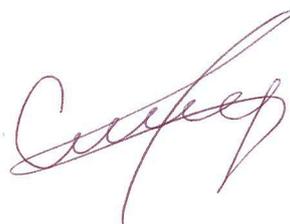


Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук



На правах рукописи

Смирнов Иван Витальевич

**НАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ  
БИОКАТАЛИЗАТОРОВ**

Специальность 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени

Доктора химических наук

Москва – 2017

# Оглавление

Список сокращений .....	4
Введение. ....	7
Литературный обзор. ....	9
1. ИСКУССТВЕННЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ. ....	9
1.1. ИНЖЕНЕРИЯ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ. ....	9
1.2. ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ. ....	12
2. ИСКУССТВЕННЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ. ....	14
2.1. КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, ПОЛУЧАЕМЫЕ ИММУНИЗАЦИЕЙ АНАЛОГАМИ ПЕРЕХОДНЫХ СОСТОЯНИЙ. ....	15
2.2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИЙ ИЛИ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ОСТАТКОВ. ....	20
2.3. СОЗДАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИ НЕВЫГОДНЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ. ....	21
2.4. АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА. ....	22
2.5. ПОЛУЧЕНИЕ АБЗИМОВ ПУТЕМ РЕАКЦИОННОЙ ИММУНИЗАЦИИ. ....	24
2.6. АБЗИМЫ, СОДЕРЖАЩИЕ КОФАКТОРЫ. ....	25
2.7. ГРАНИЦЫ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ИНДУЦИРОВАННЫХ АБЗИМОВ. ....	26
3. МЕТОДЫ НАПРАВЛЕННОЙ ЭВОЛЮЦИИ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ. ....	27
3.1. МЕТОДЫ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО СКРИНИНГА ФЕРМЕНТОВ, ИСПОЛЬЗУЯ КЛЕТОЧНЫЕ ИЛИ ФАГ-ДИСПЛЕЙНЫЕ БИБЛИОТЕКИ. ....	28
Компартментализация <i>in vitro</i> . ....	31
Компартментализация <i>in vitro</i> в двойных эмульсиях. ....	32
Микрофлюидная компартментализация. ....	34
3.2. РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН, КАК СРЕДСТВО УЛУЧШЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ. ....	35
Рациональный дизайн на основе экспериментальных данных. ....	35
Рациональный дизайн на основе компьютерных методов. ....	38
3.3. НАПРАВЛЕННОЕ УЛУЧШЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ. ....	39
Создание ферментов <i>de novo</i> . ....	39
Направленное улучшение функциональных свойств антител. ....	43
4. БИОЛОГИЧЕСКИЕ АНТИДОТЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОТРАВЛЕНИЙ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ ТОКСИНАМИ .....	44
4.1. КОНЦЕПЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО АНТИДОТА .....	44
4.2. КАНДИДАТЫ НА РОЛЬ СТЕХИОМЕТРИЧЕСКОГО АНТИДОТА. ....	45
Ацетилхолинэстераза .....	45
Параоксоназа .....	46
Антитела к ФОТ .....	47
Бутирилхолинэстераза .....	48
5. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА .....	48
5.1. СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА. ....	49
5.2. ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕКОМБИНАНТНОЙ БУХЭ .....	51
Материалы и методы. ....	55
Химические реактивы и сопутствующие материалы. ....	55
Методы работы с нуклеиновыми кислотами .....	58

Методы работы с бактериями <i>E. coli</i> .....	68
Методы работы с дрожжами <i>Pichia pastoris</i> .....	69
Методы работы с клетками линии CHO-K1, NS0 и FreeStyle™ 293-F .....	71
Методы работы с белками .....	74
Методы работы с животными .....	85
Микрофлюидная платформа для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и антимикробной активности .....	88
Расчетные методы .....	91
<b>Результаты и обсуждение .....</b>	<b>94</b>
<b>1. Разработка технологий получения биокатализаторов на основе антител.....</b>	<b>94</b>
1.1. ПОЛУЧЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ И НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ПОВЕРХНОСТНОМУ ГЛИКОПРОТЕИНУ ВИЧ-1 GP120. ....	94
1.2. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ «РЕАКТИБОДИ» - АНТИТЕЛ, ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К КОВАЛЕНТНОМУ КАТАЛИЗУ .....	104
1.3. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ КВАНТОВО-МЕХАНИЧЕСКИХ/МОЛЕКУЛЯРНО-МЕХАНИЧЕСКИХ РАСЧЕТОВ ДЛЯ ИСКУССТВЕННОГО «СОЗРЕВАНИЯ» АНТИТЕЛ. ....	123
<b>2. Разработка микрофлюидной технологии высокопроизводительного скрининга биокаталитической активности в каплях двойной эмульсии. ....</b>	<b>142</b>
2.1. СКРИНИНГ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В КАПЛЯХ МИКРОФЛЮИДНОЙ ДВОЙНОЙ ЭМУЛЬСИИ .....	147
2.2. ОТБОР МУТАНТОВ БУХЭ, УСТОЙЧИВЫХ К ДЕЙСТВИЮ ФОТ .....	156
<b>3. Разработка технологии получения биокатализаторов пролонгированного действия. ....</b>	<b>160</b>
3.1. ОПТИМИЗАЦИЯ ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ рчБУХЭ ХИМИЧЕСКИМ ПОЛИСИАЛИРОВАНИЕМ IN VITRO .....	165
3.2. УЛУЧШЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК рчБУХЭ ЗА СЧЕТ ЕЕ ПРОДУКЦИИ ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО В ВИДЕ ТЕТРАМЕРА.....	172
<b>Заключение.....</b>	<b>182</b>
<b>Выводы. ....</b>	<b>184</b>
<b>Список литературы. ....</b>	<b>185</b>

## Список сокращений

- АцХЭ – ацетилхолинэстераза человека
- БуХЭ – бутирилхолинэстераза
- рчБуХЭ – рекомбинантная бутирилхолинэстераза человека
- 4рчБуХЭ – тетрамерная рчБуХЭ
- 4рчБуХЭ-sCy7 OFF – конъюгат флуоресцентно-меченой 4рчБуХЭ, с высокой степенью модификации, демонстрирующий эффект самотушения sCy7
- 4рчБуХЭ-sCy7 ON – конъюгат флуоресцентно-меченой 4рчБуХЭ, с низкой степенью модификации, без эффекта самотушения sCy7
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДНКза – дезоксирибонуклеаза I
- ДСН – додецилсульфат натрия
- ИПТГ – изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид
- кДа – тысяча атомных единиц массы
- КОЕ – колониеобразующие единицы
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- МДЭ – микрофлюидная двойная эмульсия
- МИК – минимальная ингибирующая концентрация
- МС – масс-спектрометрия
- ОЕ – единицы оптической плотности
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ПСА – окисленные полисиаловые кислоты
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- САПР – система автоматизированного проектирования
- Трис – 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол
- УМИ – уникальный молекулярный идентификатор
- ФОТ – фосфорорганические токсины
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- ЭК – энтеропептидаза (энтерокиназа)
- ЯМР – спектрометрия ядерного магнитного резонанса
- VChE – ген чБуХЭ

BTC – бутирилтиохолина йодид  
CBDP – 2-(*орто*-крезил)-4Н-1:3:2-бензодиоксафосфорин-2-оксид  
ChIP-seq – иммунопреципитация хроматина с последующим секвенированием  
CMV – промотор цитомегаловируса  
sCy5 – сульфо-цианин 5  
sCy7 – сульфо-цианин 7  
ddPCR – капельная цифровая полимеразная цепная реакция  
DTNB – дитио-5,5-бис(2-нитробензойная кислота)  
Fab – участок связывания антигена (фрагмент антитела)  
FACS – флуоресцентно-активированный клеточный сортинг  
FAM – 6-флуоресцеина фосфорамидит  
**FRET – ферстеровский резонансный перенос энергии**  
**F2A-пептид – самопроцессирующий пептид вируса ящура**  
GDc – кумариновый аналог зомана  
GFP – зеленый флуоресцентный белок  
IgG – иммуноглобулины класса G  
KO – нокаут гена  
 $k_{cat}$  – каталитическая константа  
 $K_M$  – константа Михаэлиса  
 $k_1/K_i$  – константа скорости бимолекулярного ингибирования  
 $k_2$  – константа скорости самореактивации  
LD<sub>50</sub> – полулетальная доза  
 $\lambda$  – степень заполнения  
 $\lambda_{ex}$  – длина волны возбуждения флуоресценции  
 $\lambda_{em}$  – длина волны испускания флуоресценции  
MAR – последовательность связывания с ядерным матриксом  
MQ – вода особой чистоты из установки Milli-Q (Millipore, США)  
MRT – среднее время удержания  
NHS – N-гидроксисукцинимид  
PBS – натрий-фосфатный буфер  
PDMS – полидиметилсилоксан  
POX – параоксон

POX-R – параоксон-резорфин

PRAD – пролин-богатая последовательность связывания (тетрамеризации)

RFU – относительные единицы флуоресценции

RTQ1 – гаситель флуоресценции с диапазоном гашения 470-570 нм

SELEX – систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением

SLUDGE – синдром с симптомами слюноотделения, слезотечения, мочеиспускания, потоотделения, расстройства кишечника и рвоты

TBE – Трис-боратный буфер

TE – буфер Трис-ЭДТА

$\tau_{1/2}$  – период полураспада или полувыведения

$\tau_{1/2 \text{ вывед.}}$  – период полувыведения

$\tau_{1/2 \text{ распр.}}$  – период полураспределения

VR – S-диэтиламиноэтиловый, O-2-метилпропиловый эфир метилтиофосфоновой кислоты

WT – дикий тип

16S рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота, компонент малой субъединицы рибосомы прокариот

## Введение.

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 играют одну из ведущих ролей. Разработаны способы получения антител фармацевтического назначения и существует большое количество лекарственных препаратов на основе антител. 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 биологическим молекулам. Строение молекулы антитела, в котором строго определена часть молекулы ответственная за осуществление функции – гипервариабельные петли – вариабельного домена антитела совместно с технологией рекомбинантных антител делает иммуноглобулины 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 биохимические механизмы передачи нервного импульса. Таким образом, разработка способов создания биокатализаторов, способных к ковалентному катализу, является актуальной задачей не только фундаментальной энзимологии, где решение такой задачи позволит понять пути эволюционного развития биокаталитических функций, но и прикладной биохимии и молекулярной медицины.

Использование библиотек генов антител имеет 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 ограничены методами отбора, что сужает размеры библиотеки, а также не позволяют 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 необходимого 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 новым принципам создания биокатализаторов с новыми функциональными активностями, и результаты полученные в ходе ее выполнения решают все упомянутые выше задачи фундаментального и прикладного характера.

# Литературный обзор.

## 1. ИСКУССТВЕННЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ.

Каталитические реакции регулируют жизненно важные процессы и происходят при участии эволюционно совершенных биокатализаторов – ферментов. Разработка подходов к созданию искусственных ферментов, осуществляющих ковалентный катализ, является фундаментальной задачей современной энзимологии и биохимии. Решение такой задачи внесет свой вклад в понимание пути эволюции биокаталитической функции. Создание искусственных биокатализаторов имеет очевидное практическое применение в медицине и биотехнологии. Исследование искусственных биокатализаторов позволило определить механизмы реакций, протекающих в живых системах [1], и даже создать ферменты, которые не имеют природных аналогов [2, 3].

### 1.1. ИНЖЕНЕРИЯ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ.

С развитием современных методов геной и белковой инженерии, компьютерного моделирования и протеомики, дизайн новых биокатализаторов, становится все более успешным. Благодаря возможности предсказывать влияния изменения первичной последовательности белка на его структуру и функции, открываются широкие перспективы создания биокатализаторов заданной специфичности [4-7].

На примере ферментов циклофилин был превращен и ципраза 1 была продемонстрирована принципиальная возможность изменения их каталитических функций [8, 9]. Цис-транс изомераза X-Pro пептидной связи – циклофилин был превращен в ципразу 1, эндопептидазу, способную расщеплять N-концевую пептидную связь остатка пролина [9]. На основании анализа структуры были введены мутации, расположенные в непосредственной близости от участка, связывающего пептид, что привело к образованию каталитической триады, похожей на триаду сериновых протеаз. В результате, удалось сохранить специфичность к пролиновым пептидам и одновременно индуцировать протеолитическую активность.

Для трансформации некаталитического белка тиоредоксина в фермент эстеразу в лаборатории Болон и Майо использовали компьютерное моделирование [10]. Был введен остаток гистидина в структуру тиоредоксина, для того чтобы обеспечить нуклеофильную атаку по карбонильному атому углерода субстрата *n*-нитрофенил ацетата за счет имидазольной группы гистидина. В итоге, был получен фермент, гидролизующий *n*-нитрофенил ацетат с ускорением реакции в 180 раз в сравнении со спонтанным гидролизом.

Луугер с соавторами смогли превратить РСР – периплазматический рецептор, связывающий рибозу, в триозофосфатизомеразу (ТФИ) [11]. Триозофосфатизомераза является одним из основных компонентов цикла Эмбдена-Меергофа и осуществляет превращение диоксиацетонфосфата (ДГАФ) в D-глицеральдегид-3-фосфата (ГАФ) и обратно. Для этого авторы, опираясь на разработанный алгоритм DEE [12], позволяющий изменить специфичность связывания рецептора предсказали мутации, превратившие рецептор РСР в рецептор связывающий ДГАФ [13]. Таким образом, были найдены аналоги РСР, способные с высокой аффинностью связывать ДГАФ и ГАФ, но не проявляющие триозофосфатизомеразной активности. Дальнейшая оптимизация позволила получить термостабильный белок, который ускорял реакцию изомеризации более чем в 1 млн. раз по сравнению со спонтанной реакцией изомеризации.

Другим примером создания новой биокаталитической активности с помощью методов компьютерного расчета является использование гибридного КМ/ММ подхода для создания вариантов ферментов с новой каталитической активностью по отношению к субстрату. Техника молекулярного докинга позволяет определить аминокислоты, ответственные за связывание лиганда, и типы молекулярных взаимодействий, которые играют критическую роль для процесса реакции. Определенные таким образом аминокислотные остатки являются потенциальными мишенями для сайт-направленного мутагенеза. Молекулярный докинг часто используется для рационального дизайна ферментов. Программы для докинга симулируют как целевая макромолекула (фермент, рецептор, нуклеиновые кислоты) взаимодействуют с маленькими молекулами лигандов (субстраты, ингибиторы). Более успешной является комбинация молекулярного докинга и молекулярной динамики (МД). Преимущество этой комбинации заключается в том, что методы дополняют друг друга: молекулярный докинг используется для того, чтобы найти правильную конформацию лиганда, а затем МД применяется для оптимизации сложных структур.

Этот метод был успешно использован в работе [14] при редизайне бутирилхолинэстеразы (БуХЭ) в качестве анти-кокаинового препарата. Для рационального дизайна вариантов ферментов с новой каталитической активностью по отношению к субстрату, необходимо спроектировать мутацию, которая может ускорить лимитирующую стадию всего каталитического процесса, в то время как другие стадии реакции не будут замедлены. Молекулярная динамика была использована для симуляции образования переходного состояния для первой стадии реакции гидролиза (-)-кокаина бутирилхолинэстеразой и ее мутантами. Результаты моделирования показали, что процессы образования водородных связей между карбонильным кислородом бензоильного

эфира (-)-кокаина и оксианионной полостью БуХЭ являются скорость-лимитирующими для первого переходного состояния и могут быть ускорены за счет мутаций A199S/S287G/A328W/Y332G. Таким образом, симуляция переходного состояния предсказала, что этот мутант должен обладать значительно более низким энергетическим барьером и, вследствие этого, более высокой каталитической эффективностью гидролиза (-)-кокаина. Теоретические предсказания были подтверждены с помощью экспериментальных данных, которые показали увеличение активности мутанта в 456 раз по сравнению с диким типом. Однако, даже если бы этот мутант прошел клинические испытания, использование его в качестве лекарства при отравлениях (-)-кокаином крайне маловероятно – из-за необходимости использования высокой дозы БуХЭ (5 мг/кг) для защиты от летальной дозы кокаина. Основываясь на предыдущих исследованиях, говорящих о том, что каталитическая эффективность БуХЭ или ее мутантов коррелирует с силой водородных связей между кокаином и ферментом, авторы предположили, что мутации аминокислот, не находящиеся в активном центре, могут влиять на водородные связи и тем самым влиять на каталитическую активность фермента [15]. Авторы использовали полученный ранее в работе [14] мутант БуХЭ в качестве стартовой точки для дальнейших улучшений с помощью гибридных КМ/ММ расчетов. Была создана виртуальная библиотека, состоящая из одной, двух или трех замен аминокислот, находящихся на расстоянии 20 Å от субстрата, связанного мутантом. Размер библиотеки составил  $6,7 \times 10^4$  вариантов. Для всех вариантов была определена энергия образования водородных связей. Наибольшей энергией обладал мутант A199S/F227A/P285A/S287G/A328W/Y332G. Экспериментальные данные показали, что его каталитическая эффективность по отношению к (-)-кокаину оказалась в 4500 раз выше, чем в случае БуХЭ дикого типа. Новые мутации не внесли дополнительных водородных связей, однако они не в прямую влияют на существующие водородные связи, тем самым стабилизируя переходное состояние и улучшая каталитическую активность. Полученные результаты позволили снизить терапевтическую дозу антидота до 150 мкг/кг, что обеспечило защиту от летальной дозы кокаина (180 мг/кг).

Металл-зависимые протеазы катализируют важные биологические процессы, такие как фотосинтез, дыхание, молекулярное восстановление кислорода, фиксация азота и другие [16]. В работе [17] с помощью программы RosettaMatch был разработан метод для изменения реактивности функциональных групп активного сайта металл-зависимой протеазы аденозиндеаминазы, в результате чего была получена цинк-содержащая аденозиндеаминаза, стереоселективно катализирующая гидролиз P(R) изомера кумаринового аналога циклозарина в  $10^7$  раз эффективнее, чем фермент дикого типа.

## 1.2. ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОЕ ИЗМЕНЕНИЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ.

Выше были описаны примеры создания ферментов *de novo*, основанные на знании строения ферментов. Однако, не всегда возможно предсказать, как нужно изменить первичную структуру белка для того, чтобы придать ему заданную функцию. Одним из направлений современной инженерии биокатализаторов является область направленной эволюции ферментов - “directed evolution of enzymes” [18-20].

Направленная эволюция ферментов – это метод, используемый в белковой инженерии, который имитирует процесс естественного отбора белков. Но, в отличие от естественной эволюции, направленная эволюция является более избирательным методом, который имеет определенную цель, ограничен во времени и контролируется исследователем, то есть это по сути искусственная эволюция, хотя ее ключевые стадии (мутация, рекомбинация и скрининг) имитируют естественно протекающие в природе процессы. Эксперименты по направленной эволюции состоят из двух основных шагов: во-первых, создание генетического разнообразия в целевом гене в виде геномной библиотеки, и во-вторых, эффективная селекция из библиотеки для получения желаемой каталитической активности. Однако зачастую обычный размер библиотеки на много порядков больше, чем может быть подвергнуто скринингу существующими методами отбора. Поэтому необходимы новые технологии высоко-эффективного скрининга или селекции на интересующую активность.

Как правило, под “скринингом” подразумевают поиск интересующих ферментов среди небольшого числа (несколько тысяч) индивидуальных клонов, то есть скрининг выполняется на отдельных генах или клонах и требует некоторой пространственной организации скринируемых вариантов на чашках с агаром, микротитрационных планшетах, матрицах или чипах. Термин “селекция” подразумевает под собой более эффективные методы поиска интересующей активности с использованием библиотек с высокой представительностью (более  $10^7$  клонов). Проведение селекции или скрининга должно соответствовать некоторым требованиям. Оно должно быть непосредственно направлено на интересующее свойство – “вы получаете то, на что вы проводите отбор”, это первое правило направленной эволюции. Таким образом, субстрат для отбора должен быть настолько идентичным, насколько это возможно, целевому субстрату. На первых раундах селекции отбираются все улучшенные варианты, включая те, которые проявляют лишь незначительное улучшение активности. На следующих раундах должны быть применены более жесткие условия для обеспечения отбора лучших вариантов.

Библиотеки мутантов ферментов могут быть созданы с применением таких методов, как:

1. **“ошибочный” ПЦР (error prone PCR)** – введение ошибок в ДНК путем неточного ПЦР. Точность полимеразы регулируется за счет варьирования состава реакционного буфера, например, изменение концентрации ионов  $Mn^{2+}$  или  $Mg^{2+}$  приводит к снижению точности синтеза комплементарной нити ДНК.

2. **кассетный мутагенез.** Метод заключается в том, что из гена, клонированного в составе векторной плазмиды, по двум близко расположенным уникальным сайтам рестрикции вырезается фрагмент ДНК, в который необходимо внести мутации, и на его место встраивается синтетический двухцепочечный олигонуклеотид, содержащий необходимые замены нуклеотидов (кассету мутаций). Если в окрестностях мутируемого локуса гена отсутствуют подходящие природные сайты рестрикции, их вводят с помощью направленного мутагенеза. Использование на определенных этапах синтеза вместо одного нуклеотида смеси из нескольких дезоксирибонуклеозидтрифосфатов позволяет получать за один прием сложную смесь олигонуклеотидов, которые могут содержать в определенных сайтах наборы кодонов для многих аминокислот. Это дает возможность осуществлять одновременный скрининг по искомому мутантному фенотипу из большого числа разных мутантных клонов.

3. **«перетасовка» ДНК сегментов (DNA shuffling).** Метод заключается в том, что гены обрабатывают ДНКазой или эндонуклеазами рестрикции, в результате чего получаются фрагменты ДНК длиной около 50-100 нуклеотидов. После этого методом ПЦР без добавления праймеров, ДНК-фрагменты с достаточной степенью перекрытия отжигаются, а затем происходит элонгация с помощью ДНК-полимеразы. Несколько раундов ПЦР приводит к тому, что некоторые молекулы ДНК достигают размера родительских генов. Эти гены могут быть амплифицированы с помощью праймеров, комплементарных концам нитей.

4. **протокол ступенчатого удлинения (staggered extension protocol).** Методика представляет собой модифицированный метод ПЦР с очень короткими (примерно 10 секунд) циклами. В этих циклах удлинение ДНК происходит очень быстро (всего на несколько сотен пар оснований), далее синтезированные фрагменты отжигаются на комплементарных фрагментах других нитей. Таким образом, мутации в начальном гене перемешиваются и, используя этот метод, можно получить гены с новой комбинацией мутаций.

5. **метод насыщающего мутагенеза (site-saturation mutagenesis)** – метод, в котором одна аминокислота заменяется на любую из оставшихся 19

аминокислот. В результате получается набор клонов, имеющий различные кодоны в нужной позиции.

6. **метод повторяющегося насыщающего мутагенеза (iterative saturation mutagenesis)** [21]. Метод заключается в том, что на первом этапе выбранные аминокислоты (X, Y, Z) заменяются методом насыщающего мутагенеза. В результате скрининга библиотек выявляются лучшие мутанты X1, Y1, Z1. Далее полученные мутанты используют для насыщающего мутагенеза в следующем положении (в мутанте X1 для мутагенеза будет использовано положение Y, в результате чего получается библиотека X1Y и т.д.). После скрининга библиотек, генерированных на втором этапе, образуются мутанты, имеющие мутации в двух положениях.

Стратегии создания библиотек мутантов описаны более подробно в обзоре [22].

## 2. ИСКУССТВЕННЫЕ БИОКАТАЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ.

Существует пять основных способов индукции каталитического ответа у антител (Рис. 1). Все они рассмотрены в обзоре [23].

