типа. Для выбора популяции клеток с «высоким», «средним» и «низким» уровнями активности использовали гейты G1-G3, соответственно (G1>G2>G3) (Рис. 17А). После отбора популяций с использованием гейтов G1-G3 и последующей регенерацией клеток установили, что клоны, отобранные из капель с наименьшим уровнем флуоресценции, обладают наименьшим уровнем активности, и наоборот. Для количественной оценки эффективности отбора ферментов с различным уровнем идентичной активности из каждой популяции было выбрано по одному клону. Были получены клоны c1.3, c1.8 и c1.13 из популяций G1, G2 и G3, и активностями 1.1%, 5.4% и 55% от активности БуХЭ ди-

кого типа, соответственно. Инкапсуляция индивидуальных клонов cl.3, cl.8, cl.13 и «неактивных» клеток совместно с субстратом в капли двукратной эмульсии приводила к образованию популяций с четырьмя различными уровнями флуоресценции накопления продукта: cl.3 – «много», cl.8 – «средне», cl.13 – «мало», на основании этого были выбраны соответствующие гейты. Далее смесь клеток клонов cl.3, cl.8 и cl.13 и «неактивных» клеток в соотношении 1:1:1:1000 инкапсулировали в капли двукратной эмульсии и отбирали с использованием выбранных гейтов «Много», «Средне», «Мало». После регенерации клеток из капель, распределение вариантов cl.3, cl.8 и cl.13 и «неактивных» клеток было проанализировано методом ПЦР в реальном времени. В результате обогащение cl.3 и cl.8 происходило с эффективностью, близкой к максимальной. Эффективность обогащения cl.13 была ниже и составляла примерно 10% от максимальной (Рис. 17Б).



**Рис. 17.** Анализ селективности и эффективности отбора при различных уровнях активности биокатализаторов, заякоренных на поверхности дрожжевой клетки. (А) Анализ активности индивидуальных клонов библиотеки до и после отбора, полученных с использованием гейтов G1-G3. Во врезке представлено распределение флуоресценции капель, содержащих контрольные клетки (серый), клеточную библиотеку БуХЭ (розовый), а также фермент БуХЭ дикого типа (синий). Показаны использованные для отбора гейты G1-G3, соответствующие «высоким», «средним» и «низким» уровнями флуоресценции капель. (Б) Мутанты БуХЭ с различным уровнем активности приводят к образованию капель с различным уровнем флуоресценции.

Таким образом, для клеток, обладающих активностью более чем в 5 раз превышающей активность контрольных клеток возможен эффективный отбор из смеси, где их популяция менее 0.1%. В то же время, для клеток с уровнем активности примерно в

2 раза превышающим контрольный, эффективный отбор возможен лишь при концентрации такой популяции более 0.1%. Для отбора высокоактивных ферментов популяция активных клеток может быть менее 0.001%. Необходимо отметить, что селекция капель, обладающих средней и низкой активностью, приводит к эффективному исключению высокоактивных вариантов. Это может быть использовано для отбора вариантов фермента, приводящих к потере его активности.

Работоспособность разработанной технологии для поиска новой биокаталитической активности была доказана на примере скрининга библиотеки мутантов БуХЭ, с целью поиска вариантов, способных к каталитическому гидролизу фосфорорганических токсинов. Для этого была использована клеточная библиотека мутантов БуХЭ в регионе 284-TPLSV-288, описанная выше, а также фосфорорганические ингибиторы – параоксон (POX) и кумариновый аналог зомана (GD<sub>C</sub>). Клеточную библиотеку инкубировали с ингибиторами в течении 30 минут. После удаления остатков непрореагировавших молекул ингибитора, инкапсулированные клетки подвергали отбору на наличие остаточной специфической активности. В результате одного раунда селекции были отобраны клоны cl.14 и cl.15, демонстрирующие устойчивость к ингибированию параоксоном, и cl.19 устойчивый к GD<sub>C</sub>.

Кинетический анализ отобранных клонов cl.14 и cl.15 показал наличие остаточной активности в случае длительного ингибирования POX. Использование флуоресцентного аналога параоксона – параоксон-резорюфина (POX-R) подтвердило каталитический гидролиз фосфорорганического субстрата, с константами скорости реактивации  $1.0 \times 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$  и  $1.1 \times 10^{-4} \text{ сек}^{-1}$  для cl.14 и cl.15, соответственно, причем эффективность образования ковалентного комплекса для клона cl.14 была сравнима с ферментом дикого типа (WT) (Таблица 2).

**Таблица 2.** Кинетические константы реакции ферментов БуХЭ дикого типа (WT) и отобранных клонов cl.14, cl.15 и cl.19 с фосфорорганическими токсинами POX и GD<sub>C</sub>.

ФОТ	POX				GD <sub>C</sub>			
	WT	Отобранные клоны		Контроль	WT	Отобранные клоны		Контроль
БуХЭ		cl.14	cl.15	cl.19		cl.14	cl.19	cl.15
$k_1/K_i \times 10^{-1} \text{ с}^{-1}$	290±30	260±40	25±4	140±20	3±1	0.5±0.1	0.05±0.01	2.0±0.5
$k_2 \times 10^4, \text{ с}^{-1}$	-	1.0±0.1	1.1±0.1	-	-	-	-	-

Клон cl.19 устойчивый к GD<sub>C</sub>, не обладал каталитической активностью. Это может быть связано с описанным в литературе фактом быстрого «старения» ковалентных комплексов зомана ( $\tau_{1/2} < 1$  минуты) по сравнению с ковалентными комплексами параоксона ( $\tau_{1/2} = 8.6$  часов).

Таким образом, в результате проведения одного раунда селекции относительно небольшого репертуара мутантов БуХЭ были получены варианты фермента, обладающие новой, не характерной для БуХЭ, каталитической активностью по отношению к фосфорорганическому субстрату параоксон. 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.

### **3. Разработка технологии получения биокатализаторов пролонгированного действия.**

Для успешной реализации исследований по созданию и направленному изменению функциональной активности биокатализаторов важно учитывать, что одним из основных требований к биологическому терапевтическому препарату является необходимость его существования в организме в течение времени, достаточного для осуществления терапевтического действия. Для биокатализаторов терапевтического назначения это ситуация осложняется необходимостью сохранения каталитической активности в течение всего времени действия препарата. Таким образом, очевидно, что помимо разработки новых методов индукции каталитической активности и адаптации ее под заданный биокаталитический процесс, а также создания новых технологий поиска биокаталитической активности, необходима разработка способов обеспечения пролонгации терапевтического действия препаратов на основе биокатализаторов.

В качестве объекта исследований мы выбрали бутирилхолинэстеразу человека, как пример препарата биологического антидота, одобренного FDA, а также как фермент, на основе которого в рамках данной диссертационной работы мы получили каталитический антидот против отравления параоксоном.