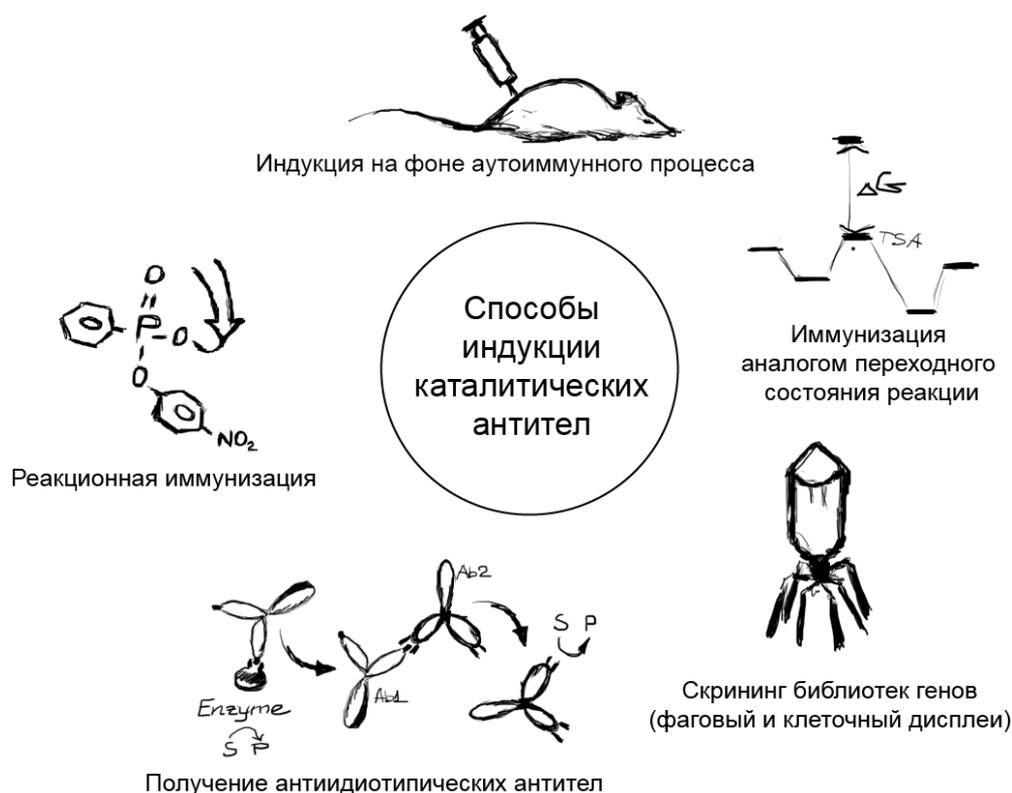


Рис. 1. Стратегии индукции биокаталитической активности у антител.

## 2.1. КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, ПОЛУЧАЕМЫЕ ИММУНИЗАЦИЕЙ АНАЛОГАМИ ПЕРЕХОДНЫХ СОСТОЯНИЙ.

Множество важнейших жизненных функций организма осуществляется за счет высокоспецифичных аффинных взаимодействий. Силы, обеспечивающие связывание биомолекул с константами диссоциации комплексов  $10^{-10} - 10^{-12}$  М, имеют одинаковую природу. Действительно, в образовании высокоаффинных комплексов ДНК-белок, гормон-рецептор, антиген - антитело, аналог переходного состояния ферментативной реакции - фермент участвуют водородные связи, Ван-дер-Ваальсовы, гидрофобные взаимодействия, ионные контакты. Согласно концепции Дженкса [24], взаимодействие фермент - аналог переходного состояния реакции можно имитировать связыванием антиген - антитело. Как отмечалось выше, идея Дженкса не получила в 70-е годы практически никакого подтверждения, так как требовала для своей практической реализации выделения «гомогенного по идентичным каталитическим центрам» препарата абзима, то есть получения моноклональных антител. В то же время, представления о переходных состояниях ферментативных реакций и способы синтеза стабильных аналогов таких переходных состояний не были достаточно развиты. Первая попытка получения каталитических антител была предпринята в 1975 году группой Столлара [25]. Ими были получены антитела на N-(5-фосфопиридоксил)-3'-амино-L-тирозин и на его циклическое производное, сходное по строению с основаниями Шиффа. Несмотря на то, что эти антитела ингибировали тирозин-трансаминазу и тирозин-декарбоксилазу и эффективно связывали аналог переходного состояния, какого-либо катализа реакции образования основания Шиффа авторам добиться не удалось. Было достигнуто незначительное (в 5 раз) ускорение пиридоксальфосфат-зависимого катализа трансаминирования L-тирозина.

Первый значительный успех в получении абзимов был достигнут Коэном и соавторами [26, 27]. В работе [26] тестостерон-1 $\alpha$ -карбокситиоэфир был связан эфирной связью с флуоресцентной группой, при этом полученный конъюгат не флуоресцировал. За течением реакции ацилирования следили по появлению флуоресценции при его распаде в ходе инкубации конъюгата с IgG фракцией анти-дигидротестостероновой сыворотки кролика. Полученные результаты свидетельствовали о катализе реакции в присутствии антител. Скорость процесса, однако, была низкой ( $v=1.4 \times 10^{-9}$  моль/мин.), что авторы объяснили медленной диссоциацией продуктов реакции ( $K_M=1 \times 10^{-7}$  М).

В работе [27] впервые было продемонстрировано расщепление сложноэфирной связи моноклональным анти-динитрофенильным антителом, созданным при помощи гибридной технологии [28]. При инкубации данного антитела с кумаринильным эфиром

2,4-динитрофенил-ε-капроновой кислоты наблюдали появление флуоресцирующего продукта. Однако, приведенные в работе доказательства обусловленности подобного катализа связыванием субстрата антителами представлялись недостаточными. Поэтому вопрос о возможности дизайна антител с запрограммированной каталитической активностью был отложен еще на шесть лет.

В конце 1986 года появилось сообщение о катализе гидролиза карбоксиэфиров моноклональными антителами, которое независимо друг от друга сделали группы Шульца и Лернера [29, 30]. Группа Шульца использовала хорошо изученное антитело MOPC 167, связывающее *n*-нитрофенилфосфорилхолин, а Лернер с сотрудниками получили антитело непосредственно на аналог переходного состояния реакции гидролиза сложноэфирной связи. Группе Лернера удалось синтезировать фосфонатные аналоги эфиров, имитирующие переходные состояния реакций гидролиза арильных эфиров 4-трифторацетамидо-фенил уксусной кислоты и получить антитело 6D4, гидролизующее один из эфиров со скоростью  $2.7 \times 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ .

В 1988 г. той же группой исследователей было получено антитело 50D8, гидролизующее карбоксиэфиры с ускорением в миллион раз ( $k_{\text{cat}}=20 \text{ с}^{-1}$ ,  $K_M=1.5 \text{ мМ}$ ). Данное антитело также было получено на фосфонатный аналог переходного состояния реакции. Низкая величина связывания абзима с субстратом ( $K_M=1.5 \text{ мМ}$ ) и высокая - с аналогом переходного состояния реакции ( $K_I=50 \text{ нМ}$ ) свидетельствует о гораздо более эффективной стабилизации переходного состояния, чем основного состояния реакции.

Принцип стабилизации переходного состояния реакции, обеспечивший первые успехи в создании каталитических антител, был применен в большинстве последующих работ. Общие принципы дизайна каталитически активных антител были сформулированы в 1990 г. в обзоре Шоката и Шульца [31]: катализ, осуществляемый абзимами, основывается на известных принципах ферментативного катализа и включает в себя стабилизацию переходного состояния, общий кислотно-основной, электрофильный и нуклеофильный типы катализа, а также эффекты сближения.

Также необходимо отметить, что абзимы, так же как и обычные ферменты, потенциально могут быть стереоспецифичными катализаторами химических реакций. Сохранение высокой стереоспецифичности, тем не менее, является основной трудностью при дизайне искусственных ферментов [32].

Значительным успехом в исследованиях абзимов можно считать создание моноклонального антитела 24B11, энантиоселективно катализирующего внутримолекулярную реакцию циклизации шестичленного кольца с ускорением в 170 раз,

доля единственного энантиомера  $\delta$ -лактона среди продуктов реакции циклизации рацемической смеси  $\delta$ -эфиров составляла 94% [33].

В другом случае стереоспецифичный катализ антителами был реализован для перегруппировки Кляйзена (Рис. 2) [34, 35]. Эта химическая реакция реализуется при биохимических процессах в виде стереоселективного превращения хоризмата в префенат (разрыв С-О связи и образование С-С связи) и катализируется ферментом хоризматмутазой, ускоряющей процесс в 2 млн. раз. Были получены антитела на два гаптена, которые представляли собой аналоги конкурентных ингибиторов реакции (оксобициклононанов), имеющих геометрию, близкую к предполагаемой структуре переходного состояния этой реакции.

Среди гибридных клонов, секретирующих антитела к одному из гаптенных, был найден клон, антитела которого ускоряли реакцию в 200 раз ( $k_{cat}=1.2 \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ ,  $K_M=5.1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ), причем превращение, как и в случае фермента, проходило стереоселективно. Дальнейшие исследования показали, что механизм катализа реакции полученным антителом отличен от катализа хоризматмутазой: не наблюдался изотопный эффект, с метиловым эфиром хоризмовой кислоты реакция шла с потерей ОН-группы, а ее диметиловый эфир не являлся субстратом для антитела. Более того, эта реакция, характеризуемая высоким энтропийным барьером, в случае катализа антителом протекала практически без изменения энтропии. Авторы предположили, что причиной значительного ускорения реакции является «замораживание» субстрата в пространственно ограниченной конформации, приводящей к благоприятному изгибу связей.

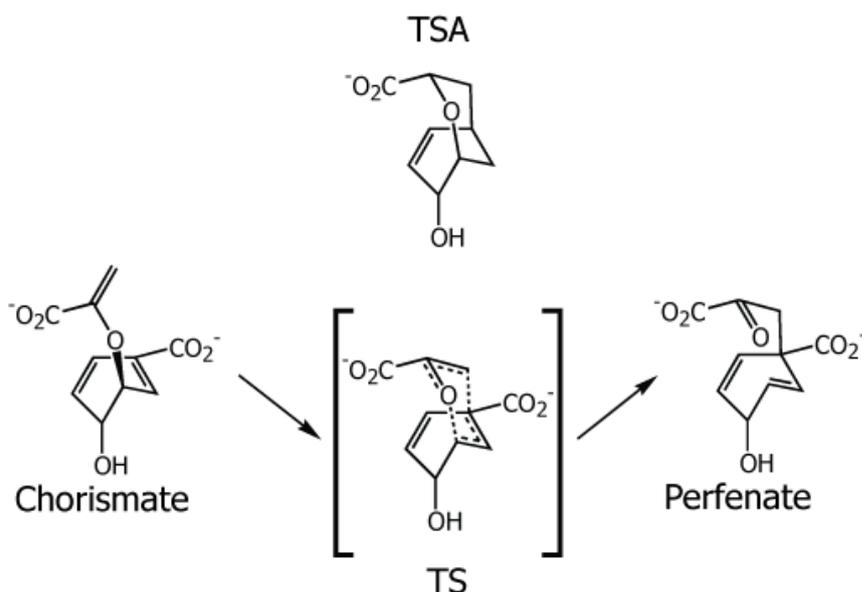


Рис. 2. Схема реакции перегруппировки Кляйзена. TS – переходное состояние реакции. TSA – аналог переходного состояния, использованный для иммунизации [34, 35].

Метод иммунизации аналогом переходного состояния реакции оказался пригоден не только для стереоспецифичного катализа, но и для бимолекулярных реакций. Так, группа

Лернера в 1988 г получила антитело 24B11, катализирующее стереоспецифичную бимолекулярную реакцию амидного синтеза [36]. При помощи аналогичной техники было получено антитело, катализирующее реакцию Дильса-Альдера (Рис. 3) [37, 38]. Следует отметить, что ферменты, катализирующие эту реакцию, не описаны и скорее всего не существуют.

Полученное антитело 39A11, названное авторами Дильс-Альдеразой, избирательно катализирует неблагоприятную в обычных условиях экзо-атаку на диен. В 1998 году была получена пространственная структура этого антитела, которая позволила детально описать механизм связывания исходных веществ в его активном центре и снижения энергетического барьера превращения.

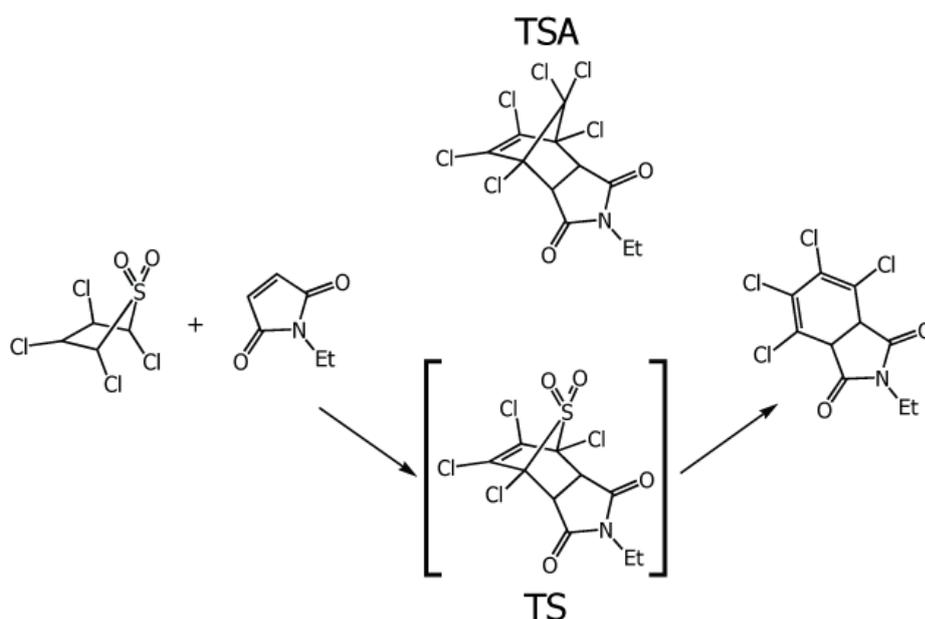


Рис. 3. Схема реакции Дильса-Альдера. TS – переходное состояние реакции. TSA – аналог переходного состояния, использованный для иммунизации [36].

Отдельно стоит упомянуть использование фосфонатов для индукции гидролитических абзимов. Некоторые фосфонаты являются эффективными ингибиторами эстераз и протеиназ, что объясняется их высоким сходством со структурами на основе тетраэдрического углерода, которые рассматриваются как переходное состояние гидролитических реакций [39]. К настоящему времени при помощи иммунизации гаптенами на основе различных фосфонатов получено большое число антител, способных гидролизовать сложные эфиры [29, 40], карбонаты [41] и некоторые амиды [42]. Структура и свойства некоторых из них будут подробно рассмотрены ниже.

Следует отметить, что область применения абзимов, полученных путем иммунизации аналогами переходного состояния не ограничивается катализом отдельных

химических реакций *in vitro*. Поскольку использование абзимов для осуществления необычных (то есть не катализируемых природными ферментами) химических превращений в кровотоке теоретически совершенно очевидно, эта возможность была экспериментально реализована в ряде работ. В частности, было показано, что абзимы могут быть использованы для активации предшественников лекарственных препаратов (Рис. 4) [43] и для гидролиза кокаина [44].

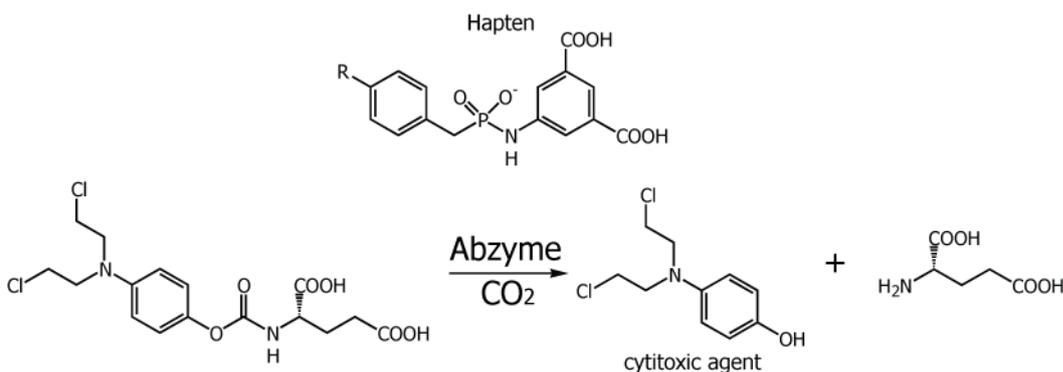


Рис. 4. Схема получения антител для активации предшественников лекарственных препаратов (терапия ADAPT) [43].

Инактивация кокаина в кровотоке человека представляет собой исключительно интересную и вполне востребованную задачу. Поэтому исследования кокаин-гидролизующих абзимов были доведены до стадии *in vivo*. В опытах на крысах было ясно продемонстрировано, что кокаин-гидролизующее антитело 15A10, но не другое антитело, связывающее кокаин с достаточной аффинностью, полностью блокировало психоактивное действие кокаина и уменьшало смертность среди животных, получивших летальную дозу вещества [45, 46]. В работе [47] с помощью фаг-дисплейной библиотеки, созданной на основе мРНК спленоцитов, изолированных из селезенки мыши, иммунизированной гаптенем – аналогом переходного состояния реакции (Рис. 5), была получена панель одноцепочечных антител, способных гидролизовать кокаин. Ускорение реакции клоном scFv 3F3 по сравнению с некаталитическим распадом составило 260 раз, путем сайт-направленного мутагенеза двух аминокислот HisH50Gln, ArgH52Lys удалось достигнуть соотношения  $k_{cat}/k_{uncat}$  до 2040 раз.

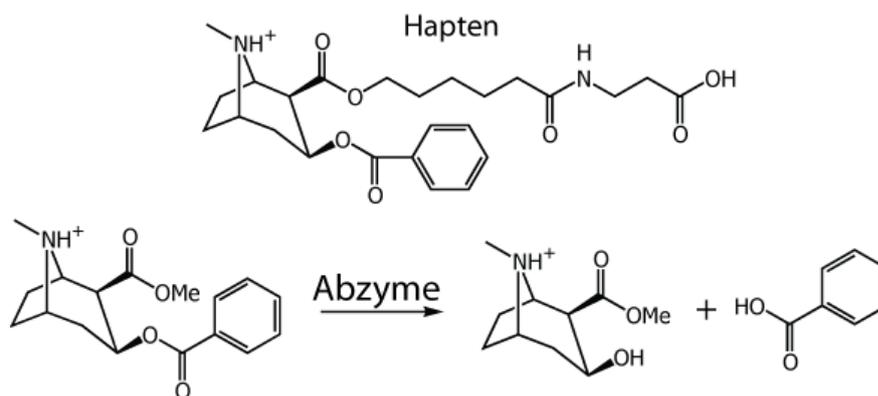


Рис.5. Схема получения антител для гидролиза кокаина [44].

Другой технологией получения каталитических антител стало направленное введение в связывающий центр иммуноглобулинов специфических каталитических групп. Так, например, антитело, полученное на положительно заряженный гаптен, по всей вероятности, будет иметь в своем активном центре отрицательно заряженные аминокислоты (Asp или Glu). Примером такого подхода может служить опыт группы Лернера [48]. Используя антиген, содержащий ион аммония, исследователи получили антитело, катализирующее реакцию  $\beta$ -элиминирования, и содержащее в активном центре глутаминовую и аспарагиновую кислоты для стабилизации переходного состояния электростатическими взаимодействиями.

## 2.2. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИЙ ИЛИ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ ОСТАТКОВ.

Рассмотренные выше методы позволяют получить абзимы для широкого спектра реакций. В то же время их каталитическая эффективность сильно уступает эффективности ферментов, что можно объяснить различиями в строении аналогов переходного состояния реакции, используемых для иммунизации, и истинного переходного состояния реакции – воображаемой метастабильной молекулы. На настоящий момент описано несколько способов увеличения каталитической активности получаемых абзимов. Наиболее популярна модификация уже существующих антител. В 1989 году в известном антителе класса IgA MOPC 315, связывающего динитрофенол, методом направленного мутагенеза остаток Tyr34 легкой цепи был заменен на His в предположении участия имидазольной группы в гидролизе сложноэфирной связи. Полученный абзим катализировал гидролиз 7-гидроксикумариновых эфиров 5-(2,4-динитрофенил)аминопентановой кислоты в 45 раз лучше, чем исходный. Для того же антитела была проведена химическая модификация

остатка Tyr34 легкой цепи и Lys52 тяжелой цепи тиобутильными группами, что привело к ускорению распада эфиров в 6 10<sup>5</sup> раз [49].

Аналогичная техника замены единственного аминокислотного остатка была применена для создания абзима с рибонуклеолитической активностью [50]. При исследовании структуры комплекса Fab-фрагмента моноклонального антитела Jе103 и полиинозина было установлено, что остаток Arg96 тяжелой цепи находится вблизи 2'-гидроксила рибозы. Поскольку активный центр рибонуклеаз включает остаток гистидина (или пару остатков гистидина), непосредственно участвующего в переносе фосфоэфирной связи, была проведена замена Arg96 на His96. Полученное антитело расщепляло полиинозин с эффективностью около 100 М-1с-1.

Другим примером создания каталитического антитела путем химической замены аминокислотных остатков является работы группы Д.С. Шена; при замене остатков серина на остатки селеноцистеина в молекуле моноклонального антитела, связывающего восстановленный глутатион, был получен абзим со свойствами глутатионпероксидазы, удельная активность которого была близка к таковой для соответствующего фермента. Механизм катализа полученного абзима также соответствовал механизму катализа природной глутатионпероксидазы [51]; было продемонстрировано, что селено-содержащий абзим может блокировать окислительный стресс *in vitro* [52].

### **2.3. СОЗДАНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИ НЕВЫГОДНЫХ ПРЕВРАЩЕНИЙ.**

Очевидной областью применения индуцированных абзимов является катализ химических реакций, проходящих через образование более высокоэнергетических переходных состояний, чем в случае кинетически контролируемых превращений. В такой ситуации используемый гаптен должен быть достаточно реакционно-способным, чтобы полученное на него антитело вызывало химические превращения молекул, но, одновременно, не должен разрушаться при нахождении продолжительное время в физиологических условиях. Хорошим примером такой балансировки свойств гаптена является работа группы Лернера [53], в которой было получено антитело, катализирующее реакцию рециклизации эпокиспиртов (Рис. 6). Гаптен, использованный для иммунизации, был создан таким образом, чтобы связывающий центр индуцированного им антитела, во-первых, способствовал образованию шестичленного кольца, во-вторых, стабилизировал частичный заряд, возникающий при разрыве С-О связи, и, в-третьих, препятствовал ингибированию реакции продуктом за счет различий в зарядах гаптена и продукта. Полученное антитело действительно катализировало образование

шестичленного кольца. При помощи данного метода позднее было получены антитела, катализирующие невыгодную эндо-тет циклизацию транс-эпокси спиртов, идущую с нарушением правил образования колец Балдвина [54].



Рис. 6. Схема реакции перециклизации эпокиспиртов. Вверху – основной путь некатализируемой реакции. Внизу – путь реакции, катализируемый антителом.

В качестве другого примера катализа неблагоприятного с энергетической точки зрения процесса можно рассмотреть превращение енолового эфира. В водной среде эта реакция идет исключительно в сторону образования кетона. Антитело 14D9, полученное на гаптен, содержащий в своей структуре четвертичный аммонийный катион, оказалось способным катализировать образование кетала, которое в обычном случае достигается только в 97% диоксане [55]. Антитело 14D9 было в дальнейшем использовано для катализа первой (стереоселективной) стадии синтеза биологически активного  $\alpha$ -мультистрианина в препаративных количествах.

#### 2.4. АНТИИДИОТИПИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА.

В 1963 году иммунизацией кролика В антителами к *Salmonella typhi* из кролика А (Ab1), Ж. Уден и М. Мишель получили антитела анти-Ab-1 [56]. Однако сыворотка кролика В не напоминала ни сыворотку кролика А до иммунизации, ни сыворотки других кроликов, иммунизированных тем же антигеном. Иммунизация кролика А вызвала продукцию антител, направленных против введенного антигена и имеющих специфические антигенные маркеры. Эти маркеры, или идиотопы, спровоцировали затем продукцию у кролика В антител Ab2, антиидиотипов. Гипервариабельные участки антител несут, таким образом, антигенные детерминанты, или идиотопы. Сумма идиотопов составляет идиотип.

Основываясь на этих данных, в 1974 году Н. Ернри [57] сформулировал теорию идиотипических сетей. Согласно этой теории, иммунная система представляет собой сеть идиотипических взаимодействий. Для каждого антитела Ab1, направленного против антигена и носителя идиотопа (i1) может существовать второе антитело Ab2, комплементарно направленное против идиотипических детерминант Ab1 и само несущее идиотоп (i2). Идиотопы антитела Ab2, в свою очередь, могут вызвать продукцию антител Ab3 и так далее.

При исследованиях природных ДНК-гидролизующих антител группой А.Г. Габиева была выдвинута гипотеза антиидиотипического происхождения каталитических антител [58]. Эта гипотеза получила экспериментальное подтверждение. Было показано, что природные ДНК-гидролизующие антитела, обнаруживаемые в сыворотках крови больных склеродермой, могут образовываться как антиидиотипические антитела к топоизомеразе I [59].

Схема направленного получения каталитических антиидиотипических антител, использующая понятие «антител внутреннего образа», была предложена исследователями из Технологического Университета г. Компьень (Франция) (рис. 7).

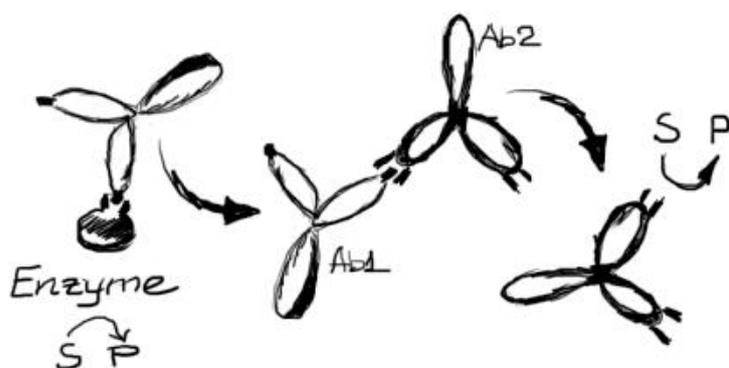


Рис. 7. Схема индукции каталитических антиидиотипических антител.

Исходное антитело Ab1 получали на активный центр фермента; клоны гибридом отбирали по способности узнавать фермент (антиген) и ингибировать его активность. Участок связывания антигена, представляющий собой структурный отпечаток активного центра, может, в свою очередь, служить иммуногеном для получения антител Ab2. Из общего набора антиидиотипов Ab2 отбирали те, которые будут представлять собой структурное отражение исходного антигена, а именно активного центра фермента. В таком случае они теоретически будут способны связывать субстрат фермента и катализировать его превращение в продукт реакции. Применение данного метода позволило получить

несколько каталитических антиидиотипических антител. Удачным примером применения гипотезы идиотипических сетей для получения каталитической активности является антитело 9G4H9, проявляющее  $\beta$ -лактамазную активность [60]. Антитело 9A8, обладающее ацетилхолинэстеразной активностью [61].

## **2.5. ПОЛУЧЕНИЕ АБЗИМОВ ПУТЕМ РЕАКЦИОННОЙ ИММУНИЗАЦИИ.**

Интересной альтернативой традиционному способу получения абзимов является реакционная иммунизация, описанная в 1995 г. группой Р. Лернера [62]. Данный метод основан на иммунизации животных гаптенами на основе ковалентных ингибиторов сериновых гидролаз. Предполагается, что такие антигены будут образовывать ковалентный комплекс с антителами, обладающими подходящей структурой активного центра и, таким образом, стимулировать пролиферацию соответствующих клонов В-клеток. Работоспособность метода была продемонстрирована на примере иммунизации мышей гаптенем, содержащим реакционноспособную группу фосфорорганического диэфира (то есть диалкилфосфоната) и демонстрации высокой доли клонов гибридом, секретирующих эстеролитические антитела.

Очевидным преимуществом реакционной иммунизации над иммунизацией аналогом переходного состояния реакции является возможность индуцировать абзимы, использующие определенный механизм катализа. Это было продемонстрировано на примере получения абзимов со свойствами альдозазы при иммунизации мышей гаптенем на основе 1,3-дикетона (Рис. 8) [63], который при реакции с первичной аминогруппой образует амид, являющийся промежуточным продуктом целевой реакции. Авторы предположили, что подобный гаптен будет способствовать образованию антител, содержащих остаток лизина в связывающем центре. Данное антитело будет ковалентно связывать гаптен через первичную аминогруппу лизина, что позволит ему проявлять наивысшее сродство к антигену. Данный лизин должен будет играть роль нуклеофильной группы каталитического центра антитела и будет образовывать ковалентный комплекс с кетоном на промежуточной стадии реакции альдольной конденсации. В свою очередь, структура дикетона должна будет индуцировать структуру активного центра антитела, способную связывать оба субстрата одновременно.

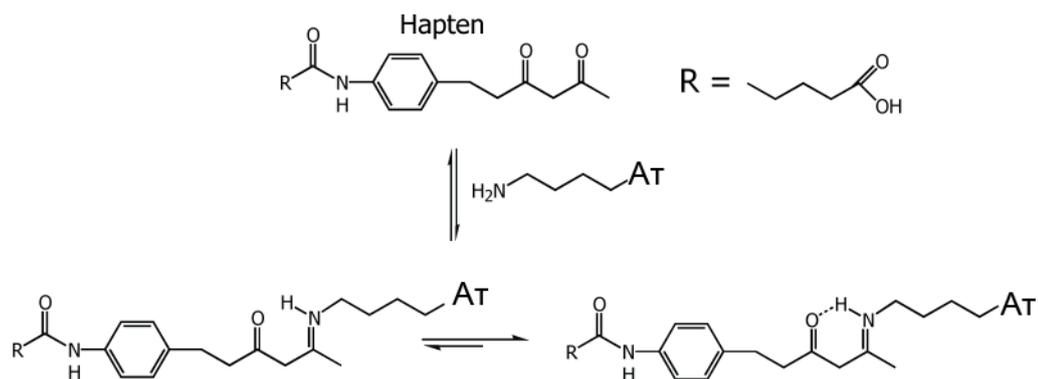


Рис. 8. Схема получения каталитических антител для реакции альдольной конденсации [64].

Полученные моноклональные абзимы действительно образовывали ковалентный комплекс (амид) с молекулой дикетона при помощи остатка лизина; таким образом, катализируемая реакция следовала енаминовому механизму. Интересно отметить, что данные абзимы обладали приблизительно таким же уровнем ускорения реакции гликолиза, что и соответствующие природные ферменты и в то же время, в отличие от ферментов, были способны катализировать широкий диапазон химических реакций [64].

Высокая каталитическая эффективность одного из полученных путем реакционной иммунизации альдозных абзимов 38C2 позволила использовать его не только для проведения органического синтеза [65] и активации прекурсоров лекарств *in vitro* [66-68] и *in vivo* [69], но и в качестве потенциального противоопухолевого препарата в системе “адапторной иммунотерапии” – введения в циркуляцию содержащего дикетонную группу пептидомиметика интегрина  $\alpha(v)\beta(3)$ , экспрессирующегося на поверхности раковых клеток, и последующее образование ковалентного комплекса между пептидомиметиком и гуманизированным антителом 38C2 [70].

## 2.6. АБЗИМЫ, СОДЕРЖАЩИЕ КОФАКТОРЫ.

Отдельным направлением в получении каталитических антител является поиск кофакторов, способствующих индукции каталитической активности. Как правило, речь идет о направленном введении в связывающий центр антитела определенных аминокислот. Так, антитело, полученное на положительно заряженный гаптен, будет, вероятнее всего, иметь в своем активном центре отрицательно заряженные аминокислоты (Asp или Glu). Это предположение, названное “bait and switch” (приманка и замена), было подтверждено группой Лернера. Как уже упоминалось, используя гаптен, содержащий ион аммония, исследователи получили антитело, катализирующее реакцию  $\beta$ -элиминирования, и содержащее в активном центре глутаминовую и аспарагиновую кислоты для

электростатической стабилизации переходного состояния. По такому же принципу в 1998 году было создано антитело, гидролизующее фосфодиэфирную связь [71].

Интересный подход к введению кофакторов был применен в работе [72]. Чтобы индуцировать протеолитический абзим, авторы использовали в качестве гаптена комплекс триэтилтетрамина кобальта (Co(III)-триен). Действительно, полученное антитело катализировало с высокой специфичностью гидролиз пептидной связи Gly-Phe в присутствии ряда металлов, причем наиболее эффективный гидролиз отмечался в присутствии комплекса Zn(II)-триен. В этом случае катализ характеризовался величиной  $k_{кат} = 6 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ , что значительно превышало константу некатализируемой реакции ( $3 \cdot 10^{-9} \text{ с}^{-1}$ ).

Попытки создания модели цитохромов P450 путем конъюгации металлопорфиринов и антител очевидным образом привели к созданию абзимов, обладающих оксидазными свойствами [73]. Одна из наиболее интересных реализаций такого подхода состоит в химической модификации производным железопорфирина антител, связывающих субстрат реакции окисления; на примере антител к эстрадиолу было продемонстрирована возможность специфического окисления стероидов полусинтетическими гем-содержащими абзимами [74].

## **2.7. ГРАНИЦЫ ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ИНДУЦИРОВАННЫХ АБЗИМОВ.**

Несмотря на значительный прогресс абзимологии, существующие каталитические антитела существенно уступают природным ферментам. Так, пока не представляется возможным создать антитела, активность которых регулируется на аллостерическом уровне. В настоящий момент представляется очевидным, что катализ путем стабилизации переходного состояния реакции может обеспечить лишь умеренный уровень ускорения реакции. Это вызвано тем, что соотношение констант скорости катализируемой и некатализируемой реакций определяется соотношением константы диссоциации антитела с субстратом реакции и аналогом ее переходного состояния, и это соотношение вряд ли может превышать  $10^6$  [75, 76]. В то же время, при катализе реакций природными ферментами обнаруживаются дополнительные механизмы, такие как дестабилизация исходного субстрата, сближение каталитически активных групп и атакующей химической связи в активном центре, динамика активного центра и ряд других. Поскольку селекция клонов В-лимфоцитов, производящих антитела к введенному антигену, обычно ограничивается достижением константы диссоциации  $10^{-6} - 10^{-9} \text{ М}$ , представляется очевидным, что направленное получение абзимов, обладающих несколькими свойствами

ферментов, не может сводиться к иммунизации животных и скринингу получаемых гибридных клонов.

Одна из первых успешных попыток проведения селекции каталитических антител последовательными шагами *in vivo* и *in vitro*, была опубликована группой Лернера в 1997 г [64]. При получении абзимов со свойствами альдолазы методом реакционной иммунизации, описанным выше, реакционноспособный гаптен был использован и для иммунизации, и для последующего скрининга фаговой библиотеки из иммунизированной гаптенем мыши. Бактериофаги с экспонированными на их поверхности миниантителами отбирались по способности ковалентно связываться с иммобилизованным гаптенем. Это позволило отобрать из библиотеки только антитела, содержащие лизин в связывающем гаптен центре. Сочетание столь эффективных подходов к дизайну гаптена и скринингу антител позволило получить высокоэффективный абзим, который ускорял реакцию более чем в 10<sup>9</sup> раз, и обеспечивал 95% стереоселективность превращения.

Следует заметить, что значительный прогресс, достигнутый в абзимологии за столь короткий срок, указывает на огромные практические возможности этой области науки. Однако эффективный катализ антителами реакций, проходящих через образование высокоэнергетических переходных состояний и достигаемый ферментами с помощью сложного комплекса механизмов, в настоящий момент не реализован. В связи с этим особый интерес вызывают развивающиеся в последние годы исследования природных каталитических антител.

### **3. МЕТОДЫ НАПРАВЛЕННОЙ ЭВОЛЮЦИИ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ.**

Как было показано выше направленная эволюция белков состоит из двух основных этапов: создание генетического разнообразия в виде геномной библиотеки, и использование различных методов скрининга библиотек генов биокатализатора. В главе 2 были рассмотрены методы генерации генетического разнообразия, в данной главе представлены основные методы и подходы селекции биокатализаторов из библиотек.

Отбор вариантов с заданными каталитическими свойствами, является куда более сложной задачей, чем отбор белков, основанный на повышенной аффинности к специфической мишени. Основной задачей при отборе ферментов с улучшенными свойствами является создание связи между ферментом и продуктом его активности. В настоящее время существует ряд различных методов отбора. Одним из первых, и до сих пор остающийся наиболее популярным, является метод фагового дисплея. Более подробно метод будет рассмотрен ниже. Кроме того, библиотеки ферментов могут быть

представлены на поверхности бактериальных клеток [77, 78], в том числе на поверхности клеток *E.coli*, или экспрессироваться непосредственно в цитоплазму *E.coli* [79].

Еще один метод основан на иммобилизации клеток, экспрессирующих мутанты ферментов, на твердофазном носителе. После подраста клеток и образования отдельных колоний, твердофазный носитель насыщают флуорофорным или хромогенным субстратом. Скрининг активных клонов ведут под микроскопом [80].

Альтернативным методом является генетическая селекция. Такой подход наиболее приближен к природной эволюции ферментов, однако может обеспечить только поиск ферментов, аналоги которых уже существуют в природе. При таком подходе создают штамм, в котором «выключают» интересующий фермент, необходимый для его жизнедеятельности. Полученный штамм трансформируют плазмидной ДНК, содержащей библиотеку генов. В результате такого давления выживают только клоны, несущие активные ферменты. Примеры генетической селекции описаны в обзоре [18].

### **3.1. МЕТОДЫ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО СКРИНИНГА ФЕРМЕНТОВ, ИСПОЛЬЗУЯ КЛЕТОЧНЫЕ ИЛИ ФАГ-ДИСПЛЕЙНЫЕ БИБЛИОТЕКИ.**

Дисплей ферментов на поверхности клеток или фагов имеет несколько преимуществ: во-первых, бактерии или фаги обеспечивают связь между геном и белком, который он кодирует, во-вторых, хотя размер библиотек ограничен эффективностью трансформации, может быть получено  $10^{11}$ - $10^{12}$  трансформантов. В-третьих, дисплей на поверхности обеспечивает беспрепятственный доступ субстрата и подбор условий реакции (буфер, pH, ионы металлов). Основной проблемой дисплейной системы является поддержание связи между ферментом и продуктом его активности. Ранее селекция ферментативной активности каталитических антител или ферментов в фаг-дисплейной системе выполнялась непрямыми методами, путем связывания аналогов переходного состояния или суицидных ингибиторов. Примером является работа, выполненная группой Плунктуна [81], в которой для селекции антител-фосфатаз из синтетической библиотеки генов иммуноглобулинов использовали суицидный субстрат. Отличие суицидного субстрата от необратимого ингибитора заключается в том, что в результате реакции с субстратом фермент проходит полный оборот реакции, в результате чего образуется активное вещество, ковалентно связывающее фермент. В случае ингибитора фермент останавливается на стадии образования промежуточного продукта реакции. В качестве субстрата в процессе селекции был использован «заякоренный» дифторметилфенил фосфат. В результате расщепления эфирной связи фосфорной кислоты образуется хинонметидин, который затем взаимодействует с нуклеофильной группой активного

центра антитела. В результате селекции были отобраны антитела, обладающие фосфатазной активностью, причем каталитическая эффективность (kcat/КМ) полученных антител превосходила эффективность антител, полученных классической иммунизацией аналогами переходных состояний, в 25 раз. Несмотря на высокую каталитическую эффективность, отобранные антитела все же серьезно уступали щелочной фосфатазе *E.coli*. Для улучшения каталитических параметров, на основе наилучшего варианта антитела-фосфатазы была сконструирована библиотека случайных мутантов и была проведена повторная селекция на фосфатазную активность. В результате повторного отбора удалось улучшить каталитические параметры, однако они все равно оказались ниже, чем в случае щелочной фосфатазы. Аналогичный метод отбора на каталитическую активность был использован в работе [82]. Метод селекции антител с пероксидазной активностью был основан на окислении биотинилированного тирамина, который в результате окисления ковалентно взаимодействовал со связывающим центром антитела. Активные антитела отбирали по способности связываться со стрептавидином.

Другой подход для селекции с помощью фагового дисплея основан на взаимодействии субстрата с фаговой частицей, несущей целевой фермент. Активные варианты фермента преобразуют субстрат в продукт, который остается связанным с фагом, и фаг затем может быть выделен с помощью аффинной хроматографии. В работе [83] авторы описали применение такой процедуры для отбора ферментов с аденилатциклазной активностью, то есть ферментов, преобразующих АТФ в цАМФ. Используя аденилатциклазу *Bordetella pertussis* в качестве модели, авторы показали, что этот фермент может быть эффективно экспрессирован на поверхности нитевидных фагов в активной форме. В качестве субстрата был использован АТФ, модифицированный путем введения малеимидильной группы в положение С8 аденина. Авторы разработали систему отбора, в ходе которой с помощью аффинной хроматографии за счет антител, узнающих цАМФ, модифицированный по положению С8, происходит отбор фагов, несущих на своей поверхности активный фермент. Антитела были отобраны из библиотеки одноцепочечных переменных фрагментов генов иммуноглобулинов (ScFv) Griffin, с представительностью  $1 \times 10^8$ . В результате был произведен отбор фагов, несущих ген активной аденилатциклазы, с обогащением в 70 раз в течение каждого раунда селекции.

Одна из первых успешных попыток проведения селекции каталитических антител последовательными шагами *in vivo* и *in vitro*, была опубликована группой Лернера [64]. При получении абзимов со свойствами альдолазы методом реакционной иммунизации, реакционноспособный гаптен был использован и для иммунизации, и для последующего скрининга фаговой библиотеки, созданной из иммунизированной гаптенной мыши.

Бактериофаги, с экспонированными на их поверхности антителами, отбирались по способности ковалентно связываться с иммобилизованным гаптеном. Сочетание столь эффективных подходов к дизайну гаптена и скринингу антител позволило получить высокоэффективный абзим, который ускорял реакцию более чем в  $10^9$  раз и обеспечивал 95% стереоселективность превращения.

Применение метода клеточно дисплея для направленной эволюции приобрело большую движущую силу. В частности, скрининг с помощью метода FACS (fluorescence-activated cell sorter, проточная цитофлуориметрия) позволил получить ряд высокоэффективных связывающих антител [84, 85]. Другой метод скрининга основан на иммобилизации клеток, несущих на своей поверхности фермент, на носителе. Клетки адсорбируются на полиакриламидных гранулах таким образом, что в среднем, на одну гранулу приходится одна клетка. Гранулы иммобилизуются на твердой поверхности и клетки могут расти и образовывать микроколонии. Далее микроколонии инкубируются с хромогенным или флуорогенным субстратами и отбираются под микроскопом [80].

Однако не только фаговые частицы можно использовать для дисплея ферментов на поверхности клеток, так же для этих целей могут быть использованы клетки бактерий [86], дрожжей [87] и млекопитающих [88]. Rajpal и соавторы [89] использовали клетки дрожжей для дисплея антител на своей поверхности. Они разработали быстрый и простой метод “look-through mutagenesis”, который позволяет создать полную карту оптимизации антиген-связывающего сайта. Авторы показали работоспособность этого метода на примере антитела к фактору некроза опухоли  $\alpha$ . Был использован аналог аланинового скрининга, чтобы перебрать аминокислотные остатки в гипервариабельных петлях антитела. Основываясь на химической структуре, размере и заряде, они разделили 20 аминокислотных остатков на 9 групп и потом выбрали по одному представителю из каждой группы (рис. 9). Затем они выполнили серию одиночных мутаций в CDR, где каждый остаток дикого типа был систематически замещен одним из девяти выбранных аминокислотных остатков. После этого измененные CDR были использованы для создания комбинаторной библиотеки одноцепочечных антител, экспрессирующийся на поверхности дрожжей. Для отбора были использованы магнитные шарики, несущие на своей поверхности биотинилированный фактор некроза опухоли  $\alpha$ . После отбора была определена нуклеотидная последовательность клонов с улучшенным связыванием. Что бы выявить взаимоусиливающие мутации, были созданы комбинаторные библиотеки, в которые входили все полезные мутации. Они были проанализированы с целью выявления панели оптимизированных кандидатов. Авторы утверждают, что аффинность лучшего из

отобранных одноцепочечных антител по отношению к фактору некроза опухоли  $\alpha$  возросла в 870 раз по сравнению с диким типом.

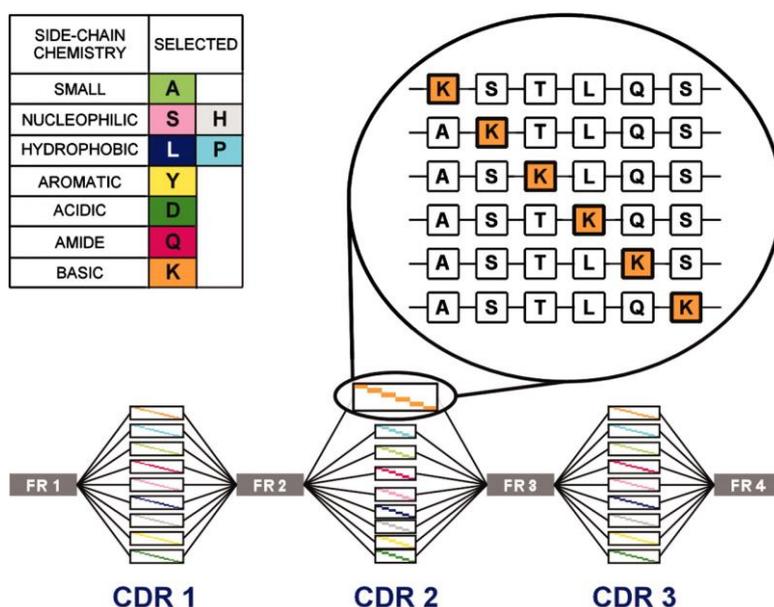


Рис. 9. Схема создания библиотеки, использованная в [89]. 20 аминокислотных остатков были разделены на 9 групп, из каждой группы был выбран один представитель. Затем была выполнена серия одиночных мутаций в CDR, где каждый остаток дикого типа был систематически замещен одним из девяти выбранных аминокислотных остатков.

### ***Компартментализация in vitro.***

Метод компартментализации *in vitro* (in vitro compartmentalization, IVC) основан на создании эмульсии вода-в-масле, где водная фаза диспергирована в масляной фазе и формирует микроскопические водные компартменты. Каждая капля содержит, в среднем, один ген, и служит в качестве искусственной клетки для обеспечения транскрипции, трансляции и детекции активности полученных белков. Масляная фаза остается в значительной степени инертной и ограничивает диффузию генов и белков между каплями. Высокая емкость системы ( $>10^{10}$  капель на 1мл эмульсии), простота подготовки эмульсии и ее высокая стабильность в широком диапазоне температур, делают этот метод весьма перспективным для высоко-эффективного скрининга ферментов. Один из возможных форматов селекции состоит в том, что субстрат, а затем и продукт желаемой ферментативной активности, физически связаны с геном. Простейшее применение этой стратегии – отбор ДНК-модифицирующих ферментов, где ген и субстрат представляют собой единую молекулу. И действительно, метод IVC был впервые применен для отбора ДНК-метилтрансфераз [90]. Для этого смесь, содержащую необходимые реагенты для *in vitro* транскрипции/трансляции, а также библиотеку генов, связанных с субстратом реакции помещали в эмульсии вода-в-масле, причем условия создания эмульсии подбирались таким

образом, что одна капля содержала один ген (рис. 10, шаг 1). Далее гены транскрибируются и транслируются в пределах капли (рис. 10, шаг 2). Синтезированные белки превращают субстрат в продукт реакции, который остается связанным с геном (рис. 10, шаг 3). Далее эмульсия разрушается и реакции преобразования субстрата в продукт останавливаются (рис. 10, шаг 4). Гены, соединенные с продуктом реакции селективно отбираются, амплифицируются и либо характеризуются (рис. 10, шаг 5), либо подвергаются повторным раундам селекции (рис. 10, шаг 6).

Помимо ДНК-модифицирующих ферментов, метод IVC был использован при селекции бактериальных фосфотриэстераз [91]. Селекция из библиотеки, содержащей более  $10^7$  вариантов привела к изоляции фермента с  $k_{cat}$  больше, чем  $10^5 \text{ сек}^{-1}$ , что в 63 раза выше, чем в случае дикого типа. Метод IVC так же был использован для селекции на связывающую активность из библиотек, экспонированных на микрогранулах [92].

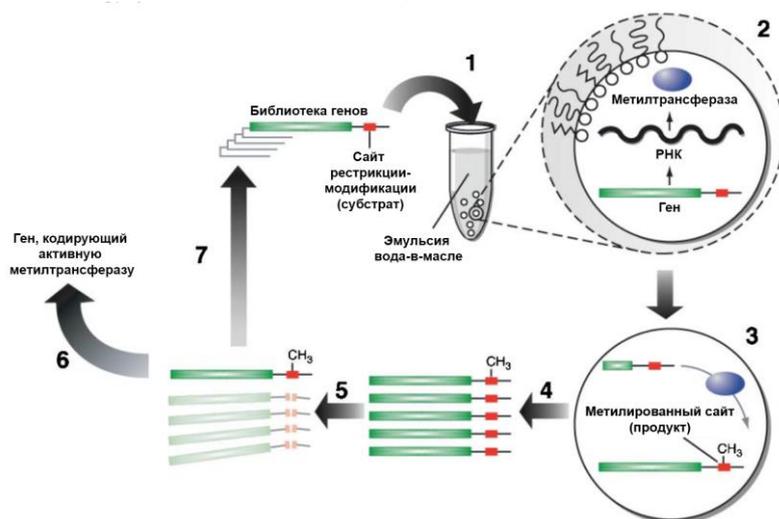


Рис. 10. Схематическое изображение метода компартиментализация *in vitro* [90].