Для решения этой задачи использовали две стратегии усиления терапевтического эффекта: (i) за счет химической модификации рекомбинантного фермента полисиаловой кислотой (ПСА) и (ii) за счет модификации экспрессионной системы фермента и создания БуХЭ исключительно в тетрамерной форме (4рчБуХЭ).

### ***3.1. Оптимизация фармакодинамических параметров рчбухэ химическим полисиалированием in vitro***

Для проведения химического полисиалирования рекомбинантной БуХЭ были созданы генетические конструкции для экспрессии гена фермента в клетках линии CHO-K1. В результате котрансфекции генетическими конструкциями рBudCE/EF/VChE (поколение G0) и рсDNA/EF/PRAD был получен клон А3 (поколение G1), который позволял получать до 30 мг/л активного фермента в олигомерной форме. Анализ кинетических констант реакции гидролиза специфического субстрата бутирилтиохолин йодида препаратами рчБуХЭ и БуХЭ из плазмы крови человека (пчБуХЭ) показал, что значения констант  $K_M$  и  $k_{cat}$  равны в пределах ошибки. Были определены фармакокинетические параметры выведения препарата рчБуХЭ из кровотока мыши после однократной инъекции в хвостовую вену. Рассчитанные значения периода полувыведения, периода полураспределения и среднее время удерживания препарата рчБуХЭ в крови (MRT), составили  $180 \pm 30$ ,  $4 \pm 1$  и  $220 \pm 50$ , соответственно. Как видно из полученных результатов препарат рчБуХЭ быстро выводится из кровотока, что делает нецелесообразным использование его в качестве профилактического антидота против отравлений ФОТ.

Для решения проблемы быстрого выведения фермента из кровотока был применен комбинаторный метод подбора условий химического полисиалирования (Рис. 18). Была использована окисленная полисиаловая кислота со средней молекулярной массой 27 кДа (ПСА27), которая реагировала с аминогруппами фермента через образование основания Шиффа, и последующим восстановлением цианборгидридом натрия.

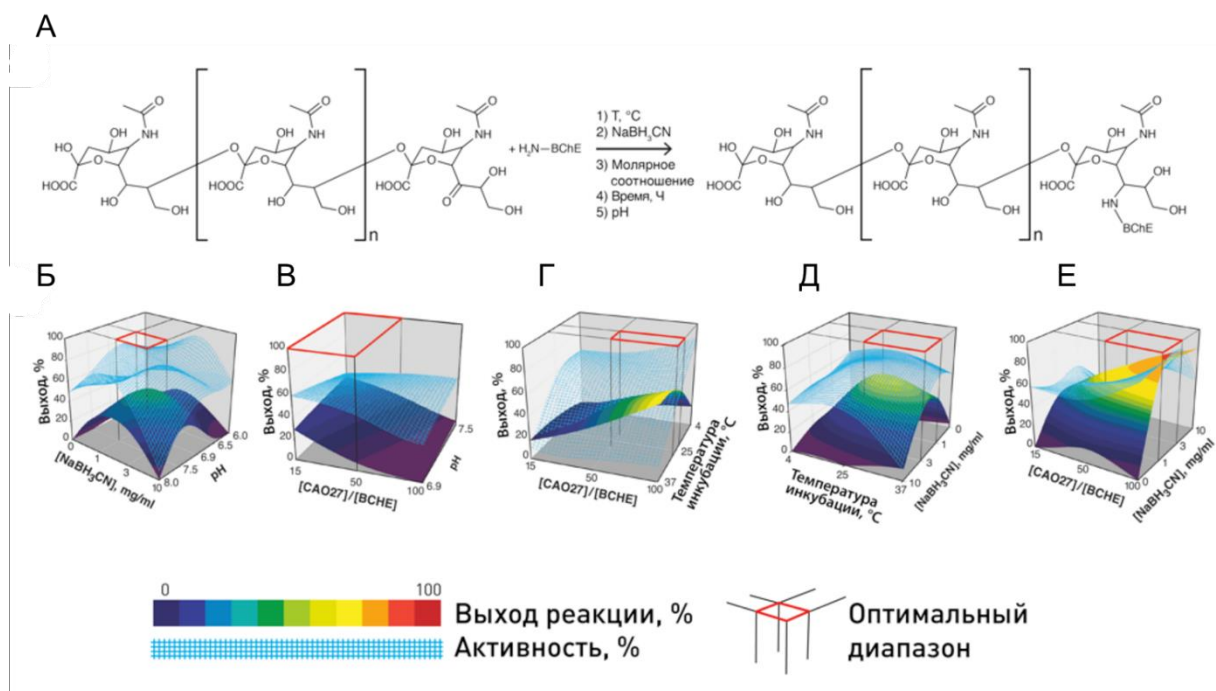


Рис. 18. Схема реакции химического полисиалирования рчБуХЭ (А) и поэтапный подбор оптимальных условий реакции химического полисиалирования. Остаточная активность и выход реакции изображены сетчатой и цветной плоскостями соответственно (Б-Е)

Для определения оптимальных условий реакции последовательно варьировались основные параметры реакции: рН, концентрация восстановителя  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , молекулярное соотношение рчБуХЭ:ПСА, температура и время реакции.

На основании результатов проведенных исследований (Рис. 18, Б-Е) были выбраны оптимальные условия модификации, позволяющие получать препарат БуХЭ с выходом не менее 80% и сохранением более чем 90% активности. Оптимальными условиями были: 0.1 М фосфатный буфер, рН=6.9, молярное соотношение рчБуХЭ:ПСА = 1:50, конечная концентрация восстановителя 3 мг/мл при времени реакции 16 часов и температуре +4°C.

Результаты исследования показали, что использование химического полисиалирования позволило увеличить время полувыведения препарата рчБуХЭ-ПСА27 в шесть раз по сравнению с препаратом немодифицированной рчБуХЭ. Значения параметров составили  $1000 \pm 140$ ,  $21 \pm 13$  и  $1400 \pm 200$  для периода полувыведения, периода полураспределения и MRT, соответственно.

Было определено, что препараты БуХЭ обладают высокой реакционной способностью по отношению к боевому отравляющему веществу – VR, которая практически не

зависит от типа используемого биокатализатора (Таблица 3). Этот факт стал основанием для изучения защитных свойств полученных препаратов БуХЭ при отравлении мышей ФОТ VR.