### **Компартиментализация *in vitro* в двойных эмульсиях.**

Эта технология компартиментализации использует двукратные (вода-в-масле-в-воде) эмульсии, которые потом сортируются с помощью метода FACS. Технология заключается в следующем, библиотека генов (рис. 11, стадия 1), кодирующая разные варианты фермента, помещается в эмульсию вода-в-масле так, что в каплю попадает один ген. Гены транскрибируются и транслируются в пределах микрокапли, используя либо бесклеточную систему транскрипции/трансляции, либо компартиментализацию отдельных клеток (например, клетки *E. Coli* в которые клонирована библиотека генов) (рис. 11, стадия 2). Далее эмульсия преобразуется в двойную эмульсию вода-в-масле-в-воде и белки с

ферментативной активностью модифицируют нефлуоресцентный субстрат в флуоресцентный продукт (рис. 11, стадия 3). Флуоресцентные микрокапли селективируются от нефлуоресцентных методом FACS (рис. 11, стадия 4). Затем гены, находящиеся во отобранных микрокаплях и кодирующие активные ферменты, выделяют (рис. 11, стадия 5). Эти гены могут быть повторно использованы для дальнейших раундов отбора (рис. 11, стадия 6).

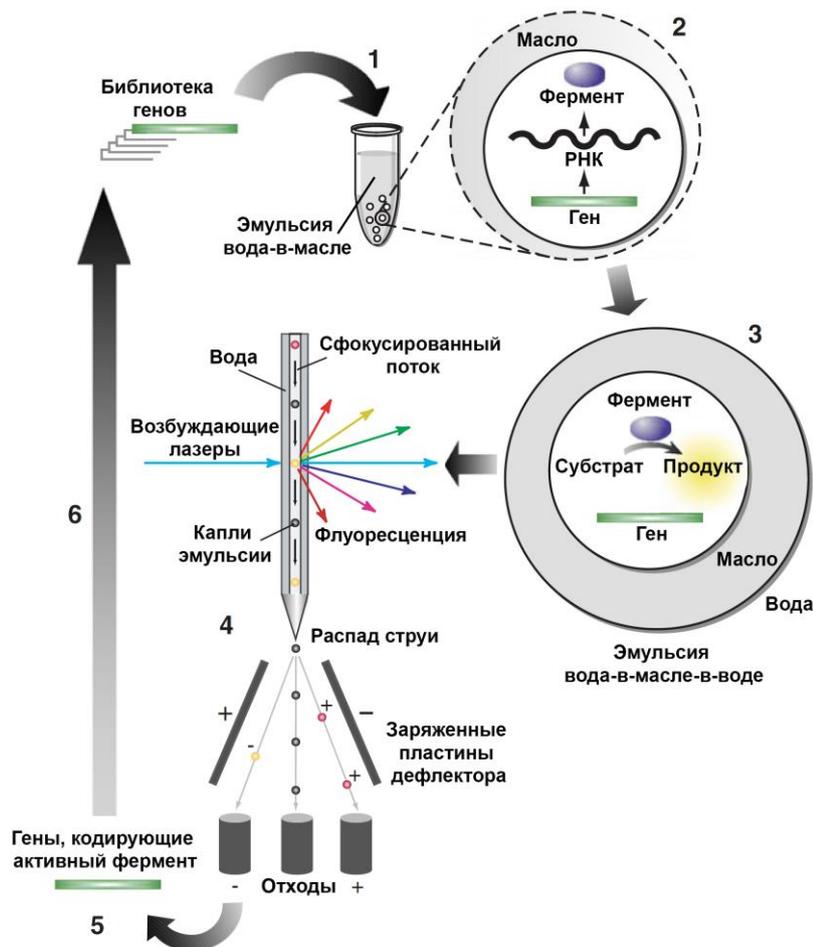


Рис. 11. Схематическое изображение компартиментализации *in vitro* в двойных эмульсиях [93].

Этот метод был использован для направленной эволюции сывороточной параоксидазы [94]. Библиотека мутантов параоксидазы (PON1), наработанная в *E. Coli*, была отсортирована с использованием флуорогенного фосфотриэфира DEPCyC. Гидролитическая активность мутантов PON1 к DEPCyC коррелировала с их активностью по отношению к P(S) изомеру кумаринового аналога циклозарина. Эффективность одного из вариантов PON1 по отношению к данному аналогу была в  $10^5$  раз выше, чем в случае дикого типа ( $\leq 1.75 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ ). После дополнительных раундов отбора каталитическая

эффективность полученного мутанта составила  $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ,  $3.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$  и  $3.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$  для токсических изомеров зомана, циклозарина и зарина, соответственно [95].

Похожий подход был использован для направленной эволюции фермента с  $\beta$ -галактозидазной активностью [93] и субтилизина Карлсберг [96].

### ***Микрофлюидная компартиментализация.***

Основными задачами микрофлюидики являются процессы манипулирования потоками жидкости на микроуровне и сопутствующие этому эффекты. Одним из наиболее значимых практических приложений микрофлюидики является возможность создания различных типов эмульсий, обладающих уникальной гомогенностью и крайне «мягкими» условиями получения [97]. Фактически микрофлюидная компартиментализация позволяет заключать как индивидуальные живые клетки, так и целые микроорганизмы в капли эмульсии одинакового размера (что является основным отличием от компартиментализации *in vitro*), сохраняя при этом их уникальные свойства и обеспечивая выживаемость в течение нескольких дней [98].

В настоящее время высокопроизводительный скрининг осуществляется на базе автоматизированных роботизированных станций, однако существует тенденция к переходу молекулярно-биологических и биофармацевтических платформ в формат «лаборатории-на-чипе», что приводит к миниатюризации оборудования, уменьшению расходов на реагенты и эксплуатацию, и что самое главное, многократному увеличению производительности [99, 100].

В работе [101] была использована модельная библиотека для демонстрации преимуществ отбора с помощью микрофлюидной технологии. Авторы показали, что по сравнению со стандартными методами скрининга, высокоэффективные эмульсионные методы в 100 раз эффективнее и в 1 млн. раз дешевле.

С помощью микрофлюидной технологии был проведен скрининг библиотеки мутантов пероксидазы хрена представительностью  $10^8$  вариантов генов, в результате чего был отобран мутант, обладающий каталитической эффективностью в 10 раз выше, чем дикий тип, который сам по себе является очень эффективным ферментом [102] (Рис. 12).

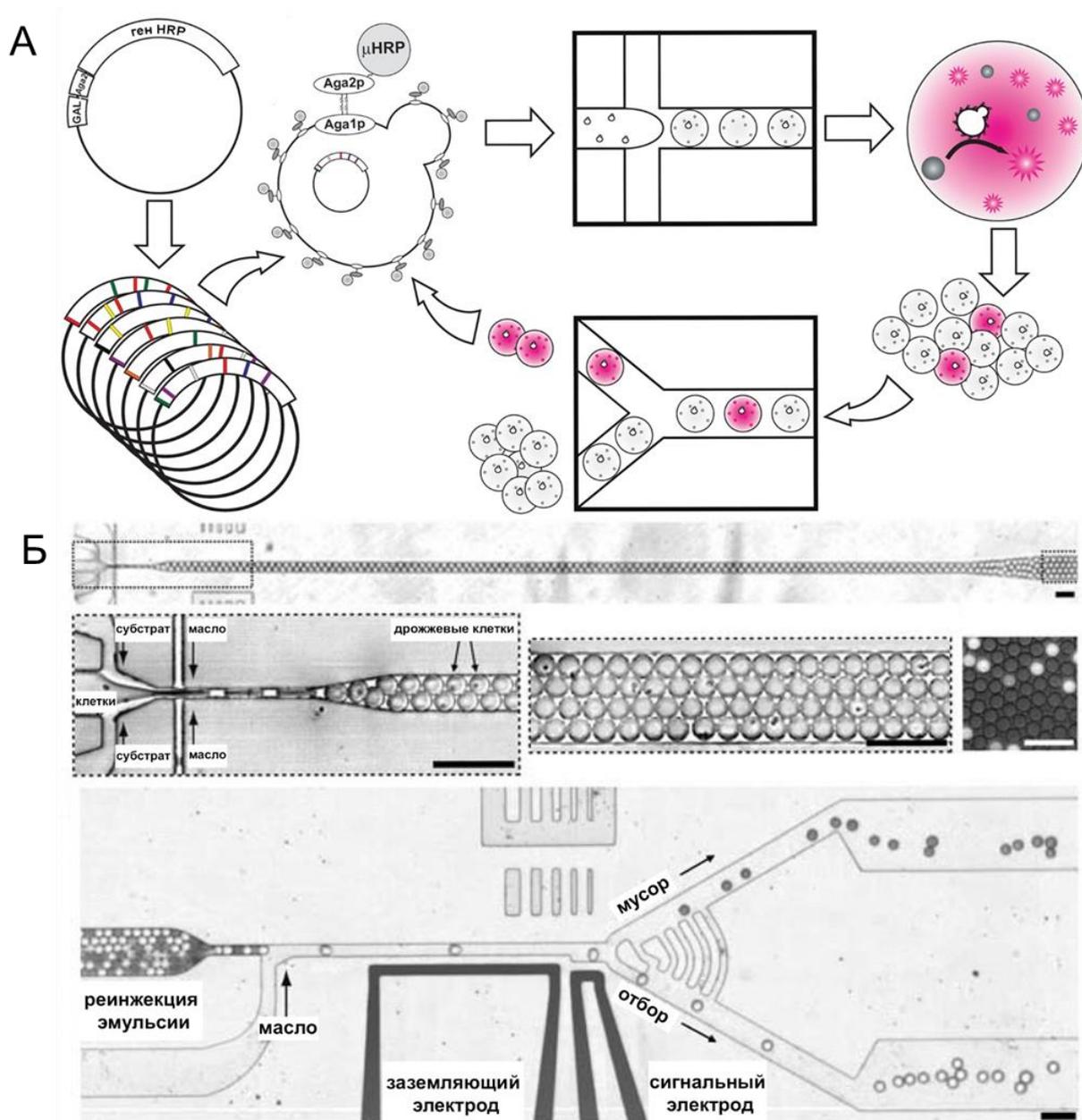


Рис. 12. Скрининг клеточной библиотеки вариантов пероксидазы хрена с использованием микрофлюидной технологии. (А) – общая схема метода, основанного на инкапсуляции клеточной библиотеки дрожжей, несущих варианты пероксидазы в капли однократной эмульсии, и их отбора в специально разработанном для этого микрофлюидном чипе. (Б) – микрофотография микрофлюидного чипа, использованного для отбора [102].

### 3.2. РАЦИОНАЛЬНЫЙ ДИЗАЙН, КАК СРЕДСТВО УЛУЧШЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ.

#### *Рациональный дизайн на основе экспериментальных данных.*

Каталитические антитела могут быть использованы в качестве матрицы для улучшения существующих свойств и/или создания новой функциональной активности. Первый шаг рационального дизайна состоит в анализе структурных данных, полученных из разных источников (кристаллическая структура; структура, полученная с помощью

ЯМР; кинетические данные (стационарная и пред-стационарная кинетики); термодинамические данные (дифференциальная сканирующая калориметрия, изотермическое калориметрическое титрование)). Все эти данные позволяют получить представление о том, как реакция развивается во времени и пространстве и что может быть рационально изменено для улучшения каких-либо свойств. Рентгеновские структуры высокого разрешения могут определить отдельные аминокислотные остатки или небольшие кластеры аминокислот в качестве претендентов для рационального мутагенеза. Этот подход был применен в ряде работ с использованием антител [103-105] и ферментов [106].

В работе [103] авторы использовали этот подход при соотнесении кинетических данных, полученных для каталитического антитела 43С9 и его структуры, что дало понимание каталитического механизма реакции. Антитело 43С9 гидролизует сложные эфиры и амиды. На основе компьютерной модели этого антитела, авторы выбрали остатки L-Y32, L-H91, L-R96, H-H35 и H-Y95 для сайт-направленного мутагенеза. Замена L-H91 на остаток глутамина привела к потере каталитической активности, но аффинность по отношению к лиганду осталась такой же, как и в случае дикого типа. Исходя из этого авторы предположили, что L-His91 является нуклеофилом, который образует ацильный интермедиат. L-Arg96 также оказался важен для катализа, предположительно он образует оксианионную полость для образования тетраэдрического переходного состояния. Замены H-His35 на остатки аспарагина и фенилаланина привели к потере каталитической активности и аффинности к лиганду, что свидетельствует о важной структурной роли этого остатка.

Реймонд и соавторы [105] исследовали антитело 10F11, катализирующее обратную реакцию Дильса-Альдера. Рентгеноструктурный анализ показал, что между остатком 104 тяжелой цепи H-W104, расположенным в нижней части связывающего кармана, и ароматическим кольцом субстрата образуются  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия. Используя кристаллическую структуру этого антитела, авторы выделили ряд аминокислот, которые могут играть важную роль в катализе. Экспериментальные данные показали, что остатки H-W104 и H-F101 играют важную роль в катализе. Замена обоих остатков на аланин показала, что триптофан более важен для катализа, чем фенилаланин. Катализ сохраняется, если заменить триптофан в положении 104 на ароматические аминокислоты, такие как тирозин или фенилаланин. В свою очередь, катализ пропадает с неароматическими заменами в данном положении на лейцин, изолейцин, аланин и гистидин. Для доказательства того, что H-W104 является каталитическим остатком, был создан мутант L-L101F, который, исходя из кристаллической структуры, должен был стерически приблизить

H-W104 к субстрату и, таким образом, увеличить силу взаимодействия. Действительно, мутант L-W101F обладал улучшенными кинетическими показателями ( $k_{cat}/K_M=258 \text{ сек}^{-1} \text{ M}^{-1}$  в случае мутанта и  $96 \text{ сек}^{-1} \text{ M}^{-1}$  в случае дикого типа).

Первые попытки создания мутантов БУХЭ, способных гидролизовать фосфорорганические токсины (ФОТ), были основаны на гипотезе, предложенной [107], согласно которой первый этап реакции взаимодействия БУХЭ с ФОТ, то есть стадия фосфорилирования, проходит аналогично стадии ацилирования при гидролизе ацетилхолина, а второй этап существенно отличается от стадии деацилирования при гидролизе ацетилхолина. На стадии деацилирования ацетилхолина, молекула воды, связанная с гистидином, вытесняет ацильную группу от каталитического серина, что приводит к гидролизу. В случае же ФОТ этого не происходит, так как стерически не возможна атака этой молекулы воды на тетраэдрический атом фосфора в соответствующем этапе гидролиза ФОТ и, таким образом, не происходит процесса реактивации фосфорилированного фермента с помощью воды. Таким образом, введение нуклеофильного остатка с другой стороны от связи фосфор-серин в активный центр фермента может либо активировать молекулу воды, либо напрямую атаковать аддукт, что будет приводить к реактивации фермента. Учитывая эту схему, остатки G115, G117, G121, E119, L286 и V288 человеческой БУХЭ были заменены на гистидин и только мутант G117H обладал способностью катализировать гидролиз ФОТ. Брумфилд и соавторы [108, 109], заменив глицин на гистидин вблизи оксианионной полости бутирилхолинэстеразы человека, получили эстеразу G117H, которая сохранила эстеразную активность, а так же приобрела способность катализировать гидролиз некоторых ФОТ, таких как зарин и VX, однако зоман необратимо ингибировал фермент. Предположительно, этот мутант не способен гидролизовать зоман потому, что скорость дефосфонирования осталась намного ниже скорости деакилирования (так называемое «старение» фермента, то есть необратимое ингибирование фермента, которое не поддается всем известным формам химической реактивации). В связи с этой гипотезой авторы предположили вторую модификацию бутирилхолинэстеразы – E197Q [106]. Полученный мутант G117H/E197Q уже обладал способностью гидролизовать зоман.

Однако поиски единичных замен являются сложной задачей, потому что антитела, как и ферменты, объединяют несколько функций для достижения связывания и катализа. Взятые в отдельности, эти эффекты могут быть слишком малы, что бы их можно было идентифицировать. В природе эта проблема решена путем созревания аффинности в ходе эволюции. Практическая реализация созревания аффинности *in vitro* с помощью стохастических мутаций довольно затруднительна.

### ***Рациональный дизайн на основе компьютерных методов.***

Применение современных компьютерных технологий оказывает огромную поддержку экспериментальным работам, позволяя существенно снизить временные и материальные затраты. В биохимии это стало возможным благодаря достижениям лауреатов Нобелевской премии по химии 2013 года. Ее получили Мартин Карплус (Martin Karplus), Майкл Левитт (Michael Levitt) и Ари Варшель (Arieh Warshel) за то, что с помощью классических и квантово-механических методов заложили фундамент для моделирования сложных химических систем, в том числе биомолекул. Сейчас сочетание классического и квантового подходов считают стандартом, но нынешние нобелевские лауреаты впервые совместили их, используя оба метода для расчета одной системы. Сложность одновременного использования классического и квантового подходов состоит в том, что модели, описывающие молекулы с помощью классической механики, рассматривают атомы и группы атомов как целое — у них гораздо меньше степеней свободы, и их проще проанализировать с помощью компьютера. Квантово-химические модели описывают отдельно электроны и ядра, что дает такое количество вариантов, которое не возможно рассчитать даже с использованием суперкомпьютеров. В настоящее время квантово-химическими методами возможно провести расчеты лишь для относительно простых молекулярных систем. Нобелевские лауреаты разработали комбинированный подход [110, 111]. Он сочетает квантово-химический подход, опирающийся на принципы квантовой механики (КМ), в котором система представляет собой совокупность электронов и ядер атомов, который применяется к активному центру, и метод молекулярной механики (ММ), в котором атом рассматривается как материальная точка, с помощью которого описывают остальную часть системы (рис. 13). В молекулярной механике молекула представляется совокупностью взаимодействующих атомов.

Методами ММ можно описывать большие молекулярные системы (белки, 106-109 атомов). Однако ММ методы не пригодны для описания разрывов и образования химических связей. В КМ подходах моделью молекулы является устойчивая система ядер и электронов. С помощью квантово-механических методов можно рассчитать образование и разрыв связей, но это возможно сделать только для не больших (меньше 1000 атомов) систем.

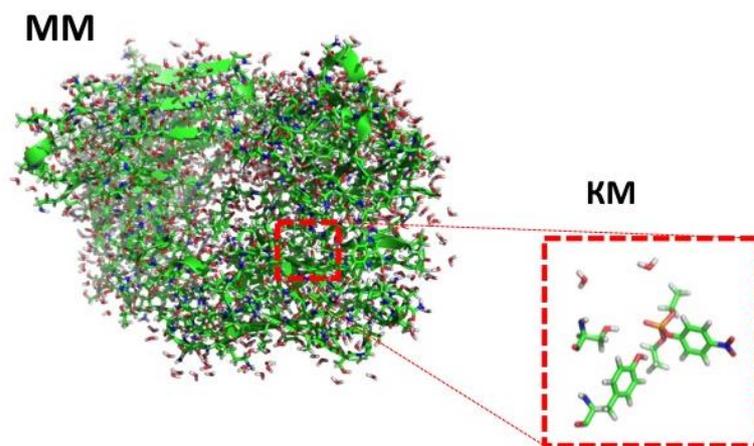


Рис. 13. Метод КМ/ММ. Методы КМ описывают активный центр белка, методы ММ описывают остальную часть системы.

Основное преимущество КМ/ММ методов заключается в их способности количественно описывать химические структуры, энергии и реакции. Хотя экспериментальные методы, такие как рентгеновская кристаллография, ЯМР и другие спектроскопические методы имеют решающее значение для изучения структуры фермента, они порой не в состоянии ответить на вопросы относительно детализации каталитического механизма. Вычислительные методы позволяют напрямую оценить характеристики комплексов фермент-субстрат и фермент-продукт, а также метастабильных интермедиатов и переходных структур. Моделирование также позволяет разложить энергию реакции на индивидуальные составляющие. Таким образом, компьютерное моделирование может дать важную информацию, которая является дополнением к экспериментальным данным [112].

### 3.3. НАПРАВЛЕННОЕ УЛУЧШЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ.

#### *Создание ферментов de novo.*

Дизайн белков de novo с применением методов структурной биоинформатики является активно развивающейся областью. Полученные результаты используются как в диагностике и лечении различных заболеваний, так и для создания новых биологических катализаторов.

В условиях, когда ограниченное число мутантов белков может быть экспериментально проверено, вычислительные методы дают возможности для создания широкого спектра новых белков: создание новых аминокислотных последовательностей для существующих структур [4, 113]; создание новых белков с уникальной последовательностью и ранее неизвестной топологией [114, 115]; создание ферментов с измененной субстратной специфичностью [116]; создание ферментов с совершенно новой

каталитической активностью [117, 118]; создание ферментов с оптимизированной связывающей аффинностью [119, 120]; создание новых пар связывающихся белков с направленной аффинностью и специфичностью [121]; создание вариантов с улучшенной термостабильностью [122] или иммуногенностью [123, 124] и так далее.

Прорывом в создании ферментов *de novo* является создание ферментов, катализирующих реакции, для которых не существует природных ферментов: реакция элиминации Кемпа [125], реакция Дильса-Альдера [118] и обратная альдозная реакция [126]. Этот прорыв стал возможен благодаря разработке вычислительных методов для эффективного дизайна различных комбинаций молекул и атомов внутри белков, способствующих к осуществлению любых химических реакций, прежде всего тех, которые не могут быть катализированы природными ферментами.

Создание ферментов *de novo* включает в себя несколько этапов. Во-первых, необходимо выбрать целевую реакцию и соответствующий каталитический механизм, в том числе определить все необходимые функциональные группы. Во-вторых, с помощью методов квантовой механики создается идеальный активный центр, который так позиционирует каталитические остатки, что создается максимальная стабилизация переходного состояния. Эти структуры, называемые “теозимы” (theozyme, theoretical enzyme, теоретический фермент) [127], далее встраиваются в разнообразные белковые каркасы. Полученные комплексы оптимизируются *in silico* с помощью комбинаторного поиска аминокислотных замен, которые приведут к улучшению связывания переходного состояния [128]. И, наконец, все полученные структуры фильтруются на основе их энергии связывания переходного состояния, соответствия проектируемого связывающего кармана и переходного состояния. Завершают процедуру создания *de novo* ферментов экспериментальная характеристика лидирующих теозимов.

Элиминация Кемпа – реакция превращения бензизоксазола в салицилонитрил – не встречающийся в природе процесс химической трансформации, в ходе которой происходит протонный перенос в атомах углерода. Активация этого протонного переноса в обычных условиях крайне затруднена из-за высоких энергетических барьеров, но в результате длительных экспериментов группе Хоука–Бейкера [125] удалось сконструировать ферменты-прототипы, способные инициировать эту трансформацию. Реакция элиминации Кемпа протекает с образованием одного промежуточного состояния, в котором основание (положительно заряженный аминокислотный остаток) депротонирует углерод и рассеивает получившийся отрицательный заряд, а другая группа (донор водородной связи) стабилизирует частичный отрицательный заряд на атоме кислорода фенола. Эта реакция может быть ускорена за счёт стабилизации переходного состояния за счёт

депротонирования атома углерода основанием, а также при помощи водородной связи. Авторы использовали два возможных варианта строения каталитического центра: одиночный карбоксильный остаток боковых цепей аспартата или глутамата (рис. 14Б слева) и имидазольная группа гистидина, позиционированная и поляризованная расположенными рядом аспартатом или глутаматом (рис. 14Б справа). Карбоксильные остатки депротонируют субстрат, а ароматические остатки сайта связывания ещё больше способствуют стабилизации переходного состояния за счёт стэкинга. Для каждого варианта каталитического основания были перепробованы все возможности по стэкингу (Trp, Tyr, Phe) и донору водородной связи (Lys, Arg, Ser, Tyr, His, молекула воды), далее эти конфигурации служили «отправной точкой» для программы RosettaMatch, «достраивавшей» фермент на одном из выбранных вариантов остова белка.

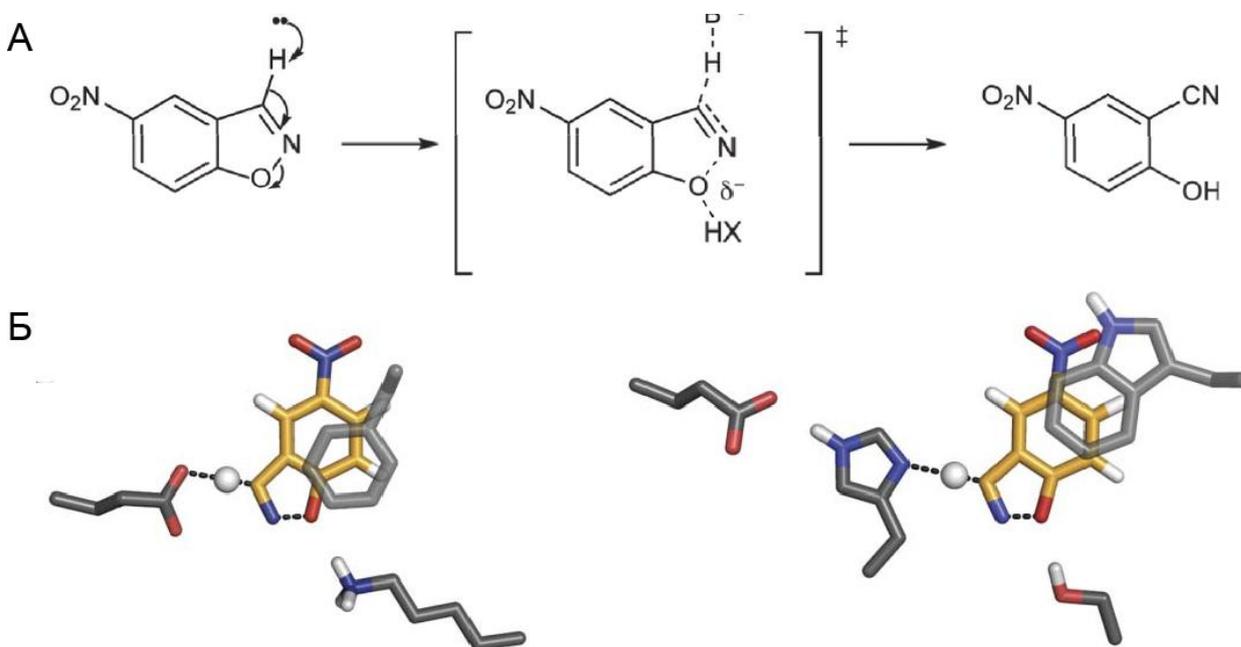


Рис. 14. (А) Схема реакции элиминация Кемпа. (Б) Аминокислотные остатки, использованные авторами для реконструирования каталитического центра биокатализатора [125].

Для обоих исследуемых случаев авторы включили дополнительные функциональные группы для облегчения катализа с использованием КМ/ММ методов. Донор водородной связи был введен для нейтрализации получающегося отрицательного заряда на фенольном кислороде. Для каждого из вариантов каталитического центра КМ/ММ методы использовались для оптимизации положения и ориентации каталитических остатков. 59 мутантов, 39 из которых содержали аспартат или глутамат в качестве основания, а 20 содержали диады гистидин-аспартат или гистидин-глутамат, были экспериментально охарактеризованы, в результате 8 мутантов оказались активными.

Рентгеноструктурный анализ одного из активных мутантов (KE07) показал высокое сходство с компьютерной моделью. Однако созданные мутанты были более чем на порядок менее эффективны, чем каталитическое антитело 34E4, катализирующее реакцию Кемпа, полученное ранее [129], поэтому мутанты KE07, KE70 и KE59 были использованы в качестве матрицы для дальнейшего случайного мутагенеза. В результате были получены мутанты, обладающие в 200 раз большей эффективностью ( $k_{cat}/K_M$ ), чем исходный фермент KE07 [130], в 400 раз большей эффективностью, чем KE70 [131] и в 2000 раз большей эффективностью, чем KE59 [132].

Похожий подход использован в работе [133], в которой исследовали элиминацию Кемпа, катализируемую каталитическим антителом 34E4 и его Glu50Asp мутантом. Экспериментально показано, что удаление одной метиленовой группы привело к 30-кратному уменьшению эффективности катализа реакции Кемпа. Авторы использовали расчеты возмущения свободной энергии (Free Energy Perturbation) в сочетании с КМ/ММ Монте Карло симуляцией. По сравнению ферментом дикого типа, рассчитанный активационный барьер для мутанта увеличился на 2.4 ккал/моль, это соответствует 60-кратному уменьшению активности, что соотносится с экспериментальными данными.

Выше было описано использование метода «реакционной иммунизации» для получения антитела 39A11, названное авторами Дильс-Альдеразой [134].

В 1998 году была получена пространственная структура этого антитела, которая позволила детально описать механизмы связывания исходных веществ в активном центре и снижения энергетического барьера превращения [135].

С точки зрения теории граничных орбиталей, реакцию можно представить как взаимодействие высшей занятой молекулярной орбитали (ВЗМО) электронодонорного диена и низшей свободной молекулярной орбитали (НСМО) диенофила. Авторы предположили, что уменьшение энергетического интервала между ВЗМО и НСМО должно привести к снижению энергии активации и положительно повлиять на увеличение скорости реакции. Это было достигнуто путем позиционирования акцептора водородной связи таким образом, чтобы он образовал водородную связь с NH-группой карбамата диена, нейтрализуя положительный заряд, накапливающийся в переходном состоянии, повышал энергию ВЗМО. Введение донора водородной связи позволило добиться образование контакта с карбонильной группой диенофила (Рис. 15). Проведенные КМ расчеты показали, что введенные водородные связи стабилизируют переходное состояние реакции на величину в 4.7 ккал/моль. В результате был получен мутант, обладающий в 100 раз большей эффективностью, чем исходный фермент.

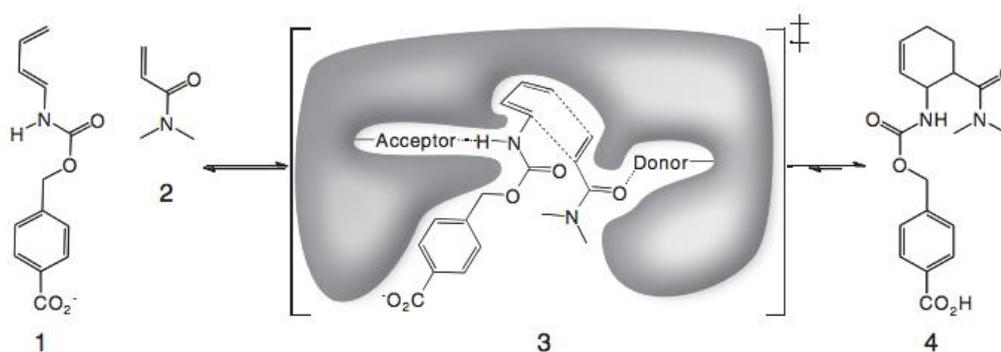


Рис. 15. Реакция Дильса-Альдера. Диен (1) и диенофил (2) подвергаются реакции [4+2]-циклоприсоединения (3) с образованием хирального циклогексенового кольца (4). На стадии (3) схематически показан активный сайт с акцептором и донором водородных связей, которые активируют диен и диенофил. Активный сайт ориентирует субстраты в позиции, оптимальной для катализа [118].

### ***Направленное улучшение функциональных свойств антител.***

Clark и др. [136] оптимизировали антитело AQC2 для связывания с I доменом человеческого интегрина VLA1. Для этого была использована молекулярную динамику, включающая в себя силовое поле CHARMM и программное обеспечение ICE, которое вычисляет электростатические взаимодействия и энергию десольватации. С помощью этого подхода удалось достичь улучшение аффинности связывания более чем в 10 раз.

Одним из очевидных преимуществ для оптимизации электростатических сил является то, что взаимодействия дальнего радиуса могут быть включены в процесс дизайна мутантных форм антител. Авторы спроектировали единичные мутации во всех позициях в гипервариабельных петлях, используя силовое поле CHARMM, ранжируя их с помощью электростатики Пуассона - Больцмана и показали, что четыре мутации (легкая цепь: N92A, тяжелая цепь: T28D, S57V, T58D) вместе генерируют 100-кратное улучшение аффинности по сравнению с диким типом (43 пМ против 4.4 нМ для дикого типа) [119].

Интересным способом использования компьютерного моделирования является определение выгодных позиций для экспериментального случайного мутагенеза. В таком исследовании Бардерас и соавторы [137] использовали компьютерное моделирование и методы молекулярной динамики для того, чтобы выбрать подходящие остатки для случайного мутагенеза в гипервариабельных петлях H-CDR3 и L-CDR3, что позволило увеличить аффинность антител к гастрину в 454 раз в сравнении с антителом дикого типа.

В работе [138] внимание было уделено изменению кросс-специфичности анти-протеазного антитела E2. Протеазный антиген MT-SP1 человека и эпителин мыши имеют 87% идентичной последовательности, но три поверхностных аминокислотных остатка, которые

контактируют с антителом, различаются. На основании комплексной структуры антиген-антитело MT-SP1/E2, была смоделирована структура эпитин/E2. Аминокислотные остатки антитела, которое контактирует с антигеном, отобрали для *in silico* мутагенеза, затем были предсказаны несколько мутаций, которые могут улучшить сродство к эпитину. Мутация T98R в CDR-H3 привела к наибольшему изменению свободной энергии. Последующие экспериментальные исследования подтвердили, что эта мутация привела к 14-кратному улучшению аффинности по сравнению с антителом дикого типа.

#### **4. БИОЛОГИЧЕСКИЕ АНТИДОТЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОТРАВЛЕНИЙ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ ТОКСИНАМИ**

Современные препараты, применяемые для профилактики и терапии отравлений ФОТ, требуют больших дозировок, длительного медикаментозного лечения и вызывают ряд тяжелых осложнений. Более того, до сих пор ведутся споры о дозировке и последовательности применения данных препаратов при острых отравлениях ФОТ [139]. Для преодоления этих и других трудностей была разработана концепция биологических антидотов [140].

##### **4.1. КОНЦЕПЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО АНТИДОТА**

Биологическими антидотами называют белки или антитела, способные нейтрализовать ФОТ. На рисунке 16 представлено схематическое изображение факторов влияющих на концентрацию ФОТ в организме. Из схемы видно, что для эффективной детоксикации скорость инактивации ФОТ биологическими антидотами должна во много раз превышать скорость диффузии ФОТ к биологическим мишеням ( $k_{OP} \gg k_{off}$ ), а время жизни биологического антидота в кровотоке должно быть максимальным ( $k_C \rightarrow 0$ ) [141].

К биологическим антидотам применяют ряд дополнительных требований:

- Иммунологическая толерантность;
- Отсутствие побочных физиологических эффектов;
- Стабильность при длительном хранении, устойчивость к воздействию высоких температур;
- Наличие удобной системы доставки препарата.

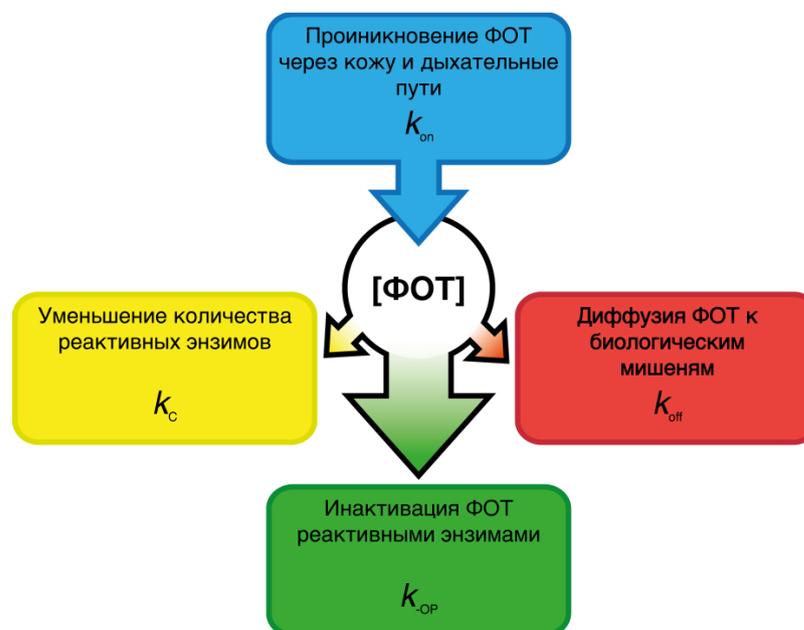


Рис. 16. Блок-схема факторов влияющих на концентрацию фосфорорганических токсинов в организме, адаптировано из [141].

Различают два вида биологических антидотов: стехиометрические и каталитические [142]. Стехиометрические антидоты инактивируют одну молекулу ФОТ на одно молекулу антидота. Каталитические антидоты способны гидролизовать ФОТ, другими словами – одна молекула антидота инактивирует множество молекул ФОТ.

Поиск белков и антител, удовлетворяющих концепции биологического антидота, является приоритетным направлением в поиске новых средств профилактики и терапии отравлений ФОТ [141].

#### 4.2. КАНДИДАТЫ НА РОЛЬ СТЕХИОМЕТРИЧЕСКОГО АНТИДОТА

##### *Ацетилхолинэстераза*

В рамках концепции биологического антидота ацетилхолинэстеразу человека (ЕС 3.1.1.7) можно рассматривать как классический стехиометрический антидот. Активный центр ацетилхолинэстеразы (Рис. 17) состоит из каталитической триады - S203, H447, D334; ацил-связывающего сайта, обрамляющего вход в каталитический центр фермента - Phe295, F297, F338;  $\pi$ -катион-связывающего сайта, стабилизирующего остаток холина - W86, Y337; и оксианионной полости, участвующей в стабилизации интермедиата - G121, G122, Ala204 [143].

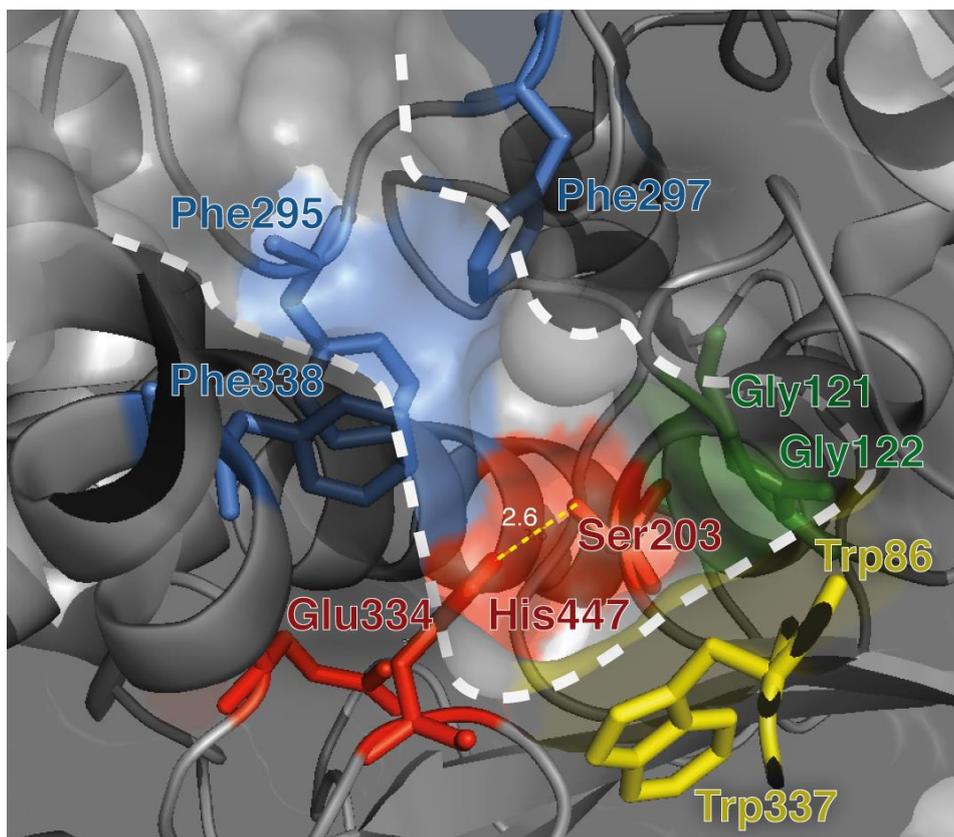


Рис. 17. Структура активного центра ацетилхолинэстеразы человека. Белой пунктирной линией обозначена граница разреза каталитического сайта фермента [pdb.org 2WG2].

Ацетилхолинэстераза быстрее многих других ферментов связывает фосфорорганические токсины [144]. Введение в кровь избытка изоформы АцХЭ-R позволяет временно защитить фермент в нервно-мышечных синапсах [145].

Альтернативные исследования, направленные на поиск мутаций активного центра АцХЭ, способных предотвратить ингибирование ФОТ. Введение мутации E202Q позволило на порядок снизить скорость ингибирования зоманом [146], другие мутации активного центра не привели к улучшению фермента [141].

### ***Параоксоназа***

Параоксоназа (PON1, EC 3.1.8.1) плазмы крови человека гидролизует многочисленные ФОТ и другие субстраты (Таблица 1) [147, 148]. Однако первичная функция, вероятно, заключается в том, что она является липофильной лактоназой, участвующей в защите от атеросклероза [149, 150]. Было показано, что животные, у которых концентрация PON1 в плазме высока, являются относительно устойчивыми к действию ФОТ, и напротив, мыши, нокаутные по PON1, очень чувствительны к ФОТ [151].

Таблица 1. Субстратная специфичность PON1 крови человека [147].

Субстрат	$k_{cat}$ мин <sup>-1</sup>	$K_m$ мМ	$k_{cat}/K_m$ М <sup>-1</sup> мин <sup>1</sup>
Фенилацетат	80000	0.7	$1,1 \times 10^8$
Лактон гомогенизиновой кислоты	37200	0.52	$7,2 \times 10^7$
$\alpha$ -Бутиролактон	16800	15	$1,1 \times 10^6$
Chlorpyrifos-онон	7800	0.075	$1,0 \times 10^8$
2-Сотмаганоне	7600	0.02	$3,8 \times 10^8$
Дигидрокумарин	7200	0.022	$3,3 \times 10^8$
Зоман	1150	0.42	$2,7 \times 10^6$
Параохон	340	0.5	$6,8 \times 10^5$
Зарин	190	0.21	$9,0 \times 10^5$
Гомогистидин трилактон	40	23	$1,7 \times 10^3$

Работы Дана Таффика (Dan Tawfik) сделали возможным получение параоксоназы из клеток *E.coli*, что во многом обеспечило популярность параоксоназы как объекта исследований [152]. В последних работах Таффика и коллегам с помощью метода направленной эволюции фермента удалось получить мутанты параоксоназы с улучшенной каталитической активностью ряда нервнопаралитических агентов типа «G» [94]. Множественность активности PON1 делают параоксоназу перспективным каталитическим биологическим антидотом и одновременно увеличивают потенциальную побочную активность фермента, ограничивая его применение в качестве лекарственного препарата [141, 153].

### **Антитела к ФОТ**

Силы, обеспечивающие связывание биомолекул с величиной константы диссоциации комплексов  $10^{-10} - 10^{-12}$  М, имеют одинаковую природу. Действительно, в образовании высокоаффинных комплексов ДНК-белок, гормон-рецептор, антиген-антитело, аналог переходного состояния ферментативной реакции-фермент участвуют водородные связи, Ван-дер-Ваальсовы, гидрофобные взаимодействия, ионные контакты. Согласно концепции Дженкса [53], взаимодействие фермент-аналог переходного состояния реакции можно имитировать связыванием антиген-антитело. Как отмечалось выше, идея Дженкса не получила в 1970-е гг. практически никакого подтверждения, так как требовала для своей практической реализации выделения «гомогенного по идентичным каталитическим центрам» препарата абзима, т.е. получения моноклональных антител.

Недавно был получен ряд антител, включая каталитическое антитело A17 и ряд его мутантов, способных эффективно связывать и превращать некоторые ФОТ и их аналоги

[57,58]. Использование необратимых ингибиторов сериновых гидролаз, таких как фосфонаты, являющихся аналогами ФОТ по механизму действия, позволяет проводить селекцию по способности активных биокатализаторов образовывать с ними ковалентные комплексы.

### ***Бутирилхолинэстераза***

Бутирилхолинэстераза (БуХЭ, ЕС 3.1.1.8) – сериновая гидролаза, обнаруживаемая практически во всех тканях млекопитающих, в частности в тканях легких, кишечника, печени и в сыворотке крови [154]. Физиологическая функция БуХЭ не выявлена, но считается, что она играет важную роль в поддержании и контроле активности нейротрансмиттеров ацетилхолина в центральной нервной системе и нервно-мышечных окончаниях [155].

Бутирилхолинэстераза и ее мутанты способны гидролизовать разнообразные сложные эфиры, в том числе бутирилтиохолин, ацетилхолин, героин, аспирин, кокаин и др. [156]. Обнаружена высокая реакционная способность БуХЭ стехиометрически связывать разнообразные токсины, ингибирующие ацетилхолинэстеразу. В частности, БуХЭ способна взаимодействовать с такими фосфорорганическими токсинами как зарин, зоман, газы VX и VR, и некоторые пестициды. Эти данные были получены в экспериментах на грызунах [157] и приматах [158]; при внутривенном или внутримышечном введении препарата очищенной БуХЭ из сыворотки крови человека, у животных обнаруживалась длительная устойчивость к действию нейропаралитических газов [159].

Сыворотка крови человека содержит 5 мг БуХЭ на литр крови и практически не содержит АцХЭ. Фракция эритроцитов, составляющая 40% от объема крови, содержит 0,5 мг АцХЭ на литр. Таким образом, содержание АцХЭ во всей крови человека приблизительно равно 2.5-3нМ, а содержание БуХЭ – 34-50нМ, превышая содержание АцХЭ более, чем в 10 раз [160], что делает БуХЭ главным кандидатом на роль естественного стехиометрического биологического антидота.

## **5. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА**

Как было отмечено выше бутирилхолинэстераза является одним из наиболее важных естественных стехиометрических биологических антидотов в организме человека. Высокие концентрации в крови обеспечивают устойчивость организма против действия 35-50нМ ФОТ. Однако для профилактики отравлений ФОТ в более высоких концентрациях

требуется увеличить содержание БуХЭ в крови; необходимое количество БуХЭ можно рассчитать.

Реакция необратимого ингибирования ФОС БуХЭ можно записать в виде следующего уравнения:



Т.к. концентрация ФОС при тяжелом отравлении сильно выше концентрации фермента в кровотоке ( $[E] \ll [OPX]$ ), то эту реакцию можно считать реакцией псевдопервого порядка. В этом случае, скорость реакции описывается уравнением 2:

$$v = -\frac{d[OPX]}{dt} = k_{-OP}[OPX] \quad (2)$$

где  $k_{-OP} = k_{II} \cdot [E]$ , и  $k_{II} = k_p / K_d$ .

Таким образом, концентрацию фермента, необходимую для инактивации заданного количества ФОС, можно рассчитать из уравнения 3:

$$[E] = \frac{\ln X}{K_{II} \cdot t} \quad (3)$$

Согласно приведенному выше уравнению, для эффективного связывания 4000нМ зарина с БуХЭ ( $K_{II}=1,3 \times 10^{-6}$ ) дикого типа за 1 минуту (время циркуляции крови в кровотоке) требуется приблизительно 340 мг фермента [141]. Большие количества фермента, требуемые для эффективной терапии отравлений ФОТ побуждают исследователей разрабатывать методы биотехнологического получения фермента.

### **5.1. СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ РЕКОМБИНАНТНОЙ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА**

В настоящее время бутирилхолинэстеразу человека получают очисткой плазмы крови. Современный протокол, опубликованный в 2005 году, рассчитан на обработку 100 литров плазмы крови человека за один цикл очистки. Широкомасштабная очистка БуХЭ из плазмы крови человека по данному протоколу занимает от 14 дней, требует специально подготовленных реактивов и посуды и имеет не более, чем 50% выход, однако позволяет получать БуХЭ 80% чистоты, да так же 100% очищенную БуХЭ используя дополнительные циклы очистки с помощью ВЭЖХ [158]. Из-за высокой цены исходного материала стоимость получения одной дозы очищенного по этому протоколу белка составляет несколько тысяч евро. Для наработки 2000 доз потребуется переработать годовой запас крови США [161]. Кроме того, существует опасность заражения образца опасными вирусами при использовании донорской плазмы. Тем не менее, БуХЭ очищенная из плазмы крови признана «золотым стандартом», против которого сравниваются все варианты БуХЭ и других биологических антидотов, полученных биотехнологическим путем [162].