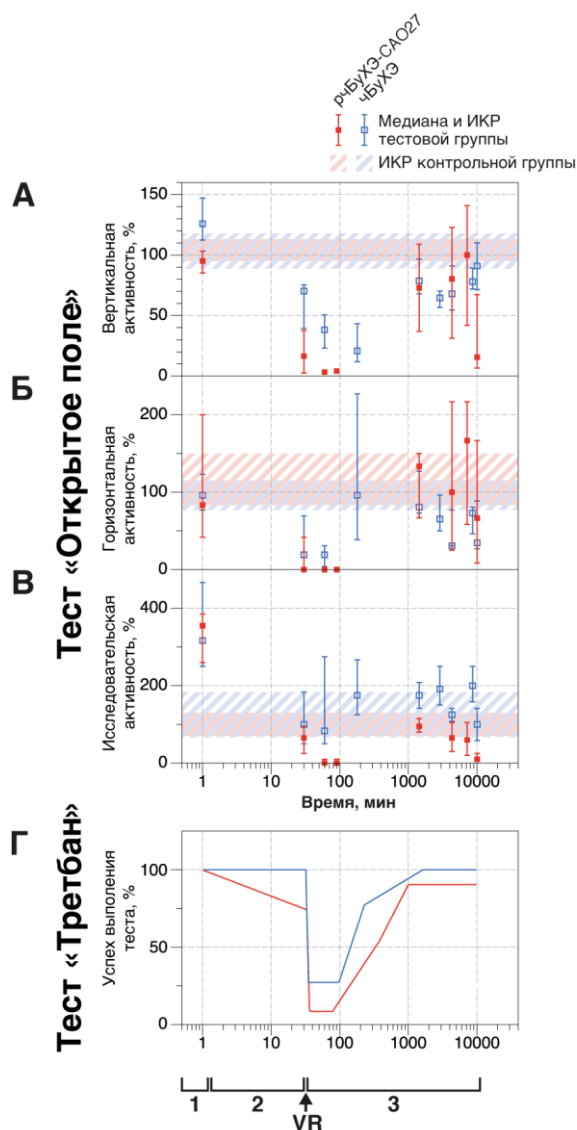
Биокатализатор	$k_1^{\text{набл}}$ , мМ×мин <sup>-1</sup>
рчБуХЭ	51000±4800
рчБуХЭ-ПСА27	60000±6000
пчБуХЭ	43200±4200

**Таблица 3.** Анализ бимолекулярной константы ингибирования препаратов рчБуХЭ, рчБуХЭ-ПСА27 и пчБуХЭ фосфорорганическим токсином VR.

Для определения защитного индекса препараты рчБуХЭ-ПСА27 и пчБуХЭ вводили в количестве 21 мг/кг, что соответствовала 5-ти кратному молярному избытку от концентрации LD50 агента VR (11.6 мкг/кг). Введение производили в хвостовую вену; через 30 минут после инъекции, внутримышечно вводили раствор VR в диапазоне от LD10 до LD100 (рабочие группы) или физиологический раствор (группа контроля). Животных наблюдали в течение пяти дней, оценивали их смертность и определяли защитный индекс (Таблица 4). Для выживших животных определяли возможные побочные эффекты в тесте «Открытое поле», изучали физическую выносливость в тесте на «тредбане». Значение защитного индекса препарата рчБуХЭ-ПСА27 составляет 4.2, что незначительно ниже аналогичного показателя для пчБуХЭ (4.7). Результаты наблюдений за поведением и физиологическим состоянием животных показали, что в течение первых трех часов после введения VR происходит значительный спад в активности животных всех исследуемых групп. Спустя 24 часа, все животные получившие дозу антидота независимо от ее типа (рчБуХЭ-ПСА27 или пчБуХЭ) восстанавливали свои показатели поведения (Рис. 19).

**Таблица 4.** Защитная эффективность препаратов рчБуХЭ-ПСА27 и пчБуХЭ по отношению к ФОТ VR.

Биокатализатор	LD <sub>50</sub> ×10 <sup>3</sup> , мг/кг)			Защитный индекс, LD <sub>50</sub> <sup>(Защищенные)</sup> / LD <sub>50</sub> <sup>(Контрольные)</sup>
	Среднее	95% доверительный интервал		
		Верхний предел	Нижний предел	
рчБуХЭ-ПСА27 (n=20)	79	69	90	4.2
пчБуХЭ (n=24)	89	80	100	4.7
Контроль (n=61)	19	18	20	-



**Рис. 19.** Анализ побочных эффектов при терапии отравления агентом VR препаратами рчБуХЭ-ПСА27 и пчБуХЭ. (А-В) Тест «Открытое поле». (Г) Испытание на физическую выносливость на «третбане». Наблюдение за испытуемыми животными проводили за 24 часа до введения препаратов рчБуХЭ-ПСА27 и пчБуХЭ (точка 1), непосредственно после введения препаратов (точка 2) и непосредственно после введения агента VR (точка 3). Медианное значение контрольной группы принимали за 100% во всех экспериментах, заштрихованные области соответствуют интерквартильному разбросу (ИКР) значений для контрольной группы.

Таким образом, можно утверждать, что химическое полисиалирование позволяет получить препарат, защитный индекс которого по отношению к VR лишь незначительно меньше защитного индекса препарата БуХЭ из плазмы крови человека. Внутривенное введение препаратов рчБуХЭ-ПСА27 и пчБуХЭ не приводит к значимым отклонениям в поведении испытуемых животных.

Полное восстановление показателей поведения испытуемых животных через 24 часа после отравления VR свидетельствует о том, что весь ФОТ был полностью инактивирован препаратами БуХЭ до того, как достиг своей биологической мишени.

На основании проведенных исследований доказано, что полученный препарат химически полисиалированной бутирилхолинэстеразы рчБуХЭ-ПСА27 безопасен для животных и удовлетворяет требованиям к биологическому антитоду. Для разработанного препарата полисиалированной БуХЭ был проведен комплекс доклинических исследований в рамках Государственного контракта № 13411.1008799.13.128 от 27.06.2013 г.



### **3.2. Улучшение фармакокинетических характеристик рчБуХЭ за счет ее продукции исключительно в виде тетрамера**

Как показали представленные выше результаты экспериментов, химическое полисиалирование рчБуХЭ, позволяет получить препарат с фармакокинетическими характеристиками и защитной эффективностью близкой к препарату природной пчБуХЭ. Тем не менее, у химического полисиалирования есть недостаток, связанный с относительно высокими расходами на получение окисленной формы полисиаловой кислоты, а также необходимостью дополнительной очистки получаемого конъюгата рчБуХЭ-ПСА. Альтернативной стратегией получения препарата пролонгированного действия является создание рчБуХЭ исключительно в тетрамерной форме – 4рчБуХЭ. Для решения задачи по получению 4рчБуХЭ с высоким уровнем продукции активного фермента была создана серия генетических конструкций нового поколения для эффективной экспрессии гена фермента и его тетрамеризации (Рис. 20).

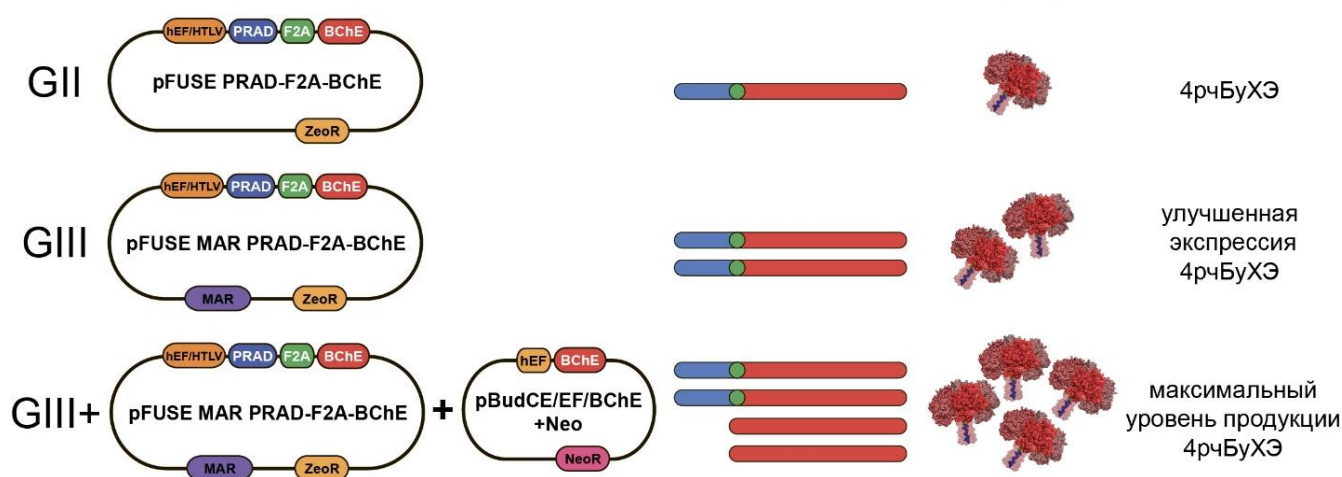
В результате для создания клона-продуцента 4рчБуХЭ – 11E11 была использована экспрессионная генетическая конструкция третьего поколения рFUSE-MARX-29-PRAD-F2A-BChE, основными элементами которой являлись:

- последовательность сильного синтетического промотора hEF/HTLV, последовательность «самопроцессирующегося» пептида F2A, обеспечивающая одновременную экспрессию гена БуХЭ и PRAD-пептида, участвующего в естественном процессе тетрамеризации 4рчБуХЭ, нуклеотидная последовательность связывания с ядерным матриксом (MAR X-29) и последовательность гена устойчивости к антибиотику зеоцин.

Комплекс тетрамерной 4рчБуХЭ состоит из четырех субъединиц рчБуХЭ и одной молекулы PRAD-пептида. Был предположено, что в экспрессионных конструкциях поколения GII и GIII, PRAD-пептид продуцируется в некотором избытке по отношению к ферменту, и введение дополнительной последовательности гена БуХЭ может привести к увеличению уровня продукции целевого фермента. Эта предположение было реализовано в поколении клонов-продуцентов GIII+, полученных счет трансфекции плазмидой рBudCE/EF/BChE+Neo клона-продуцента 11E11, имеющего максимальный уровень продукции БуХЭ.

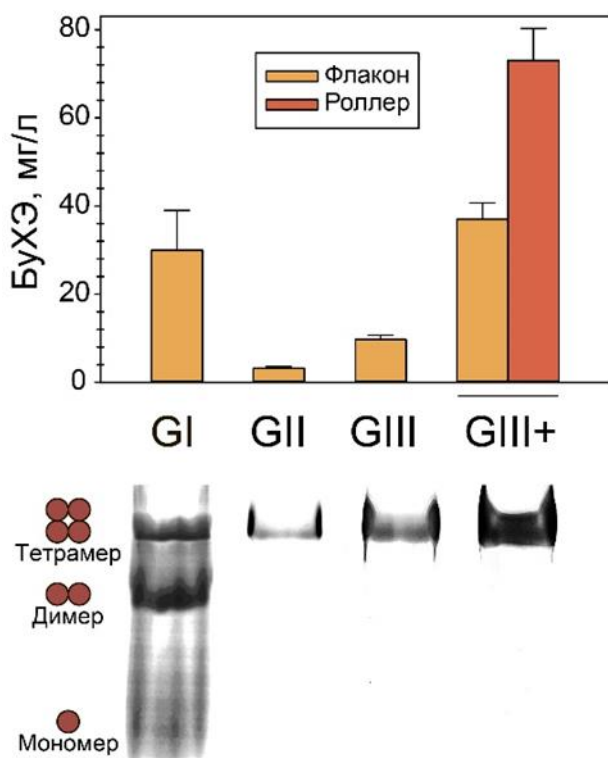
В результате трансфекции генетической конструкцией рFUSE-MARX-29-PRAD-F2A-BChE, содержащей последовательность сильного синтетического промотора hEF/HTLV, последовательность «самопроцессирующегося» пептида F2A,

обеспечивающая одновременную экспрессию гена БуХЭ и PRAD-пептида, участвующего в естественном процессе тетрамеризации 4рчБуХЭ, последовательность связывания с ядерным матриксом (MAR X-29) и последовательность гена устойчивости к антибиотику зеоцин, совместно с генетической конструкцией pBudCE/EF/BChE+Neo, несущей дополнительную копию гена БуХЭ и последовательность гена устойчивости к генетицину, был получен клон-суперпродуцент – «клон б», с уровнем продукции БуХЭ более 70 мг/л в исключительно тетрамерной форме (Рис. 21). В дальнейшем «клон б» был использован для препаративной наработки, выделения и очистки препарата 4рчБуХЭ для изучения его функциональных характеристик.



**Рис. 19.** Схема, иллюстрирующая основные принципы, заложенные в основу создания генетических конструкций нового поколения (GII, GIII и GIII+), обеспечивающих продукцию рчБуХЭ исключительно в естественной тетрамерной форме.

Для корректного сравнения, выбранных стратегий получения препаратов пролонгированного действия на основе БуХЭ, были проведены исследования фармакокинетических характеристик, профилей биodeградации и биораспределения препаратов немодифицированной рчБуХЭ, химически полисиалированного фермента рчБуХЭ-ПСА27 и тетрамерной 4рчБуХЭ, дополнительно была проведена оценка влияния химического полисиалирования на характеристики конъюгата 4рчБуХЭ-ПСА24.



**Рис. 21.** Уровень продукции клонов-продуцентов рчБуХЭ поколений GI, GII, GIII и GIII+, а также олигомерный состав рчБуХЭ, полученной с их помощью.