Протокол промышленной очистки БуХЭ из плазмы крови защищен патентом US 20060194301A1. Недавно были проведены испытания на макаках-резусах (*M. mulatta*). Макакам вводили большие дозировки фермента (30 мг/кг) и наблюдали в течение 4-х недель их поведенческую активность и физико-химические показатели крови; по результатам исследования значимых отклонений от нормы выявлено не было, что свидетельствует о возможности применения БуХЭ плазмы крови человека в качестве средства профилактики отравлений ФОТ [163].

Альтернативным является получение рекомбинантного белка. Экспрессия белков в клетках прокариот является наиболее технологически простым и экономически выгодным методом получения рекомбинантных белков. Однако, попытки экспрессии БуХЭ в клетках *E. Coli* не были успешными. Из-за отсутствия необходимых посттрансляционных модификаций рекомбинантных полипептидных цепей и образования нерастворимых телец включения полученный рекомбинантный белок был не активен. Экспрессия в клетках дрожжей так же не привела к получению достаточного количества активного фермента [164].

Для преодоления этих и некоторых других затруднений в последнее время широко используются культивируемые клетки животных и растений. В 2002 году удалось получить рекомбинантную низкогликозилированную БуХЭ в нелимфоидных клетках линии СНО [165]. При наращивании клеток в роллере в течение длительного времени удалось получить 3-5 мг белка на литр ростовой среды. Хотя исследователями ставилась задача получения белка пригодного для кристаллизации, им удалось добиться концентрации рекомбинантного белка сопоставимой с концентрацией БуХЭ в плазме крови человека. Однако для большей экономической выгоды требуется увеличить уровень продукции до 50-100 мг на литр ростовой среды.

Ранее, в 1994 году, предпринимались попытки увеличения уровня экспрессии БуХЭ различными клеточными линиями, путем трансформации вирусом SV40. В эксперименте исследовался уровень экспрессии БуХЭ клетками линии CV-1, нормальными клетками почек африканской зеленой мартышки COS-1 и COS-7 клетками почек африканской зеленой мартышки, трансформированными вирусом SV40, MRC-5 и WI-38, нормальными человеческими эмбриональными клетками легких, MRC-50 SV40 и WI-38 VA13 человеческими эмбриональными клетками легких, трансформированных вирусом SV40. Авторам удалось увеличить уровень экспрессии БуХЭ клетками линии MRC-5, трансформированными вирусом SV40 в 150 раз, подняв экспрессию БуХЭ клетками до 7,5 мг на литр клеточной среды [166].

В 2007 году американскому исследователю Huang Y.J. с соавторами удалось создать трансгенных животных, из молока которых можно получать рекомбинантную БуХЭ. Ген БуХЭ был помещен под контроль  $\beta$ -казеинового промотора козы. Полученная генетическая конструкция была введена методом микроинъекции в пронуклеосы выращенных *in vitro* зигот коз. Проведенные исследования показали, что в литре молока трансгенных коз обнаруживается от 1 до 5 грамм активной БуХЭ. Однако полученный таким образом фермент недостаточно гликозилирован, что снижает его фармакологические показатели [167]. Правильное гликозилирование такого трансгенного белка потребует проведения дорогостоящих технических процедур, что сильно увеличивает стоимость конечного продукта. Проект казался перспективным [168]. Компания PharmAthene, Inc. анонсировала выпуск препарата Protexia®; в 2009 году трансгенный препарат прошел первую стадию клинических испытаний (NCT00333528 and NCT00744146), однако позже проект был закрыт в связи с нерентабельностью производства.

В 2010 году группе исследователей во главе с Цафриром Мором (Tsafrir Mor) удалось выделить активную БуХЭ из трансгенных растений табака Бентхама (*Nicotiana benthamiana*) [169]. Так как состав кодонов генома растений отличается от такового у человека, исследователи провели оптимизацию кодонов и изменив участки гена, влияющие на эффективность транскрипции и стабильность иРНК. Исследователи также уменьшили количество сайтов метилирования. В результате исследователям удалось получить трансгенные растения, с уровнем экспрессии БуХЭ до 1,3% от общей фракции растворимых белков (около 100 мг на килограмм сырой биомассы). Исследователи установили, что трансгенный энзим экспрессировался в тетрамерной форме, однако масса тетрамерного комплекса была ниже, чем у БуХЭ плазмы крови человека. Более детальное исследование *in vivo* в мышцах линии BALB/c показало, что фармакодинамические параметры «нативной» трансгенной БуХЭ оставляли желать лучшего – время полувыведения составило 7 минут.

## **5.2. ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РЕКОМБИНАНТНОЙ БУХЭ**

Группа Цафира Мора не единственная кто столкнулся с неудовлетворительными фармакокинетическими показателями рБуХЭ.

Наиболее распространенным способом увеличения продолжительности циркуляции препаратов рБуХЭ является ее химическая конъюгация с полиэтиленгликолем [169-171], позволяющая обеспечить увеличение периода полувыведения вплоть до 22 часов без возникновения иммунного ответа, что было продемонстрировано в том числе и на гомологичной модели при введении препарата обезьянам [172]. Химическая конъюгация с

полиэтиленгликолем не приводит к потере активности рчБуХЭ и позволяет добиться 75% выживаемости подопытных животных после введения  $2 \times LD_{50}$  зомана [169] и 100% после введения  $2.5 \times LD_{50}$  VX [173] по сравнению с полной гибелью подопытных животных в контрольных группах. Продолжительность циркуляции рчБуХЭ в плазме также может быть многократно улучшена за счет ее продукции в виде белка слитного с сывороточным альбумином человека (ЧСА) [174]. Полученный слитный белок массой 150 кДа обладает специфической активностью и средним временем удерживания (MRT) 32 часа по сравнению с 3 часами у рчБуХЭ.

Альтернативным подходом к увеличению продолжительности циркуляции рчБуХЭ в кровотоке является сборка тетрамерного комплекса рчБуХЭ (4рчБуХЭ). *In vivo* сборка 4рчБуХЭ происходит в клетках печени. Структура чБуХЭ характеризуется наличием каталитической глобулы и С-концевого домена (Рис. 15), ответственного за тетрамеризацию. Природная чБуХЭ тетрамеризуется благодаря высокоаффинному взаимодействию пролин-богатого пептида (PRAD-пептида) PSPPLPPPPPPPPPPPPPPPPPPPLP белка ламеллиподина с четырьмя С-концевыми доменами чБуХЭ [175]. Самосборка тетрамерного комплекса 4рчБуХЭ может осуществляться при инкубации мономерной рчБуХЭ в присутствии 17-50 мерных синтетических пептидов полипролина [176]. Имитация механизмов самосборки 4рчБуХЭ за счет внутриклеточной экспрессии PRAD-пептида приводит к увеличению доли продуцируемой 4рчБуХЭ благодаря *in vivo* олигомеризации рчБуХЭ [177]. Более того, последующее химическое полисиалирование с использованием препарата окисленных полисиаловых кислот (ПСА) с молекулярной массой 27 кДа проходит с минимальным падением активности БуХЭ и приводит к получению конъюгата рчБуХЭ-ПСА27 (Рис. 16) с улучшенными фармакокинетическими свойствами (MRT смеси олигомеров  $\approx 3.7$  часа, MRT рчБуХЭ-ПСА27  $\approx 23$  часа). Таким образом, полисиалирование является привлекательной альтернативой модификации полиэтиленгликолем ввиду того, что биоразлагаемые полисиаловые кислоты, в отличие от полиэтиленгликоля, подвергаются полной деградации в организме, что позволяет избежать ладонно-подошвенного синдрома. Внутривенное введение препарата рчБуХЭ-ПСА27 приводит к более чем четырёхкратному увеличению  $LD_{50}$  у животных, подвергшихся воздействию ФОТ VR.

Будучи суицидальным ингибитором, рчБуХЭ всегда необходимо вводить в стехиометрических или больших количествах по сравнению с ФОТ, что может ставить под сомнение целесообразность широкомасштабного применения препаратов рчБуХЭ в качестве антидота при отравлении ФОТ. Решение данной проблемы заключается в переходе от необратимого связывания рчБуХЭ с ФОТ к катализу. Для этого требуется осуществить

стадию реактивации фермента. Использование новых высокоэффективных синтетических аналогов классических реактиваторов-оксимов, специфичных по отношению к чБуХЭ, представляет собой один из вариантов решения данной проблемы [178, 179] при котором “псевдокаталитический” гидролиз ФОТ осуществляется за счет реактиватора. К сожалению, данный метод не является универсальным, так как каждый отдельно взятый ФОТ образует с чБуХЭ аддукт с уникальной структурой и реакционными свойствами. Более того, специфичность и, как следствие, эффективность реактиваторов сильно отличается и напрямую зависит от структуры аддукта чБуХЭ-ФОТ. Таким образом, оказывается весьма проблематично подобрать универсальный реактиватор, одинаково эффективный по отношению ко всем ФОТ. Кроме того, многие аддукты чБуХЭ-ФОТ подвержены “старению” – процессу деалкилирования ФОТ, приводящего к образованию стабильного аддукта чБуХЭ-ФОТ, неспособного к реактивации.

Создание мутантов рчБуХЭ, обладающих способностью к самореактивации (т.е. каталитическому гидролизу ФОТ) и неподверженных старению, представляет большой интерес [180, 181]. Тем не менее, недавний пример практического применения двойного мутанта рчБуХЭ G117H/E197Q для терапии отравлений ФОТ наглядно продемонстрировал тот факт, что если возникновение самореактивации и замедление старения понижают эффективность связывания ФОТ с рчБуХЭ, то ингибирование эндогенной АцХЭ будет происходить значительно раньше и никакой защитный эффект не будет достигнут [169]. Иными словами, создание эффективных каталитических антидотов возможно только в том случае, если они либо обладают высокоэффективным связыванием (по аналогии с рчБуХЭ дикого типа), либо обладают чрезвычайно эффективным катализом ( $k_2/K_M \approx 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ ), что было продемонстрировано на примере модифицированных вариантов параоксоназы и фосфотриэстеразы [182, 183], обладавших протективным действием по отношению к  $2 \times LD_{50}$  циклозарина (GF) и VX при введении фермента в дозе всего лишь 0.2 мг/кг и 2 мг/кг соответственно. В то же время эти ферменты обладают высокой иммуногенностью и крайне быстрым выведением из плазмы крови, что требует проведения их дополнительной модификации или использования липосом в качестве инкапсулирующего агента.

Таким образом, следует отметить, что препараты чБуХЭ из плазмы крови представляют большой интерес для профилактики отравлений ФОТ ввиду низкой иммуногенности и высокого периода полувыведения, однако их высокая стоимость, высокая терапевтическая доза, а также и потенциальная возможность контаминации вирусами серьезно ограничивают их практическое применение. Увеличение продолжительности циркуляции рчБуХЭ также представляет высокую значимость ввиду создания мутантов чБуХЭ, способных к высокоэффективному гидролизу кокаина [184-

186]. Внутривенное введение мутантной БуХЭ позволяет не только защитить от летальных доз кокаина, но и отменить наркотическую зависимость [187]. В то же время наибольший интерес представляет направленная эволюция рЧБуХЭ с целью создания мутантов, обладающих возможностью к реактивации (т.е. каталитическому гидролизу ФОТ), сохраняющих при этом высокую аффинность по отношению к ФОТ или обладающих высокоэффективным катализом. Создание мутантов ЧБуХЭ, устойчивых к ингибированию ФОТ, также может представлять интерес с целью создания трансгенных животных, обладающих повышенной выживаемостью при отравлении ФОТ [188, 189].

Резюмируя обзор современных биотехнологических методов получения БуХЭ можно сделать следующие выводы:

- Получение «золотого стандарта» - БуХЭ из плазмы крови человека – дорогостоящий процесс, осложненный возможностью контаминации препарата патогенами из зараженной плазмы;
- Экспрессия рБуХЭ в клетках бактерий и дрожжей не привела к получению активного фермента;
- Перспективный проект по получению рБуХЭ в трансгенных животных закрыт в связи с нерентабельностью производства
- Несмотря на высокий уровень продукции активной рБуХЭ в трансгенных растениях, применение этого препарата в качестве медикамента невозможно. На сегодняшний день FDA не одобрило использование трансгенных растений для получения препаратов рекомбинантных белков, пригодных для инъекции в кровь человека;
- Из всех существующих на сегодняшний день систем экспрессии рБуХЭ, в клеточных линиях, одобренных регулирующими органами (FDA, Минздрав РФ), однако существующий уровень продукции (2-5 мг/л) делает применение этой системы в промышленных масштабах не рентабельным.

## Материалы и методы.

### Химические реактивы и сопутствующие материалы

В работе использовались следующие реактивы и материалы:

**Реактивы:** трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), персульфат аммония, тетраборат натрия, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА); одно- и двузамещенный фосфат натрия, одно- и двузамещенный фосфат калия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид магния, хлорид кальция, хлорид марганца, бромистый этидий,  $\beta$ -меркаптоэтанол, глицин, акриламид, N',N'-метиленбисакриламид, додецилсульфат натрия (ДСН) (Sigma, США), мочевины; агар, пептон, триптон, дрожжевой экстракт (BD, США); изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид ИПТГ (Thermo Fisher Scientific, США); источник дрожжевых азотистых оснований (YNB) (BD, США); метанол, биотин (Sigma, США), глюкоза, глицерин, сорбитол (Sigma, США); ацетат лития (Sigma, США), натрия (Amresham, США), 2,3-дипальмитоил-sn-глицеро-1-фосфохолин, 2-диолеол-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин и диолеол-триметиламмония-пропан, маннозилированный фосфатидилэтанолламин, дитиотреитол, имидазол, сульфат аммония, (Sigma, США); агароза, N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (Amresco, США); Тритон-X100, ТВИН20, уксусная кислота, ацетонитрил (Panreac, США); DMEM, GlutaMAX (Gibco, США), ProCHO4 (Lonza, Швейцария), аминокислоты: глутаминовая кислота, метионин, лизин, лейцин, изолейцин (Sigma, США); минеральное масло (Sigma, США); набор силиконовых эластомеров Sylgard® 184 (Dow Corning, США).

**Ферменты:** термостабильная ДНК-зависимая ДНК-полимераза HS-Taq (Евроген, Россия) и Encyclo (Евроген, Россия); щелочная фосфатаза (Thermo Fisher Scientific, США); Rapid DNA Ligation kit (Thermo Fisher Scientific, США); РНКаза А (Thermo Fisher Scientific, США); эндонуклеазы рестрикции и соответствующие стандартные буферные растворы (Thermo Fisher Scientific, США); дезоксирибонуклеаза I (Фармстандарт, Россия); энтеропептидаза, легкая цепь, была любезно предоставлена с.н.с. Гаспарян М.Э. (ИБХ, Россия).

**Субстраты:** бутирилтиохолина йодид – BTC (Sigma, США); дитио-5,5-бис(2-нитробензойная кислота) – DTNB (Sigma, США); Gly-(Asp)<sub>4</sub>-Lys-нафтиламид (Sigma, США); FRET-олигонуклеотид FAM-AAAAAACCSCCCCATATAGCGCGTTTTTTT-RTQ1 (Синтол, Россия); SensoLyte Rh110 субстрат энтерокиназы (AnaSpec, США); 3-(7-гидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-илкарбамоил)акриловой кислоты метиловый эфир (Millipore, США).

**Маркеры** размера фрагментов ДНК и молекулярной массы: GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; Pierce™ Prestained Protein Marker 20-120 кДа (Thermo Fisher Scientific, США); PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder 10-250 кДа (Thermo Fisher Scientific, США).

**Поверхностно-активные вещества** и модификаторы: Abil EM 180 (Evonik, Германия); Pico-Surf 2, 2% в HFE-7500 (Dolomite, Великобритания), Pluronic F-127 (Sigma, США); поливиниловый спирт Mowiol 23-88 (Kuraray Specialities Europe, Германия), трихлор(октадецил)силан (Sigma, США), Aquapel (PPG Industries, США).

**Фосфорорганические соединения:** параоксон – POX (Sigma, США); параоксон-резорурфин – POX-R (Annova Chem, США), аналог зомана – GD<sub>C</sub> был любезно предоставлен проф. Массоном П. (КФУ, Россия), арил-фосфонат (фосфонат X) и его биотинилированный аналог, LAEEEEV-фосфонат и его биотинилированный аналог, Val-фосфонат, VR.

**Антитела и конъюгаты:** козы антитела к Fc фрагменту мышинных IgG; козы антитела к Fc фрагменту мышинных IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена; нейтравидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) конъюгат моноклональных антител мыши к HA-эпитопу с флуоресцентным красителем Alexa 488, 26183-A488 (Thermo Fisher Scientific, США).

**Хроматографические колонки и сорбенты:** металлохелатный сорбент Ni-NTA (Qiagen, Германия), MonoQ 5/50 GL и 10/100GL, Superdex200 10/300 GL и 16/600; Superdex75 10/300 GL и 26/600, HiTrap Phenyl HP, HiTrap Desalting, Protein A Sefarose (GE Healthcare, Великобритания), XBridge BEH300 C4 (Waters, США).

**Плазмидные вектора:** pUC19 (Invitrogen, США); pBluescript II KS- (Invitrogen, США); pFUSE-mIgG2B-Fc2 (Invivogen, США); pFUSE-hIgG1-Fc (Invivogen, США); pRc/CMV (Invitrogen, США); pGS/CMV/BChE был любезно предоставлен проф. Массоном П. (КФУ, Россия), pPicZαA (Invitrogen, США); pPIC9k (Invitrogen, США); pBudCE/EF/BChE [177], pHENm/L-HEP/C122S [190] (ранее получены в лаборатории биокатализа ИБХ), pBE-rhDNaseI был любезно предоставлен компанией Фармсинтез.

**Бактериальные штаммы:** *E. coli* DH5α Δ(*argF-lac*)169, φ80*dlacZ58*(M15), Δ*phoA8*, *glnX44*(AS), λ<sup>-</sup>, *deoR481*, *rfbC1*, *gyrA96*(NalR), *recA1*, *endA1*, *thiE1*, *hsdR17*; *E. coli* BL21(DE3) F<sup>-</sup> *ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)* λ(DE3 [*lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5*]) [*malB*<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>(λ<sup>S</sup>) (Thermo Fisher Scientific, США).

**Дрожжевые штаммы:** *Pichia Pastoris* GS115 (Invitrogen, США).

**Клеточные линии:** CHO-K1, NSObcl2 (ATCC, США) и FreeStyle™ 293-F (Thermo Fisher Scientific, США).

**Животные:** мыши линий SJL/J и BALB/c (ФИБХ РАН, Россия); мыши, нокаутированные по гену БуХЭ (КО), были любезно предоставлены проф. Креси Э. (CNRS, Франция) и были генотипированы непосредственно перед каждым экспериментом.

#### **Растворы**

Все растворы готовились на воде особой чистоты из установки Milli-Q (Millipore, США). Все растворы для микрофлюидной компартиментализации (за исключением суспензии клеток) подвергались фильтрации с использованием фильтров с диаметром пор 0.22 мкм.

1xPBS: 8.0 г/л NaCl, 0.2 г/л KCl, 1.15 г/л Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 г/л KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2.

1xTBE: 89 mM трис-основание, 89 mM борная кислота, 2 mM ЭДТА, pH 8.0.

TE: 10 mM Трис-HCl, 1mM ЭДТА, pH 8.0.

TN: 10 mM Трис-HCl, 100mM NaCl, pH 7.5

Соленый спирт: 70% EtOH, 30% 0.14M NaCl.

#### **Бактериальные среды**

LB: 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl.

LB-агар: LB, 18 г/л агара.

2xYT: 16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl (5 г/л NaCl для плазмид с устойчивостью к зеоцину).

2xYT-агар: 2xYT, 18 г/л агара.

SOB: 20 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0.5 г/л NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>.

SOC: SOB, 50 mM глюкоза.

#### **Дрожжевые среды**

YPD: 10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона, 20 г/л глюкозы.

YPD-агар: YPD, 18 г/л агара.

BMGY: 10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона, 100 mM калий-фосфата pH 6, 13.4 г/л YNB, 0,4 мг/л биотина, 10 г/л глицерина.

BMMY: 10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона, 100 mM калий-фосфата pH 6, 13.4 г/л YNB, 0.4 мг/л биотина, 0.5% метанола.

BMMY-агар: BMMY, 20 г/л агара.

#### **Антибиотики**

Раствор натриевой соли ампициллина (Синтез, Россия) в воде с концентрацией 100 мг/мл (1000X), водный раствор генетицина (Thermo Fisher Scientific, США) 100 мг/мл и водный раствор зеоцина (Thermo Fisher Scientific, США) с концентрацией 100 мг/мл, гигромицина В (Thermo Fisher Scientific, США) с концентрацией 150 мг/мл.

## Методы работы с нуклеиновыми кислотами

### Аmplификация фрагментов ДНК методом полимеразной цепной реакции

Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе T100 (BioRad, США). Готовили инкубационную смесь следующего состава:

однократный буфер для Taq-полимеразы (Евроген, Россия);

10 пмоль каждого праймера (Евроген, Россия);

0.2 mM смеси дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (Thermo Fisher Scientific, США);

1-2 ед. Taq-полимеразы (Евроген, Россия),

1-10 нг ДНК-матрицы.

Аmplификацию проводили в объеме одной реакции 20-50 мкл по следующей схеме:

#### А

предварительная денатурация 94°C, 1 мин.

1 цикл.

#### Б

денатурация 94°C, 15 сек.

отжиг праймеров X°C, 30 сек.

элонгация 72°C, Y сек (рассчитывалась исходя из длины ампликона с учетом скорости элонгации ≈1000 пар/мин).

25-30 циклов.

#### В

элонгация 72°C, 5 мин.

1 цикл

Расчет температуры для отжига праймера (X) производили по формуле:

$$X = 2^{\circ}\text{C} \times n (\text{A/T}) + 4^{\circ}\text{C} \times n (\text{G/C})$$

где n - число соответствующих нуклеотидов. Для праймеров длиной более 24 нуклеотидов использовали температуру отжига 68°C или максимальную возможную температуру, определенную экспериментально.

### Рестрикция

Рестрикцию ПЦР-продуктов вели 14-16 часов, плазмидной ДНК – 1-2 часа, в водном термостате при 37°C/30°C. При рестрикции плазмидной ДНК, в последние 10 минут инкубации добавляли РНКазу А до конечной концентрации 1 мкг/мл.

### Лигирование

Для лигирования использовали Rapid DNA Ligation kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Лигирование вели в объеме 20 мкл, при

молярном соотношении вектора и вставки 1:5-10, в течение 1 часа температуре 22°C. Затем в лигазную смесь добавляли 1/10 объема тРНК (соосадителя), обрабатывали равным объемом смеси 1:1 фенол-хлороформа, и переосаждали водную фазу 3 объемами этанола. Центрифугировали 10 минут 16000 g при комнатной температуре, промывали осадок 70% спиртом, затем растворяли в 6 мкл воды.

#### **Выделение плазмидной ДНК**

Отдельную бактериальную колонию инокулировали в 5 мл среды LB или 2xYT с добавлением селективирующего антибиотика и растили при 37°C, с интенсивной аэрацией 220-250 об/мин, в течение 18-22 часов. Клетки осаждали центрифугированием в течение 2 минут при 3000 g, после чего ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера (50 mM глюкоза, 25 mM Трис-НСl pH 8.0; 10 mM ЭДТА) и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Добавляли 400 мкл свежеприготовленного раствора 0.2 M NaOH, 1% ДСН, перемешивали переворачиванием и инкубировали 5 минут на льду. Затем быстро нейтрализовали 300 мкл ледяного 7.5 M NH<sub>4</sub>OAc, перемешивали переворачиванием и инкубировали 10 минут на льду до образования белого осадка, который осаждали центрифугированием в течение 10 минут при 16000 g и комнатной температуре. Супернатант переносили в новую пробирку с 0.6 объема (540 мкл) изопропанола, перемешивали переворачиванием до образования белого осадка, центрифугировали в течение 10 минут при 16000 g и комнатной температуре. Осадок ресуспендировали в 100 мкл ледяного 2 M NH<sub>4</sub>OAc и инкубировали в течение 5 минут на льду, после чего центрифугировали 3 минуты при 16000 g и 0°C. Супернатант переносили в пробирку с 100 мкл изопропанола и инкубировали 10 минут при комнатной температуре, после чего центрифугировали в течение 10 минут при 16000 g и комнатной температуре. Осадок дважды промывали 900 мкл соленого спирта, подсушивали и растворяли в 20 мкл TE.