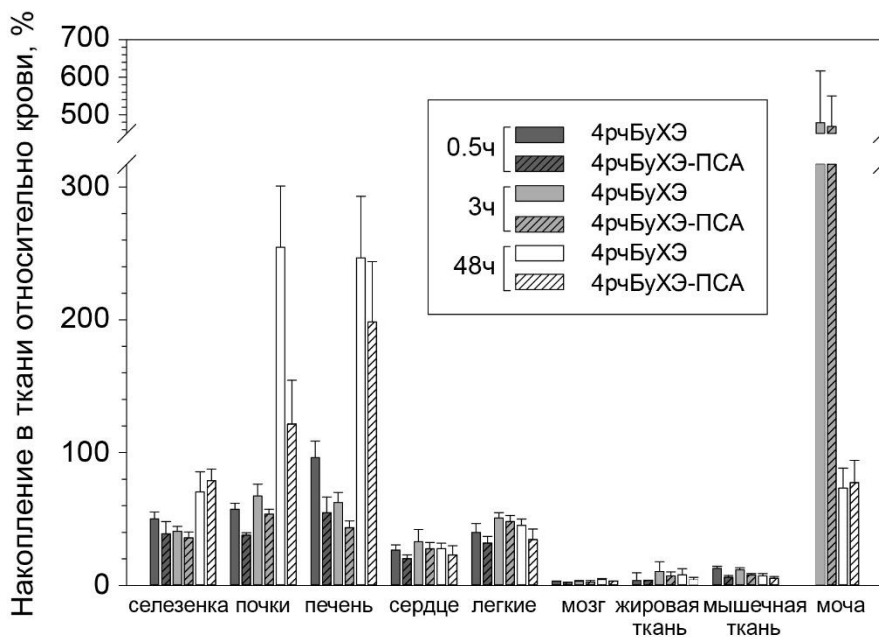
Как было отмечено ранее, практическое применение рчБуХЭ без модификации в значительной степени затруднено ввиду ее крайне быстрой элиминации из кровотока. Модификация полисиаловыми кислотами позволяет более чем в 5 раз повысить фармакокинетические характеристики рчБуХЭ (Таблица 5). В то же время 4рчБуХЭ обладает характеристиками более чем в 2 раза лучшими по сравнению с конъюгатом

рчБуХЭ-ПСА27, что делает ее лидером среди исследованных препаратов по продолжительности циркуляции в организме.

**Таблица 5.** Фармакокинетические характеристики препаратов рчБуХЭ, рчБуХЭ-ПСА27, 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА24.

Препарат	Фармакокинетические параметры		
	$t^{1/2}$ распр., ч	$t^{1/2}$ вывед., ч	MRT, ч
рчБуХЭ	0.2±0.1	3±1	3±1.6
рчБуХЭ-ПСА27	0.3±0.1	14±2	19±3
4рчБуХЭ	2.4±0.3	33±2	43±4
4рчБуХЭ-ПСА24	0.8±0.2	19±2	27±3

Для изучения влияния химического полисиалирования на профиль биораспределения и накопления препарата 4рчБуХЭ были проведены эксперименты с использованием препаратов, меченных радиоизотопом  $^{125}\text{I}$ . Препараты 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА24 вводили внутривенно и анализировали их накопление в различных тканях и органах через 0.5, 3 и 48 ч относительно соответствующей радиоактивности образцов крови (Рис. 22).



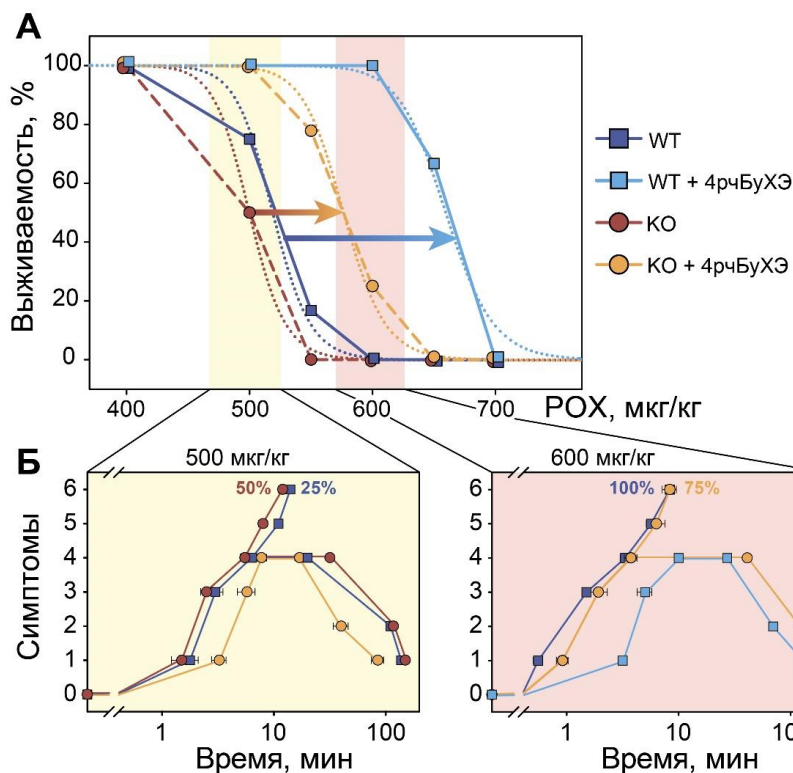
**Рис. 22.** Профили распределения препаратов 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА24, меченных  $^{125}\text{I}$ , по органам, полученные через 0,5, 3 и 48 ч после внутривенного введения. Специфическую радиоактивность определяли как отношение общей радиоактивности органа (в срм/вес органа в граммах) к общей радиоактивности крови (срм/мл крови для каждого интервала времени).

Было показано, что в течение первых 3 часов не наблюдается специфического накопления препаратов 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА24 в органах, однако происходит ярко выраженное выведение с мочой, по-видимому, связанное с продуктами биodeградации препаратов. Накопление препаратов в почках и печени происходит спустя 48 часов и значительно более выражено у 4рчБуХЭ. Как уже отмечено ранее, фармакокинетика выведения 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА24 крайне сходна в течение первых 24 часов, что проявляется также сходством профилей биораспределения. В то же время, спустя 48 часов фармакокинетические свойства 4рчБуХЭ лучше по сравнению с 4рчБуХЭ-ПСА24. По-видимому, это связано с более ярко выраженным накоплением 4рчБуХЭ в почках, что приводит к уменьшению скорости ее выведения. Наряду с этим можно отметить крайне низкую концентрацию препаратов рчБуХЭ в мозге, а также в жировой и мышечной ткани. Остаточная радиоактивность в этих тканях, по-видимому, связана с наличием кровеносных сосудов, что говорит об ограниченной способности к проникновению, характерной для препаратов БуХЭ.

Для демонстрации защитного действия 4рчБуХЭ использовали мышиную модель отравления ФОТ параоксоном. Несмотря на то, что уровень эндогенной БуХЭ не высок, тем не менее фермент может влиять на тяжесть отравления параоксоном, поэтому для дальнейших исследований защитных свойств 4рчБуХЭ были использованы мыши BALB/c (WT) и мыши, нокаутные по гену БуХЭ (KO). Как и ожидалось мыши, нокаутные по гену БуХЭ, демонстрировали большую чувствительность по отношению к отравлению параоксоном. Это отражалась в более низком значении LD50  $500 \pm 10$

мкг/кг (Рис. 23А) и более тяжелых симптомах отравления (Рис. 23Б). Внутривенное введение препарата 4рчБуХЭ в дозе 50 мг/кг приводило к увеличению LD50 как у нокаутных мышей (с  $500 \pm 10$  до  $580 \pm 20$  мкг/кг), так и у мышей дикого типа (с  $520 \pm 15$  до  $660 \pm 20$  мкг/кг) (Рис. 23А). Также было отмечено значительное снижение тяжести симптомов отравления нокаутных мышей и мышей дикого типа (Рис. 23Б). Внутривенное введение препарата 4рчБуХЭ в дозе 50 мг/кг, обеспечивало 100% и 78% выживаемость мышей дикого типа и нокаутных мышей, получивших абсолютно летальную дозу параоксона 600 мкг/кг ( $\approx 1,2$  LD50) и 550 мкг/кг ( $\approx 1,1$  LD50) соответственно.

Как было показано выше препарат 4рчБуХЭ практически не обнаруживается в мозге, что связано с невозможностью, в отличие от параоксона, преодоления гематоэнцефалического барьера. Поэтому даже несмотря на низкий уровень эндогенной БуХЭ в сравнении с количеством вводимого препарата 4рчБуХЭ, ее количества, ассоциированного с нейронами, оказывается достаточно для осуществления протективной функции при отравлении параоксоном. Это отражается в значительно большем сдвиге значения LD50 у мышей дикого типа (27% увеличение) в сравнении со значением LD50 у нокаутных мышей (16% увеличение) в результате терапии 4рчБуХЭ.



**Рис. 23.** (А) Выживаемость мышей дикого типа (WT), а также мышей, нокаутных по гену БуХЭ (КО), без терапии и с терапией 4рчБуХЭ. (Б) Тяжесть проявления симптомов отравления мышей, получивших РОХ в дозе 500 и 600 мкг/кг, во времени. 0 – отсутствие признаков; 1 – остановка двигательной активности и начало подъема в стойку после отравления; 3 – начало тремора; 2 – окончание тремора; 4 – проявление максимальных признаков отравления; 5 – кома; 6 – смерть.

Таким образом, использование препарата 4рчБуХЭ представляет более привлекательную альтернативу препаратам на основе модифицированной рчБуХЭ, так как

позволяет добиться более высоких фармакокинетических показателей, в сравнении с рчБуХЭ и рчБуХЭ-ПСА27. Биотехнологическое получение препарат 4рчБуХЭ аналогично рчБуХЭ и значительно более целесообразно экономически, чем получение конъюгата рчБуХЭ-ПСА27, поскольку отсутствуют стадия модификации (где используется 50-кратный избыток ПСА) и дополнительные стадии очистки. Неожиданно, что химическая модификация 4рчБуХЭ полисиаловыми кислотами в свою очередь не приводит к дальнейшему улучшению фармакокинетики 4рчБуХЭ-ПСА24, что может свидетельствовать о существовании дополнительных естественных механизмов стабилизации 4рчБуХЭ.

### **Заключение.**

Представленная диссертационная работа посвящена разработке новых принципов создания биокатализаторов с новыми функциональными активностями, а также созданию новых технологий направленного изменения биокаталитической активности.

В ходе выполнения диссертационной работы 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. В частности, использование этого подхода позволило получить первое каталитическое антитело, способное гидролизовать фосфорорганическое соединение параксон именно по механизму ковалентного катализа. Разработана и представлена новая, не имеющая аналогов в мире, технология направленного изменения активности биокатализаторов на основе антител с использованием квантово-механических расчетов реакций ими катализируемых, позволяющая создавать и проводить широкомасштабный скрининг виртуальных библиотек антител с целью направленного улучшения их функциональной активности. Был получен мутант L-S35R, который проявляет 170-кратное увеличение эффективности взаимодействия с фосфорорганическим пестицидом параксон в сравнении с исходным антителом A17. Создана платформа для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической активности в каплях двукратной микрофлюидной эмульсии. Высокая селективность и чувствительность платформы позволили детектировать различные типы активности, а также дискриминировать уровни одинаковой активности. С использованием разработанной платформы были

найжены новые каталитические антитоды на основе рчБуХЭ, способные к самореактивации при ингибировании пестицидом параоксон.

Представлены два независимых подхода к созданию препаратов пролонгированного действия на основе биокатализаторов. Впервые успешно осуществлено химическое полисиалирование гидролитического фермента с целью создания на его основе терапевтического препарата пролонгированного действия. Подобраны условия реакции, позволяющие получать конъюгат рчБуХЭ–ПСА27 с 80%-ным выходом. Применение химического полисиалирования существенно улучшило фармакокинетические параметры рекомбинантного фермента, увеличив время полувыведения модифицированной рчБуХЭ в 5.5 раз. Успешно проведены доклинические исследования препарата. Полисиалированный препарат показал высокую эффективность в качестве профилактического биологического антитода. Защитный индекс по веществу VR составил 4.2 ЛД50, что сопоставимо с препаратом БуХЭ плазмы крови человека. При реализации альтернативного подхода были получены новые экспрессионные конструкции для получения тетрамерной рекомбинантной БуХЭ (4рчБуХЭ) с уровнем продукции до 70 мг/л. Разработанная технология продукции 4рчБуХЭ является уникальной и не была реализована ни в одной лаборатории мира. Создание тетрамерной рчБуХЭ позволило увеличить время полувыведения препарата в 10 раз по сравнению с олигомерной рчБуХЭ и в 2 раза по сравнению с конъюгатом рчБуХЭ-ПСА27. Внутривенное введение препарата 4рчБуХЭ в дозе 50 мг/кг обеспечивало 100% и 75% выживаемость мышей WT и КО, получивших абсолютно летальную дозу РОХ 600 мкг/кг ( $\approx 1.2$  LD50) и 550 мкг/кг ( $\approx 1.1$  LD50), соответственно.

Результаты диссертации могут быть использованы для проведения фундаментальных исследований биокаталитических процессов, получения новых биокатализаторов на основе антител. Разработанная в ходе выполнения диссертационной работы меттехнология *in silico* созревания антител является универсальной. Она основана только на знании механизма каталитической реакции, которое и определяет дальнейшее направление поиска. Таким образом, она может быть применима к биокатализаторам любой природы. Представленная в работе технология высокопроизводительного скрининга биокаталитической активности может быть использована для поиска и новых ферментов без ограничения на механизм каталитической реакции. Метод также

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.

Степень достоверности результатов обеспечивается тем, что все экспериментальные работы выполнены на современном сертифицированном оборудовании, и с использованием самых современных методов генетической инженерии, молекулярной биологии, энзимологии и методов структурных исследований. Для решения задач по квантово-механическим расчетам использован суперкомпьютер «Ломоносов», которые располагается на 52-ом месте в рейтинге «ТОП 500» лучших суперкомпьютеров мира. Структурные исследования проводились при использовании возможностей двух лучших центров структурных исследований ESRF (г. Гренобль, Франция) и EMBL (г. Гамбург, Германия).