Также для выделения и очистки плазмидной ДНК, использованной для проведения трансформации дрожжей и трансфекции, были использованы наборы для выделения и очистки методом колоночной хроматографии с дополнительной стадией промывки выделяемой ДНК раствором для удаления эндотоксинов (Евроген, Россия).

#### **Электрофорез ДНК в агарозном геле**

Для проведения электрофореза использовали 0.8-1.5% агарозный гель, приготовленный на однократном TBE с бромистым этидием в концентрации 0.5 мкг/мл. Пробы смешивали в соотношении 5:1 с буфером нанесения, содержащим 10 mM Трис-НСl pH 7.6, 0.03% бромфенолового синего, 0.03% ксиленцианола, 60% глицерина и 60 mM ЭДТА. Электрофорез проводили в буфере TBE при напряжении 100 В. По окончании

электрофореза ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм на трансиллюминаторе (ЛКВ, Германия).

#### **Электрофорез ДНК в полиакриламидном геле**

Для проведения электрофореза использовали 5% полиакриламидный гель, (соотношение акриламида и бисакриламида 19:1), приготовленный на однократном ТВЕ. Толщина аналитического геля составляла 0.75 мм, препаративного – 1 мм. Процесс осуществляли на приборе ЕС-200 (ЕС Apparatus, США). В течение 30 минут проводили предварительный электрофорез при 90 В, после чего пробы смешивали в соотношении 5:1 с буфером нанесения, содержащим 10 мМ Трис-НСl pH 7.6, 0.03% бромфенолового синего, 0.03% ксиленцианола, 60% глицерина и 60 мМ ЭДТА и наносили на гель. Электрофорез проводили при 90-120 В. По окончании электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл) и визуализировали в ультрафиолетовом свете.

#### **Электроэлюция**

После завершения электрофореза, гель окрашивали в растворе бромистого этидия (1 мкг/мл) и визуализировали в ультрафиолетовом свете, после чего вырезали нужный фрагмент геля, помещали его в диализный мешок с 50-80 мкл однократного ТВЕ и проводили электрофорез при 100 В в течение 30 минут. К элюату ДНК добавляли раствор NaCl до 0.14 М, обрабатывали смесью фенол-хлороформ 1:1, перемешивали, центрифугировали 5 минут при 16000 g и комнатной температуре. Водную фазу осаждали 3 объемами этанола, центрифугировали 10 мин при 16000 g и комнатной температуре, осадок промывали соленым спиртом, высушивали и растворяли в 20 мкл ТЕ.

#### **Секвенирование плазмидной ДНК**

Для секвенирования плазмиды добавляли 1 мкл РНКазы А и инкубировали 15 минут при 37°C. После чего добавляли 25 мкл 2 М NH<sub>4</sub>ОAc и 75 мкл изопропанола, инкубировали 10 минут при комнатной температуре и центрифугировали при 16000 g и 0°C. Осадок дважды промывали 900 мкл соленого спирта, подсушивали и растворяли в 20 мкл ТЕ. Секвенирование плазмидной ДНК проводили при помощи автоматического секвенатора ABI PRISM в межинститутском ЦКП «Геном» ИМБ РАН.

#### **Создание генетических конструкций для экспрессии рекомбинантных белков gp13 и gp15 в прокариотической системе.**

Участки gp120 I, II и III, соответствующие консервативным регионам белка были получены методом ПЦР со специфических праймеров:

1. ACC ATG GCT ACAGAAAAAT TGTGGGTCA
2. CCACAAGAAGTAGTATTGAGCTGCAACACCTCTGT
3. ACAGAGGTGTTGCAGCTCAATACTACTTCTTGTGG

4. TAGAAATTA TTGTACACATTGTAACATTA GT

5. АСТААТГТТАСААТГТГТАСААТТААТТТСТА

6. GCACCCACCAAGGCAAAGCTGGATCCT

Матрицей для синтеза фрагментов послужил ген HXB2-env, клон которого был любезно предоставлен AIDS, США (Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIH). Фрагменты I-II и II-III, а затем полная последовательность I-III были объединены в гибридный ген методом ПЦР с перекрывающихся олигонуклеотидов «splicing by overlap extension PCR». Конечный продукт был клонирован в плазмиду pET28a с использованием рестриктных сайтов *NcoI-BamHI* и с сохранением открытой рамки считывания с бХГис последовательностью. Таким образом, была получена конструкция для экспрессии рекомбинантного белка gp13 – pET28a/gp13. Последовательность ДНК, соответствующая пептиду mbp89-104, была получена из двух перекрывающихся праймеров:

7. AAGCTTGCGGCCGCAGTAGTCCATTTCTTCAAGAACATTTGTGACACCTCGA

8. CTCTAGACTCGAGTTAGGATGGAGGTGGTGTTCGAGGTGTCACAATGTTCT

Полученный фрагмент был клонирован по содержащимся на концах сайтам рестрикции *NcoI-XhoI* в плазмиду pET28CH, несущую перед встраиваемым фрагментом эпитоп рb2мус. Последовательность gp I-III, была клонирована в полученную плазмиду по сайтам рестрикции, указанным для нее выше. Таким образом, была получена конструкция для экспрессии рекомбинантного белка gp15 – pET28CH/gp15. Корректность сборки экспрессионных конструкций была подтверждена секвенированием.

#### **Создание генетических конструкций для экспрессии антитела A17 в клетках млекопитающих**

Вектор pSV40/Zeo2 Lch, содержащий константный домен капша легкой цепи с введенными сайтами для клонирования переменного фрагмента легкой цепи антитела A17 был получен на основе вектора pSV40/Zeo2 (Invitrogen). Лидерного пептид для легких цепей антитела - L prom leader был амплифицирован методом ПЦР с использованием трех праймеров с перекрывающимися последовательностями:

9. LpromForw CTC TTC TGA CCA GGT CTT TCT TAT AAG CAA

10. LpromRev GAC ATC TTG CTG ACT CAG TCT CCA GC

11. LpromRevSacII TTT CCA GCC TCC CGC GGT GAC ATC TTG C

и клонирован в промежуточный вектор pBluescript II KS. Ген, кодирующий константной домен капша 1 легкой цепи, был получен амплификацией с помощью ПЦР, с использованием в качестве матрицы геномной ДНК человека и специфических праймеров:

12. CLforw1 ATC AAG AAT TCA CCC AGA TAG GAG TAT CTT CAT AGC ATG T  
13. CLrev1polyA AAG GAA GAT CTA AAT GAG GAA AGA GAG AAA CCA CAG GTG  
CAA AGA и также клонирован в промежуточный вектор pBluescript II KS.

Для получения экспрессионной конструкции полученный фрагмент L prom leader – Clcarra с участком полилинкера вектора переставляли в плазмиду pSV40/Zeo2 по сайтам узнавания *SalI* и *XhoI*, соответственно.

Участок ДНК, кодирующий VL фрагмент легкой цепи антитела A17, был амплифицировали с помощью ПЦР с использованием плазмиды pHEN2\_A17 в виде матрицы и пары специфических праймеров:

14. VI A17SacIIforw TTA CGC CGC GGT CAG TCT GTG CTG ACG CAG

15. VI A17XhoIrev CTA GGA CCT CGA GCT TGG TCC CTC CGC

Для получения генетической конструкции pcDNA.1.3Hygro Hch A17 последовательность, кодирующую иммуноглобулиновый промотер и тяжелую цепь антитела A17, клонировали из вектора pHEN2HpromA17γ1 эндонуклеазами рестрикции *HindIII* и *XbaI*. Полученный фрагмент ДНК очищали методом электрофореза в агарозном геле и лигировали с вектором pcDNA3.1/Hygro, обработанным соответственно рестрикционными эндонуклеазами *HindIII* и *XbaI*.

### **Создание генетических конструкций для экспрессии антитела A17 в виде одноцепочечного антитела и Fab-фрагмента в клетках дрожжей линии *Pichia Pastoris*.**

Экспрессионные вектора pPICZαA/A.17scFv, pPICZαA/A.17Hch и pPICZαA/A.17Lch были получены на основе плазмиды pPICZαA (Invitrogen, США). Нуклеотидная последовательность одноцепочечного антитела A.17 (A.17scFv) была амплифицирована методом ПЦР с полученной ранее конструкции на базе фагемидного вектора pHEN2 [39] с использованием специфических олигонуклеотидов, обработана эндонуклеазой рестрикции *Avr II*, и клонирована в вектор pPICZαA, последовательно обработанный эндонуклеазой рестрикции *XhoI*, T4-ДНК полимеразой и эндонуклеазой рестрикции *XbaI*. Полученный таким образом экспрессионный вектор pPICZαA/A.17scFv использовали для создания экспрессионной конструкции pPICZαA/A.17Hch. Для этого из вектора pPICZαA/A.17scFv удаляли фрагмент *KpnI-Sall*, содержащий переменный домен легкой цепи, и встраивали в него последовательность, кодирующую первый константный домен гамма 1-цепи иммуноглобулина человека и часть участка шарнирной области тяжелой цепи. Эта последовательность была наработана методом ПЦР с полученной ранее конструкции pcDNA 3.1/Heavy chain A17, содержащей ген IgGγ1 человека. На заключительном этапе в

вектор pPICZαA/A.17Hch обработанный эндонуклеазами рестрикции *XbaI* и *SalI* была клонирована нуклеотидная последовательность *NheI-SalI*, кодирующая 3xFLAG эпитоп, необходимый для обнаружения и очистки белка. Нуклеотидные последовательности переменного домена антитела A.17 и константного домена каппа цепи иммуноглобулина человека были амплифицированы методом ПЦР с конструкции pSV40/Zeo2 Lch и клонированы в модифицированный вектор pPICZαA/Jk1, с использованием эндонуклеаз рестрикции *BsmBI XhoI* и *XhoI SacII*, соответственно.

Мутации в легкой цепи L-S35R, L-S35H, L-S35E, L-S35K, L-S35A, L-P98R были получены методом удлинения перекрывающихся ПЦР-продуктов, используя плазмиды pPicZα/A17\_V1\_карпа в качестве матриц и праймеры: 16/18 и 17/19 для мутации L-S35R; 16/21 и 17/20 для мутации L-S35H; 16/23 и 17/22 для мутации L-S35E; 16/24 и 17/25 для мутации L-S35A; 16/28 и 17/29 для мутации L-S35K. Полученные фрагменты ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *BspMI* и *XhoI*, элюировали из ПААГ и лигировали в вектора pPICZαA/A.17Lch. Корректность всех полученных последовательностей проверяли секвенированием.

16. TTGATCTCGAGCTTGGTCCCTCC
17. ATCGTCTCAAAGACAGTCTGTGCTGACGC
18. TTATGTACGCTGGTATCAGCAGC
19. GCTGCTGATACCAGCGTACATAA
20. TGCTGGTACCAGTGCACATAATTATTC
21. AATAATTATGTGCACTGGTACCAGCAG
22. GCTGCTGGTACCATTCTACGTAATTATTC
23. AATAATTACGTAGAATGGTACCAGCAGC
24. AATAATTATGTAGCTTGGTACCAGCAGCTC
25. ACCAAGCTACATAATTATTCCTCAATATTGGAGCT

### **Создание генетических конструкций для эффективной экспрессии рчБуХЭ**

#### *Получение экспрессионной конструкции pBudCE/EF/BChE поколения G0*

Генетическая конструкция - pGS/CMV/BChE, - несущая ген БуХЭ человека под контролем CMV-промотора, была любезно предоставлена Оксаной Локридж и использована для создания первого вектора для экспрессии БуХЭ в текущей работе - pBudCE/EF/BChE (G0). Перестановка гена БуХЭ в вектор pBudCE/EF/Zeo осуществлялась рестрикцией по сайту *BglI* с последующим подтверждением корректности ориентации вставки методами рестриктового анализа и секвенированием.

*Получение дополнительной экспрессионной конструкции pсDNA/EF/PRAD - поколение G1*  
Исходная генетическая конструкция pRC/RSV-rQ45 содержащая последовательность, которая кодирует пролин богатый пептид PRAD также была любезно предоставлена Оксаной Локридж. Новая экспрессионная конструкция - pBudCE/EF/PRAD была получена перестановкой последовательности PRAD в вектор pсDNA3.1/Hygro по сайтам рестрикции *HindIII-XhoI*. Корректность сборки была подтверждена методом рестриктоного анализа и секвенированием.

#### *Создание экспрессионной конструкции pFUSE PRAD-F2A-BChE поколения GII*

Вектор pFUSE-mIgG2B-Fc2 был использован для создания векторов второго GII (pFUSE PRAD-F2A-BChE) и третьего GIII (pFUSE MAR PRAD-F2A-BChE) поколения. Последовательность F2A-пептида была получена в результате ПЦР-амплификации с использованием специфических праймеров 26-29 и клонирована в вектор pBluescript II KS(-) по сайтам рестрикции *SpeI* и *ApaI*, в результате был получен вектор pBS F2A. Ген БуХЭ вместе с нативной сигнальной последовательностью был амплифицирован методом ПЦР, в качестве матрицы использовали вектор G0 - pGS/CMV/BChE. ПЦР-продукт был обработан эндонуклеазами рестрикции *ApaI* и *KpnI* и клонирован в вектор pBS F2A по тем же сайтам, с получением вектора pBS F2A-BChE. Последовательность пролин-богатого пептида белка ламеллиподина QPSPPLPPPPPPPPPPPPPPPPPPPLPSQSAPSAGSAAР (PRAD) была получена в результате ПЦР-амплификации с использованием праймеров 30-39 и клонирована в конструкцию pBS F2A-BChE по сайтам рестрикции *SacI* и *SpeI*, что привело к получению конструкции pBS PRAD-F2A-BChE. Для получения вектора pFUSEmcs последовательность mcs, полученная в результате ПЦР-амплификации с использованием праймеров 40 и 41, была клонирована в вектор pFUSE-mIgG2B-Fc2 по сайтам рестрикции *NcoI* и *NheI*. Последовательность PRAD-F2A-BChE была получена в результате обработки вектора pBS PRAD-F2A-BChE эндонуклеазами рестрикции *SacI* и *KpnI* и клонирована по этим сайтам в вектор pFUSEmcs, что привело к получению конструкции второго поколения GII - pFUSE PRAD-F2A-BChE.

#### *ПЦР-амплификация AT-богатых последовательностей MAR*

Последовательности MAR 1-68 и MAR X-29 были получены в результате ПЦР-амплификации с использованием особых условий элонгации. Геномная ДНК клеток линии НЕК-293 была выделена с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, США) согласно инструкции производителя и использована в качестве матрицы. Реакционная смесь для проведения ПЦР объемом 50 мкл содержала 0.3 мМ дАТФ и дТТФ, 0.1 мМ дЦТФ

и дГТФ, 50 нМ праймеров 42-45, 50 нг геномной ДНК и Еnсуclo полимеразу (Евроген, Россия) в соответствующем буфере. Температура отжига и элонгации составляла 64°C, а время элонгации – 4.5 мин. Количество циклов амплификации составляло 35.

### Создание экспрессионной конструкции GIII

Для получения вектора рUC19mcs последовательность mcs была получена в результате ПЦР-амплификации с использованием праймеров 46 и 47 и клонирована в вектор рUC19 по сайтам рестрикции *EcoRI* и *SalI*. Последовательности MAR, полученные в результате ПЦР-амплификации, были клонированы в вектор рUC19mcs по сайту *SmaI* с образованием векторов рUC19 MAR<sub>1-68</sub> и рUC19 MAR<sub>X-29</sub>. Последовательности MAR 1-68 и MAR X-29 были получены в результате рестрикции соответствующих векторов рUC19 MAR по сайту *PvuII* и клонированы в вектор рFUSE PRAD-F2A-BChE по этому сайту. Вектора с одинаковой ориентацией последовательностей MAR и кассеты PRAD-F2A-BChE были использованы для дальнейшей работы.

26. CTA GTG AAG CCA GAC ACA AAC AGA AAA TTG TGG CTC CGG TGA AA
27. CAG ACT TTG AAT TTT GAC CTT CTC AAG TTG GCG GGT GAC GTC GAG TCC AAC CCC GGG CC
28. GAG AAG GTC AAA ATT CAA AGT CTG TTT CAC CGG AGC CAC AAT TTT CTG TTT GTG TCT GGC TTC A
29. CGG GGT TGG ACT CGA CGT CAC CCG CCA ACT T
30. GGA AGG AGC TCG AGA AAA GAG AAG CAT GGT CTC ACC CTC AGT TCG
31. GTC TCA CCC TCA GTT CGA AAA GCA ACC TTC TCC GCC TCT TCC CC
32. CCT TCT CCG CCT CTT CCC CCG CCT CCG CCC CCA CCA CCT CCT CCT
33. CCC CCA CCA CCT CCT CCT CCG CCT CCG CCC CCT CCA CCT CCA CCG
34. AGA TGG TGC AGA TTG AGA TGG AAG CGG CGG TGG AGG TGG AGG GGG
35. GTA GTC CCG CGG TGC AGC AGA ACC GGC AGA TGG TGC AGA TTG AGA TG
36. TGC TGC ACC GCG GGA CTA CAA AGA CCA TGA CGG T
37. GGG ACT ACA AAG ACC ATG ACG GTG ATT ATA AAG ATC ATG ACA TC
38. TGT CAT CGT CAT CCT TGT AAT CGA TGT CAT GAT CTT TAT AAT CAC
39. GGC TTC ACT AGT CTT GTC ATC GTC ATC CTT GTA
40. CAT GGA GCT CGA GGG ATC CTA GGT ACC GTC TCA AGC TCT AGA TCT G
41. CTA GCA GAT CTA GAG CTT GAG ACG GTA CCT AGG ATC CCT CGA GCT C
42. TCT TGC AGA TCC CTG AAC TGA GGA G
43. AGT CTT GTT TCT CTT AAA TCG TCC AAA CCA
44. GGC TTG CCA AAT GCG AAA AGA TCC

45. AGA GGA TCC CTA TGC TGC TGG TT
46. AAT TCC TCG AGC GAT CGC CCG GGC CGA TCG GGG
47. TCG ACC CCG ATC GGC CCG GGC GAT CGC TCG AGG

*Создание вектора pBudCE/EF/BChE+Neo поколения GIII +*

Для получения вектора pBudCE/EF/BChE+Neo, вектор pRc/CMV был обработан эндонуклеазой рестрикции *VamHI*, после чего фрагмент, несущий ген устойчивости к генетицину, был клонирован в вектор pBudCE/EF/BChE по соответствующему сайту рестрикции.

Корректность сборки каждой из полученных конструкций была подтверждена секвенированием.

### **Создание генетических конструкций для дрожжевого дисплея ферментов**

Рекомбинантная бутирилхолинэстераза человека (БуХЭ), легкая цепь энтерокиназы человека (ЭК), и дезоксирибонуклеаза I человека (ДНКазы) были получены в клетках дрожжей *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen, США) в виде белка, заякоренного на клеточной стенке, с использованием модифицированного вектора pPICZ-mCherry-F2A-HSAss-AfeI/PvuI-NA-SAG1, полученного на основе вектора pPICZαA (Invitrogen, США). Этот вектор содержал в одной рамке считывания последовательность флуоресцентного белка-репортера mCherry, “самопроцессирующегося” F2A пептида, лидерного пептида человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), последовательности узнавания эндонуклеаз рестрикции *AfeI* и *PvuI*, субъединицы Aga1p α-агглютинаина дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и эпитоп гемагглютинаина (НА). Фрагменты, кодирующие БуХЭ, ЭК и ДНКазу были получены в результате ПЦР-амплификации с использованием в качестве матрицы векторов pFUSE PRAD-F2A-BChE (GII), pHENm/L-HEP/C122S [190] и pBE-rhDNAseI с использованием праймеров 48/49, 50/51 и 52/53, соответственно, и были клонированы в вектор pPICZ-mCherry-F2A-HSAss-AfeI/PvuI-NA-SAG1 по сайтам *AfeI* и *PvuI*.

48. GCTTACTCGGAAGATGACATCATAATTGCAACAA
49. CTCCTTCGATCGAGACTTTTGGAAAAAATGATGTCCAG
50. GCTTACTCGATTGTTGGTGGCTCTAACGC
51. CTCCTTCGATCGACGCATGCAGAAAGCTCTGG
52. GCTTACTCGCTGAAGATCGCAGCCTTCAAC
53. CTCCTTCGATCGACTTCAGCATCACCTCCACTG

### **Создание библиотеки мутантов БуХЭ**

БуХЭ дикого типа и ее библиотека были получены в заякоренном виде на поверхности *Pichia pastoris* с использованием модифицированного экспрессионного вектора pPic9k- $\alpha$ -SfiI-FLAG-anchor, полученного на основе вектора pPIC9k (Invitrogen, США). Данный вектор содержал последовательности короткой сигнальной последовательности  $\alpha$ -фактора, субъединицы Aga1p  $\alpha$ -агглютинаина дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, последовательность узнавания эндонуклеазы рестрикции SfiI и последовательность 3FLAG-эпитопа. Вектор pFUSE PRAD-F2A-BChE (GII) был использован в качестве матрицы и праймеры 54/56 и 55/57 были использованы для амплификации участков БуХЭ, фланкирующих последовательность 284-TPLSV-288 ацил-связывающей петли БуХЭ дикого типа (WT). ПЦР-продукт, полученный в результате амплификации с использованием пары праймеров 55/57, был использован в качестве матрицы для ПЦР-амплификации с использованием пары праймеров 55/58, после чего ПЦР-продукты, полученные с использованием праймеров 54/56 и 55/58, были амплифицированы с использованием пары праймеров a/b. Полученный ПЦР-продукт был обработан эндонуклеазой рестрикции SfiI и клонирован в вектор pPic9k- $\alpha$ -SfiI-FLAG-anchor. Представительность библиотеки оценивается величиной порядка  $3 \times 10^5$ .

54. GCGCTAGCTGCGGCCAGCCGGCCGAAGATGACATCATAATTGCAA  
CAAAGAAT
55. CTTTGTAGTCCATCAGGCCCCCGAGGCCGAGACCCACACAACSTTTCTTTCTTG
56. CCCATAGGGGACAACAATGCTTC
57. AACTTTGGTCCGACCGTGGATG
58. GAAGCATTTGTTGTCCCSTATGGGMVWVWMDWMRWVDWAAC  
TTTGGTCCGACCGTGGATG

### **Создание генетических конструкций для продукции мутантов БуХЭ**

Мутанты БуХЭ устойчивые к действию ФОТ были получены в клетках FreeStyle™ 293-F с использованием вектора pFUSE-BChE-6xHis, полученного на основе pFUSE-hIgG1-Fc (Invivogen, США), несущего укороченный вариант БуХЭ W541H<sub>6</sub>Δ [191] без с концевой домена тетрамеризации. Данный вектор был получен в результате ПЦР-амплификации с использованием вектора pFUSE PRAD-F2A-BChE (GII) в качестве матрицы и праймеров 26/27 и 28/29. ПЦР-продукт, полученный в результате амплификации фрагментов 26/27 и 28/29 с использованием праймеров a/d, был обработан эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *NheI* и клонирован по одноименным сайтам рестрикции в вектор pFUSE-hIgG1-Fc.

Геномная ДНК клонов мутантов БуХЭ, устойчивых к действию ФОТ, была использована в качестве матрицы для амплификации ПЦР-продукта с использованием праймеров 26/29. Полученный ПЦР-продукт был обработан эндонуклеазами рестрикции

*NheI* и *NcoI* и клонирован по одноименным сайтам рестрикции в вектор pFUSE-BChE-6xHis.

## Методы работы с бактериями *E. coli*

### Получение электрокомпетентных клеток

Клетки высевались из музея истощающим штрихом на чашку Петри с LB-агаром без антибиотика после чего инкубировались 14 часов при 37°C. Отдельную бактериальную колонию инокулировали в 5 мл среды 2xYT и растили при 37°C и перемешивании 220-250 об/мин в течение ночи.

Ночную культуру в объеме 1 мл высевали в две двухлитровые бутылки, содержащие по 250 мл среды SOB, и растили в течение 1.5-2 часов при 37°C и перемешивании 220-250 об/мин до оптической плотности 0.4 ОЕ при длине волны 600 нм. Затем клетки охлаждали на льду и стерильно переносили в охлажденные центрифужные стаканы на 250 мл после чего центрифугировали 10 минут 4000 об/мин при 0°C на центрифуге Beckman J-21.