Очевидно и практическая значимость работы, в частности результаты, демонстрирующие значительное преимущество липосомальных композиций при индукции заданного гуморального ответа стали обоснованием проведения НИОКР «Доклинические исследования иммунобиологического средства пептидной природы для лечения ВИЧ инфекций», шифр «2.1.Пептид ВИЧ 2011» в рамках ГК № 11411.1008700.13.074 от 13.09.2011г. Проведенные доклинические исследования доказали высокий уровень специфической активности и безопасности разработанного липосомального препарата. Для разработанного препарата полисиалированной рчБуХЭ-ПСА27 также был проведен комплекс доклинических исследований в рамках Государственного контракта № 13411.1008799.13.128 от 27.06.2013 г.



### III. ВЫВОДЫ

1. Разработана технология квантово-механических расчетов химических реакций, катализируемых антителами, позволяющая создавать и проводить широкомасштабный скрининг виртуальных библиотек антител с целью направленного улучшения их функциональной активности. Получен мутант L-S35R, который проявляет 170-кратное увеличение эффективности взаимодействия с фосфорорганическим пестицидом параоксон по сравнению с исходным антителом A17.
2. Создана платформа для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической активности в каплях двойной микрофлюидной эмульсии. Высокая селективность и чувствительность платформы позволили детектировать различные типы активности, а также дискриминировать уровни одинаковой активности.
3. С использованием разработанной платформы были найдены новые каталитические антитела на основе рекомбинантной бутирилхолинэстеразы человека (рчБуХЭ), способные к самореактивации при ингибировании пестицидом параоксон.
4. Впервые успешно осуществлено химическое полисиалирование гидролитического фермента с целью создания на его основе терапевтического препарата пролонгированного действия. Применение химического полисиалирования существенно улучшило фармакокинетические параметры рекомбинантного фермента, увеличив время полувыведения модифицированной рчБуХЭ в 5,5 раз. Полисиалированный препарат показал высокую эффективность в качестве профилактического биологического антитела. Защитный индекс по веществу VR составил 4.2 ЛД50, что сопоставимо с препаратом БуХЭ плазмы крови человека. Успешно проведены доклинические исследования препарата.
5. Впервые были получены новые экспрессионные конструкции для получения олигомерно чистой 4рчБуХЭ с уровнем продукции до 70 мг/л. Создание тетрамерной рчБуХЭ позволило увеличить время полувыведения препарата в 10 раз по сравнению с олигомерной рчБуХЭ и в 2 раза по сравнению с конъюгатом рчБуХЭ-ПСА27. Внутривенное введение препарата 4рчБуХЭ в дозе 50 мг/кг обеспечивало 100% и 75% выживаемость мышей WT и КО, получивших абсолютно летальную дозу POX 600 мкг/кг ( $\approx 1.2$  LD50) и 550 мкг/кг ( $\approx 1.1$  LD50), соответственно.

#### IV. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

##### Статьи:

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., Gabibov A. Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. Editors Drauz K., Groeger H., May O. *Chapter 14. Catalytic antibodies.* Wiley-VCH, Weinheim, 2012.
3. Kurkova I, **Smirnov IV**, Belogurov AA Jr., Ponomarenko N, Reshetnyak A, Tramontano A, Gabibov A. Reactibody approach: Engineering and selecting variants with optimal chemical reactivity. *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons 2012.
4. **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.
5. Belogurov A Jr, **Smirnov I**, Ponomarenko N, Gabibov A. Antibody-antigen pair probed by combinatorial approach and rational design: bringing together structural insights, directed evolution, and novel functionality. *FEBS Lett.* 2012 Aug 31;586(18):2966-73. doi: 10.1016/j.febslet.2012.07.046. Epub 2012 Jul 25. Review.
6. Куркова И.Н., **Смирнов И.В.**, Белогуров мл. А.А., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г. Создание каталитических антител, метаболизирующих фосфорорганические молекулы. *Биохимия.* 2012. Т. 77. № 10. С. 1374-1382.
7. **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.
8. Terekhov SS, **Smirnov IV\***, Stepanova AV, Bobik TV, Mokrushina YA, Ponomarenko NA, Belogurov AA Jr, Rubtsova MP, Kartseva OV, Gomzikova MO, Moskovtsev AA, Bukatin AS, Dubina MV, Kostyukova ES, Babenko VV, Vakhitova MT, Manolov AI, Malakhova MV, Kornienko MA, Tyakht AV, Vanyushkina AA, Ilna EN, Masson P, Gabibov AG, Altman S.. A microfluidic droplet platform for ultrahigh-

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

9. 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 U S A*. 2013 Jan 22;110(4):1243-8. doi: 10.1073/pnas.1211118110. \* - **равнозначный вклад.**
10. **Smirnov I**, Carletti E, Kurkova I, Nachon F, Nicolet Y, Mitkevich VA, Débat H, Avalle 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.
11. Ponomarenko N, Chatziefthimiou SD, Kurkova I, Mokrushina Y, 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  $\kappa \rightarrow \lambda$  light-chain constant-domain switch in the structure and functionality of A17 reactibody. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2014 Mar;70(Pt 3):708-19.
12. 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. Nov;118:51-9. \* - **равнозначный вклад.**
13. 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.
14. Terekhov SS, **Smirnov IV\***, Shamborant OG, Bobik TV, Ilyushin DG, Murashev AN, Dyachenko IA, Palikov VA, Knorre VD, Belogurov AA, Ponomarenko NA, Kuzina

- ES, Genkin DD, Masson P, Gabibov AG. Chemical Polysialylation and In Vivo Tetramerization Improve Pharmacokinetic Characteristics of Recombinant Human Butyrylcholinesterase-Based Bioscavengers. *Acta Naturae*. 2015 Oct-Dec;7(4):136-41. \* - равнозначный вклад.
15. Terekhov SS, **Smirnov IV\***, Shamborant OG, Zenkova MA, Chernolovskaya EL, Gladkikh DV, Murashev AN, Dyachenko IA, Knorre VD, Belogurov AA, Ponomarenko NA, Deyev SM, Vlasov VV, Gabibov AG. Excessive Labeling Technique Provides a Highly Sensitive Fluorescent Probe for Real-time Monitoring of Biodegradation of Biopolymer Pharmaceuticals in vivo. *Acta Naturae*. 2014 Oct;6(4):54-9. \* - равнозначный вклад.
16. Ilyushin DG, Haertley OM, Bobik TV, Shamborant OG, Surina EA, Knorre VD, Masson P, **Smirnov IV**, Gabibov AG, Ponomarenko NA. Recombinant human butyrylcholinesterase as a new-age bioscavenger drug: development of the expression system. *Acta Naturae*. 2013 Jan;5(1):73-84.
17. Бобик Т.В., Шурдова Е.М., **Смирнов И.В.**, Пономаренко Н.А., Хурс Е.Н., Кнорре В.Д., Габибов А.Г. Генетическое конструирование нативных комбинаций цепей В-клеточных репертуаров на поверхности метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017. Т.163. №2. С. 231-236
18. Мокрушина Ю.А., Степанова А.В., Паликов В.А., Степанов А.В., Дьяченко И.А., Кнорре В.Д., **Смирнов И.В.**, Габибов А.Г. Исследование защитных свойств биологического антидота на основе антитела, метаболизирующего фосфорорганический пестицид параоксон. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017. Т.163. №2. С. 180-184
19. Мокрушина Ю.А., Степанова А.В., Бобик Т.В., **Смирнов И.В.**, Габибов А.Г.. Новые генетические конструкции для получения стабильных терапевтических антител к фосфорорганическим токсинам в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2016. Т. 161. № 1. С. 96-100.
20. Терехов С.С., Бобик Т.В., Мокрушина Ю.А., Степанова А.В., Александрова Н.М., **Смирнов И.В.**, Белогуров А.А., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г. Экспрес-

сия днк-кодируемого антидота к фосфорорганическим токсинам в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2016. Т. 52. № 2. С. 184-192.

21. Кузнецов Н.А., Козырь А.В., Дронина М.А., **Смирнов И.В.**, Калиберда Е.Н., Михайлова А.Г., Румш Л.Д., Фёдорова О.С., Габибов А.Г., Колесников А.В. Предстабионарная кинетика взаимодействия протеазы вируса иммунодефицита человека и ее мультрезистентного мутанта с ингибиторами i и ii поколений. *Доклады Академии наук*. 2011. Т. 440. № 6. С. 842-846.
22. Захаров А.В., **Смирнов И.В.**, Серебрякова М.В., Дронина М.А., Казначеева А.В., Куркова И.Н., Белогуров А.А., Friboulet A., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г., Бобик Т.В. Экспрессия каталитических антител в эукариотических системах. *Молекулярная биология*. 2011. Т. 45. № 1. С. 86-95.
23. Куркова И.Н., Решетняк А.В., Дурова О.М., Кнорре В.Д., Трамонтано А., Фрибуле А., Пономаренко Н.А., Габибов А.Г., **Смирнов И.В.** Антитела-антидоты для нейтрализации фосфорорганических соединений. *Доклады Академии наук*. 2009. Т. 425. № 4. С. 549-552.

#### **Опубликованные тезисы конференций и доклады:**

1. Smirnov I.V., Ilyushin D.G., Durova O.M., Kurkova I.N., Masson P., Ponomarenko N.A. and Gabibov A.G. Biological scavengers of organophosphorous poisons. August 2-7, 2009, Shanghai, China. The 21st IUBMB.
2. Смирнов И.В. Рекомбинантные антидоты фосфорорганических веществ. Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Российская Федерация, Москва, 117997, ул. Миклухо-Маклая, 16/10. Биотехнологический конгресс. 2009.
3. Смирнов И.В., Илюшин Д.Г., Массон П.\*, Пономаренко Н.А., Габибов А.Г. Разработка биологических антидотов против фосфорорганических токсинов на основе рекомбинантной бутирилхолинэстеразы. «БИОФАРМА 2010. ОТ НАУКИ К ПРОМЫШЛЕННОСТИ». 2010 г. Ереван, Армения.
4. Smirnov IV, Kurkova IN, Carletti E, Masson P, Belogurov AA Jr, Ponomarenko NA, Tramontano A, Friboulet A, Gabibov AG. Antibodies – Antidotes toward chemical

- weapons: promiscuity of catalytic sites. "Early events in Human Pathologies". 2010. Barbizon, France.
5. Smirnov IV, Kurkova IN, Carletti E, Masson P, Belogurov AA Jr, Ponomarenko NA, Tramontano A, Friboulet A, Gabibov AG. Promiscuity of binding/catalysis of antibodies – antidotes toward chemical weapons. 2010: 35th FEBS Congress. Gothenburg, Sweden, 26 June – 1 July 2010
  6. Ivan Smirnov, Eugénie Carletti, Inna Kurkova, Florian Nachon, Yvain Nicolet, Vladimir Mitkevich, H el ene D ebat, B erang ere Avasse, Alexey Belogurov Jr., Nikita Kuznetsov, Andrey Reshetnyak, Patrick Masson, Alexander Tonevitsky, Natalia Ponomarenko, Alexander A. Makarov, Alain Friboulet, Alfonso Tramontano, Alexander Gabibov. Chemically selected Immunoglobulin-variable domain with enzyme-like active site poised for covalent catalysis. 2011: 36th FEBS Congress. Biochemistry for Tomorrow's Medicine, Torino, Italy, 25–30 June 2011
  7. И.В. Смирнов, А.Г. Габибов. Биокаталитические механизмы деградации фосфорорганических соединений. «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова». Москва, 14-17 ноября 2011 г.
  8. Smirnov IV, Carletti E, Kurkova IN, Mitkevich V, Belogurov AA Jr., Kuznetsov N, Reshetnyak A, Masson P, Ponomarenko N, Friboulet A, Tramontano A, Gabibov AG. Antibody - encoded primitive active site mediates the conversion of organophosphorus compounds via covalent catalysis. 37th FEBS Congress. Sevilla, Spain, September 4th - 9th, 2012.
  9. Смирнов И.В. Биологические антитоды пролонгированного действия для терапии интоксикаций фосфорорганическими соединениями. Постгеном-2012, 22-24 ноября, 2012. Казань, Россия.
  10. I. Smirnov, A. Stepanova, A. Golovin, N. Ponomarenko and A. Gabibov. «Evolution of a reactibody by combined natural and computational methods». 38th FEBS Congress. Saint-Petersburg. FEBS Journal 280 (Suppl. 1) 106. 2013
  11. I. Smirnov, A. Stepanova, S. Terekhov, A. Golovin, Y. Mokrushina, A. Belogurov, N. Ponomarenko, A. Gabibov. «Combined in vitro and in silico evolution of the organophosphate metabolizing reactibody A17». 39th FEBS Congress. Paris. FEBS Journal 281 (Suppl. 1) 605. 2014

## Патенты:

1. Патент Российской Федерации № 2392282 «СПОСОБ ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРФЕРОНА -1b», дата приоритета 06.10.2008, дата публикации 20.06.2010
2. Патент Российской Федерации № 2426787 «РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДНАЯ ДНК pET32M/mTrx - rhIL - 11, КОДИРУЮЩАЯ ИНТЕРЛЕЙКИН - 11 ЧЕЛОВЕКА, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ШТАММ Escherichia coli VL21(DE3)/pET32M/mTrx - rhIL - 11 - ПРОДУЦЕНТ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА - 11», дата приоритета 18.06.2009, дата публикации 20.08.2011
3. Патент Российской Федерации № 2429008 «СПОСОБ ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА VIIa ЧЕЛОВЕКА», дата приоритета 22.09.2010, дата публикации 20.09.2011