Клетки ресуспендировали в небольшом объеме ледяной стерильной воды MQ, добавляли около 150 мл ледяной воды MQ и центрифугировали в тех же условиях. Промывку водой повторяли еще 2 раза, затем клетки отмывали охлажденным 10% глицерином. Осадок ресуспендировали в 2-3 мл 10% глицерина, разносили по 100 мкл в стерильные охлажденные пробирки, после чего замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. Компетентность клеток проверялась трансформацией плазмидой pUC19 и принималась равной количеству выросших колоний поделенной на количество плазмиды в мкг.

### Трансформация клеток *E. coli* методом электропорации

Электропорация проводилась на приборе ECM600 (ВТХ, США) с использованием 1 мм кювет (BioRad, США). К размороженной на льду аликвоте (100 мкл) электрокомпетентных клеток добавляли раствор плазмиды или очищенную лигазную смесь, переносили клетки в охлажденную кювету и осуществляли электропорацию (1.2-1.4 кВ, 5.19-5.22 мс). Затем клетки переносили в 1 мл теплой среды SOC и инкубировали 30 минут при 37°C. Далее высевали на чашку Петри с LB-агаром, с добавлением селективирующих антибиотиков, и помещали в термостат на 37°C на 14-16 часов.

### ПЦР с колоний

В микропробирки разносили по 10 мкл воды MQ, после чего отдельные бактериальные колонии (в количестве 10-20 штук) переносили с использованием предварительно автоклавированных стерильных зубочисток на свежую размеченную чашку и в соответствующую пронумерованную пробирку. Готовили двукратную смесь для

проведения ПЦР и разносили ее по пробиркам с инокулированными колониями в объеме 10 мкл. Далее на приборе T100 (BioRad, США) осуществляли 25 циклов ПЦР-амплификации, после чего продукты полимеразной цепной реакции анализировали с использованием электрофореза в агарозном геле.

### **Ночная культура**

Отдельную бактериальную колонию инокулировали в 5 мл среды LB или 2xYT с соответствующим селективирующим антибиотиком (100 мкг/мл ампициллина или 25 мкг/мл зеоцина) и растили при 37°C и перемешивании 220-250 об/мин в течение ночи.

### **Приготовление музейного штамма**

Из отдельной колонии бактерий выращивали ночную культуру, добавляли глицерин до концентрации 15%, замораживали и хранили при температуре -70°C. Штамм из музея рассеивали истощающим штрихом на чашку Петри, содержащую среду LB-агар и инкубировали при 37°C в течение 14-16 часов.

### **Экспрессия рекомбинантных белков gp13 и gp15 в прокариотической системе**

Для экспрессии использовали штамм *E.coli* BL21(DE3). Ночную культуру клеток высевали в среду 2xYT в разведении 1:100, подращивали до достижения оптической плотности 0,6 единиц при 37 °C (1 ч. 40 мин. - 2 ч.), а затем индуцировали экспрессию добавлением IPTG до 1 mM, далее культуру растили при +37 °C в течение ночи. По окончании культивации клетки осаждали центрифугированием 5 минут на скорости 5000 об/мин при 4 °C, далее клеточный осадок либо замораживали, либо приступали к процедуре выделения рекомбинантных белков.

## **Методы работы с дрожжами *Pichia pastoris***

### **Получение электрокомпетентных клеток**

Клетки из музея истощающим штрихом высевали на чашку Петри с YPD-агаром и инкубировали в термостате в течение ночи при 30°C. Для культивирования отдельную колонию инокулировали в 5 мл среды YPD и растили в течение ночи при 30°C и 220-250 об/мин. 100 мкл культуры высевали в колбу с 50 мл свежей среды YPD и растили при 30°C и 220-250 об/мин до оптической плотности 1.3-1.5 ОЕ при длине волны 600 нм. Затем клетки охлаждали во льду и стерильно переносили в 50 мл пробирки, центрифугировали 5 мин при 1500 g и 4°C на центрифуге Eppendorf 5804 (Eppendorf, Германия). Далее клетки ресуспендировали в 40 мл буфера 100 mM LiOAc, 10 mM дитиотреитол, 0.6 M сорбитол, 10 mM Трис-HCl pH 7.5 и инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Клетки центрифугировали 5 мин при 1500 g и 4°C, ресуспендировали в 50 мл ледяного 1 M сорбитола, центрифугировали в тех же условиях и повторяли эту процедуру два раза.

Осадок ресуспендировали в 1-2 мл 1 М сорбитола, разносили по 80 мкл в стерильные пробирки и использовали для электротрансформации.

### **Трансформация клеток методом электропорации**

Электропорация проводилась на приборе фирмы Genetronics (США) согласно инструкции производителя. Использовали 2 мм кюветы (BioRad, США). К аликвоте (80 мкл) электрокомпетентных клеток добавляли 5-20 мкг линейаризованной ДНК, перемешивали и инкубировали во льду 5 мин. Затем переносили клетки в охлажденную кювету и осуществляли электропорацию (2.0 кВ, ~5 мс), после чего клетки переносили в 1 мл 1М сорбитола, инкубировали 1 час в термостате при 30°C. Далее 200-500 мкл высевали на чашку Петри с YPD-агаром, с добавлением селективного антибиотика, и помещали в термостат на 48-72 часа при 30°C.

### **ПЦР с генома дрожжей**

Дрожжевые колонии переносили в пробирки со 100 мкл раствора 200 мМ LiOAc и 1% ДСН. После инкубации в течение 5 минут при 70°C добавляли 300 мкл этанола и перемешивали на вортексе. Полученную суспензию центрифугировали при 16000 g в течение 3-х минут. Полученный осадок промывали 70% водным раствором этанола, после чего растворяли осадок в 100 мкл TE и центрифугировали при 16000 g в течение 30 секунд. 1-5 мкл полученного супернатанта использовали для проведения ПЦР. При проведении ПЦР использовали 30-35 циклов амплификации, после чего продукты ПЦР анализировали электрофорезом в агарозном геле и секвенированием.

### **Анализ трансформантов**

Аналитическую экспрессию проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя (Invitrogen, США), используя среды BMGY и BMMY. Индивидуальную колонию инокулировали в 5 мл среды BMGY и растили в течение 16-20 часов при 30°C и 220-250 об/мин. Далее клетки центрифугировали 5 мин при 1500g и переводили в среду BMMY до 1 ОЕ при длине волны 600 нм. Метанол добавляли до концентрации 0.5% каждые 24 часов, экспрессию проводили в течение 24-72 ч с момента индукции. Анализ продукции белков проводили с использованием моноклональных антител мыши к НА-эпистоу, конъюгированных с флуоресцентным красителем Alexa 488, а также специфических субстратов в случае продукции ферментов (дозоксирибонуклеазы I, энтеропептидазы и бутирилхолинэстеразы).

### **Приготовление музейного штамма**

Из отдельной колонии выращивали ночную культуру, добавляли глицерин до концентрации 15%, замораживали и хранили при температуре -70°C.

### **Экспрессия белков, заякоренных на поверхности дрожжевой стенки, для проведения процедуры микрофлюидной компартиментализации**

Музейную культуру *P. pastoris* из замороженного глицеринового стока рассеивали методом истончающегося штриха на чашки со средой YPD-агар. Клетки растили 24-72 часа при 30°C. Индивидуальные колонии *P. pastoris* использовали для инокуляции 50 мл среды BMGY в стеклянной колбе и растили в течение 16-20 ч при 30°C и 220-250 об/мин. Клетки собирали центрифугированием в течение 5 минут при 1500 g, ресуспендировали полученный клеточный осадок в 250 мл среды BMMY до конечной плотности 1 ОЕ при длине волны 600 нм и культивировали 24 часа при 30°C с интенсивной аэрацией. После окончания культивации клетки осаждали центрифугированием в течение 5 минут при 1500 g. Полученный клеточный осадок промывали 3 раза 50 мМ калий-фосфатным буфером pH 7.2, после чего ресуспендировали в буфере для инкапсуляции, фильтровали через колоночные фильтры с диаметром пор 20 мкм (IDEX, США) и доводили до необходимой оптической плотности (3 ОЕ для инкапсуляции в чипах с размером каналов 20 мкм и 0.3 ОЕ для 60 мкм чипов).

### **Методы работы с клетками линии CHO-K1, NSO и FreeStyle™ 293-F**

#### **Поддержание в культуре эукариотических клеток линии NSO *bcl2*.**

Клетки выращивали в среде DMEM-RPMI 45% x 45%, содержащей 10% инактивированной при 56°C в течение получаса бычьей фетальной сыворотки, 2мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия и заменимые аминокислоты. Культура выращивалась в инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и влажности 98% в культуральных флаконах (25 см<sup>2</sup>). При достижении клетками монослоя их открепляли ударом хлопком. Открепившиеся клетки ресуспендировали и рассеивали с разведением в 5 раз к первоначальному объему суспензии.

#### **Приготовление музея эукариотических клеток.**

При достижении 100% конфлюэнтности клетки NSO *bcl2* открепляли от культуральной поверхности ударом хлопком, клеточную суспензию переносили в стерильные центрифужные пробирки и осаждали при 800 g и температуре 10 °C в течение 5 минут. Супернатант декантировали. Клеточный осадок ресуспендировали в смеси 90% бычьей фетальной сыворотке и 10% DMSO из расчета 1 мл на 2-3 миллиона клеток. Клеточную суспензию переносили в криовials и оставляли на -20°C на 1-2 часа до замораживания. Затем криовials переносили на -80°C и хранили 2-3 недели. Затем замороженные клетки переносили на хранение в танк с жидким азотом.

#### **Выведение линии эукариотических клеток из заморозки.**

Криовиал с клетками размораживали в водяной бане с температурой 36°C в течение 1-2 минут. Клеточную суспензию незамедлительно переносили в стерильную

центрифужную пробирку с 20-30 мл холодной бессывороточной среды и центрифугировали при 800 g и температуре 10°C в течение 5 минут. Супернатант декантировали. Клеточный осадок ресуспендировали в смеси 5 мл теплой среды с 10% бычьей фетальной сыворотки. Суспензию клеток переносили в культуральный флакон (25 см<sup>2</sup>) и помещали в инкубатор при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и влажности 98%.

### **Культивирование клеток линии СНО-К1**

Клетки выращивали в среде Advanced DMEM (Gibco, США), содержащей 10% австралийской бычьей фетальной сыворотки (Gibco, США), 4 мМ дипептида GlutaMAX и смесь антибиотиков и антимикотика (Gibco, США) в инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> во флаконах (25 см<sup>2</sup>). При достижении конfluence клетки рассевали. Отбирали культуральную среду, клетки промывали 5 мл стерильного PBS (Gibco, США), добавляли 0.5 мл 0.25% раствора трипсина в изотоническом буфере и инкубировали 2–3 мин при 37°C до открепления клеток. Открепившиеся клетки смывали и ресуспендировали в 4.5 мл среды DMEM с 10% бычьей фетальной сыворотки, после чего клетки рассевали по 0.5-1 мл суспензии в 5 мл свежей ростовой среды.

### **Получение стабильных клонов-продуцентов 4рчБуХЭ**

#### Трансфекция клеток линии СНО-К1

Клетки линии СНО-К1 были трансфицированы на приборе Nucleofector 2b (Lonza, Швейцария) с использованием набора Amaxa® Nucleofector® kit T (Lonza, Швейцария) согласно инструкции производителя. Клетки, находившиеся в состоянии 60% конfluence, снимали с флакона обработкой 0.25% раствором трипсина в изотоническом буфере. Открепившиеся клетки смывали и ресуспендировали в 4.5 мл среды DMEM с 10% бычьей фетальной сыворотки, считали количество клеток на камере Горяева и использовали 1 млн. клеток для одной трансфекции. Суспензию клеток центрифугировали 5 мин при 150 g. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в свежеприготовленном растворе Nucleofector® Solution (Lonza, Швейцария), добавляли 2 мкг соответствующего линейризованного по *Sfa*AI вектора GII, GIII или pBudCE/EF/BChE+Neo (линейризованного по *Pvu*I), переносили в кювету и запускали программу трансфекции U-023 (максимальная эффективность, низкая выживаемость). После чего рассевали в 6-луночные планшеты в ростовой среде без селективирующего антибиотика. Спустя 6 часов прикрепившиеся клетки снимали и рассевали 1 лунку 6-луночного планшета на 24-луночный планшет.

#### Селекция клеток линии СНО-К1

Спустя 16 часов после трансфекции клеточная культура подвергалась селекции на антибиотике зеоцин с концентрацией 600 мкг/мл (все конструкции на основе pFUSE) или генетицин 1200 мкг/мл (pBudCE/EF/BChE+Neo). Для этого ростовую среду заменяли на свежую с антибиотиком по 0.5 мл в лунку. Спустя 3 дня среду меняли на 0.5 мл свежей среды с антибиотиком. Процедуру повторяли каждые 3 дня до достижения конfluence клеток в лунках. После этого лунки тестировались с целью определения уровня активности БуХЭ.

#### Тестирование на наличие активности БуХЭ

Для отбора клонов, обладающих наибольшим уровнем продукции БуХЭ, лунки тестировались на наличие активности БуХЭ. Для этого из каждой лунки отдельно отбирали по 100 мкл среды, готовили серийные разведения 1/20 - 1/320 отобранных сред в 96-луночной планке в объеме 100 мкл. Добавляли к полученным разведениям по 100 мкл двукратного субстрата – реактива Элмана (2 mM ВТС и 1 mM DTNB в PBS). Скорость реакции гидролиза субстрата регистрировали на планшетном ридере Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, США) по поглощению продукта реакции при длине волны 405 нм. Лунки, обладавшие наибольшей активностью, использовали для клонирования.

#### Получение индивидуальных клонов-продуцентов БуХЭ

Процедуру клонирования проводили методом предельных разведений. Для этого отобранные ранее лунки 24-луночного планшета обрабатывали 0.25% раствором трипсина в изотоническом буфере. Открепившиеся клетки смывали и ресуспендировали в 1.5 мл среды DMEM с 10% бычьей фетальной сыворотки, после чего определяли концентрацию клеток с использованием камеры Горяева. Клеточную суспензию разводили методом последовательных разведений до концентрации 30 кл/мл после чего высевали в 96-луночные планки в объеме 100 мкл в лунку. На следующий день в лунки добавляли по 100 мкл свежей среды с двукратной концентрацией селективирующего антибиотика. Через 5-6 дней лунки визуально тестировали на наличие одиночных колоний и отмечали лунки, несущие одну колонию. Спустя 10-14 дней после клонирования клетки достигали конfluence и их тестировали с целью определения уровня активности БуХЭ. Лунки, содержавшие индивидуальные клоны с наибольшим уровнем активности, были протестированы во флаконах (25 см<sup>2</sup>) и лучшие из них были отобраны для создания банка клонов-продуцентов.

#### Создание банка культуры клона-продуцента

Клетки из флаконов, отобранных на предыдущей стадии, наращивали в 5 флаконах (25 см<sup>2</sup>) в объеме среды 5 мл при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. По достижении конfluence, клетки

обрабатывали 0.25% раствором трипсина в изотоническом буфере. Открепившиеся клетки смывали и ресуспендировали в 4.5 мл среды DMEM с 10% бычьей фетальной сыворотки и центрифугировали в течение 5 минут при 150 g, клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл сыворотки с 10% диметилсульфоксида. Затем с помощью серологической пипетки клеточную суспензию стерильно разносили по 1 мл в криопробирки, подписывали название клона-продуцента, дату и замораживали при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Спустя неделю криопробирки переносили в жидкий азот для долгосрочного хранения. В каждом новом цикле работы использовали пробирку из мастер-банка клона-продуцента, из которой в свою очередь получали по 10 пробирок для рабочего банка клонов.

### **Продукция рчБуХЭ в клетках линии СНО-К1**

Криопробирка из рабочего банка клона-продуцента подвергалась разморозке при  $37^{\circ}\text{C}$  после чего ее содержимое переливали в 10 мл среды DMEM, перемешивали и центрифугировали в течение 5 минут при 150 g. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл свежей ростовой среды и высевали в 2 флакона ( $25\text{ см}^2$ ). По достижении конfluence, клетки пересевали последовательно сначала в четыре  $75\text{ см}^2$ , затем  $225\text{ см}^2$  флакона. По достижении конfluence в  $225\text{ см}^2$  флаконах, клетки пересевали в  $1700\text{ см}^2$  роллеры в объеме среды 150 мл из расчета 1 флакон – 1 роллер. Спустя 3 дня среду с сывороткой меняли на бессывороточную среду ProCHO4 (Lonza, Швейцария) с добавками 4 мМ дипептида GlutaMAX (Gibco, США) и смеси антибиотиков и антимикотика (Gibco, США). Нарботку рчБуХЭ проводили в двух режимах: без замены среды и с заменой среды. В случае без замены среды в роллере заменяли однократно в объеме 350 мл и проводили сбор среды однократно спустя 8 дней, что приводило к уровню продукции более 70 мг/л (26 мг/роллер). В случае с заменой среды в объеме порядка 320 мл проводили 80% замену среды каждые двое суток в течение 17-19 суток, что приводило к уровню продукции порядка 30-40 мг/л (82 мг/роллер). Полученную в результате культуру центрифугировали 15 мин при 4000 g и температуре  $4^{\circ}\text{C}$ , отбирали супернатант, замораживали и хранили при  $-30^{\circ}\text{C}$  до проведения процедуры выделения и очистки рчБуХЭ.

## **Методы работы с белками**

### **Электрофорез в полиакриламидном геле**

Электрофорез проводили по стандартной методике Леммли. Готовили двухкомпонентный гель следующего состава: концентрирующий гель – 5% смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН, 0.125 М Трис-НСl, pH 6.8; разделяющий гель – 8-10% смеси акриламид-бисакриламид (соотношение 29:1), 0.1% ДСН,

0.375 М Трис–HCl, рН 8.9. Для полимеризации сначала добавляли N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин до концентрации  $5 \cdot 10^{-5}\%$ , а затем персульфат аммония до  $1.5 \cdot 10^{-4}\%$ . Для проведения нативного ПААГ-электрофореза использовали буферные растворы без ДСН.

Двукратный буфер нанесения образцов: 4% ДСН, 0.25 М Трис–HCl, рН 6.8; 4 мМ ЭДТА-Na, рН 8.0, 10% глицерина, 0.25 мг/мл бромфенолового синего; (для проведения электрофореза в восстанавливающих условиях добавляли 5% меркаптоэтанола; для нативного электрофореза использовали буфер без ДСН).

Пятикратный электродный буфер для электрофореза по Леммли: глицин 72 г/л, ДСН 5 г/л, Трис–HCl 6.5 г/л, рН 8.3 (для нативного электрофореза использовали буфер без ДСН рН 7.4).

Образцы белковых препаратов смешивали с буфером нанесения в соотношении 1:1, прогревали 5 минут при 95°C (в случае нативного электрофореза пропускали стадию нагревания), наносили на гель и вели электрофорез при напряжении 90 В до перемещения красителя в разделяющий гель, после чего выставляли силу тока 25 мА на 1 пластину геля и вели электрофорез до момента выхода краски из разделяющего геля.

По окончании электрофореза отделяли разделяющий гель, который затем окрашивали Кумасси синим R-250 или проводили анализ активности в случае нативного электрофореза.

#### **Окрашивание ПААГ Кумасси синим R-250 с усилением контраста солью меди**

Разделяющий гель 5 минут инкубировали в горячем растворе, содержащем 10% этанола и 10% уксусной кислоты. Далее его помещали на 10 минут в горячий раствор следующего состава: 15% этанола, 25% уксусной кислоты, 0.3 г/л красителя Кумасси синий R-250 и 0.45 г/л пятиводного сульфата меди. Затем гель многократно отмывали в горячем растворе, содержащем 10% этилового спирта и 10% уксусной кислоты, до полного исчезновения фонового окрашивания.

#### **Выделение и очистка рекомбинантных белков gp13 и gp15**

Клеточный осадок экспрессионной культуры *E.coli* ресуспендировали в 1/20 от исходного объема растворе, содержащем 20 мМ Трис–HCl, рН 8,0, далее добавляли 1/50 объема свежеприготовленного раствора лизоцима до концентрации 0,2 мг/мл, а также ингибиторный коктейль согласно рекомендациям производителя и держали на льду 25-30 мин., затем добавляли 1/100 объема 10% раствора Triton X100, инкубировали, помешивая, 10 минут при 37°C, после чего суспензию подвергали ультразвуковой обработке до полной потери вязкости образца. После разделения центрифугированием растворимой фракции (супернатант) и фракции телец включения (осадок) целевой белок как в случае gp13, так и

gp15 полностью обнаруживался во фракции телец включения *E.coli*. Для препаративной очистки целевых белков тельца включения трижды промывали - сначала буфером, содержащем 20 мМ Трис-НСl, рН 8,0 и 500 мМ NaCl, затем 1% раствором Тритон X100 и последний раз раствором 1М мочевины - и затем растворяли в буфере нанесения для металл-хелатной хроматографии, содержащем 50 мМ Na-фосфата, рН 8,0, 300 мМ NaCl и 8 М мочевины. Очистку проводили в денатурирующих условиях на сорбенте Ni-NTA агароза (QIAGEN) по методике производителя, элюцию осуществляли раствором 300 мМ имидазола. Далее элюат преципитировали диализом против деионизованной воды и проводили дополнительную очистку для получения гомогенного препарата методом препаративной ОФ ВЭЖХ на колонке С4, затем очищенные белки лиофилизировали и после растворяли в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСl, рН 7,4 и 50 мМ NaCl. Полученные растворы белка хранили при температуре +4С°. Для стабилизации белков при долгосрочном хранении в раствор дополнительно добавляли дитиотреитол до концентрации 2 мМ

### **Иммуноферментный анализ**

Иммуноферментный анализ продукции рчБуХЭ проводили по стандартной «сэндвич» методике с использованием полученных ранее специфических моноклональных антител к N-концевой части БуХЭ. Первоначально готовили 96-ти луночный планшет для ИФА (NUNC MaxiSorp), в лунки которого помещали по 50 мкл раствора специфических антител к N1-концу БуХЭ в 100 мМ карбонатном буфере рН 9.0, в концентрации 0,004 мг/мл и инкубировали ночь при +4С°. После этого лунки отмывали трижды раствором PBS-Tween 0.1%, вносили по 200 мкл/лунка блокирующего раствора (1% BSA в PBS) и инкубировали с перемешиванием 1 час при 37°С. Затем вносили по 50 мкл исследуемого образца (ростовая среда клонов-продуцентов рчБуХЭ) в различных разведениях и инкубировали с перемешиванием один час при 37°С. После этого лунки отмывали трижды раствором PBS-Tween 0.1%, проявляли образовавшиеся иммунокомплексы добавлением в каждую лунку 50 мкл коммерчески доступных антител к БуХЭ, специфичных к С-концу белка и конъюгированных с пероксидазой хрена. Через час инкубации с перемешиванием при 37°С лунки промывали, добавляли по 50 мкл субстрата ТМБ и оставляли на 10 мин. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл раствора 10% фосфорной кислоты. Оптическую плотность регистрировали с использованием планшетного спектрофотометра-флуориметра при длине волны 450 нм.

Иммуноферментный анализ сывороток крови мышей, иммунизированных разными вариантами антигена gp120 проводили с некоторыми модификациями. Для детекции антител после иммунизации комбинированным ДНК-белковым липосомальным препаратом, а также после иммунизации препаратом gp15 сыворотки мышей в разведениях

1:50 и 1:100 инкубировали в иммунологической планшете с предварительно иммобилизованным gp13, в качестве антигена и проявляли комплекс антиген – антитело при помощи козьих антител к Fc фрагменту мышинных IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена. В случае реакционной иммунизации сыворотки крови мышей в разведениях 1:12, 1:48 инкубировали в иммунологической планшете с предварительно иммобилизованными козьими антителами к мышинным IgG, добавляли биотинилированный антиген и проявляли комплекс антиген – антитело при помощи нейтравидина, конъюгированного с пероксидазой хрена. В качестве антигена использовали биотинилированные LAEEEV-Phosphonate и Val-Phosphonate.

### **Измерение каталитической активности антител, способных к реакции с gp120**

Для антител 1A3E6 и 1A1E11, которые взаимодействуют с пептидил-фосфонатом - LAEEEV-MCA - за реакцией наблюдали по флуоресценции метил-кумарина, образующегося в результате гидролиза субстрата. Реакцию проводили в TN-буфере, концентрация антител составляла 2-4 мкМ, субстрат разводили в серии концентраций от 20 мкМ до 300 мкМ. Изменение флуоресценции регистрировали с использованием планшетного спектрофотометра-флуориметра при  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=360/460$  нм.

Для получения флуоресцентных субстратов BSA-FITC и gp120-FITC использовали 10 мг раствора BSA или gp120 в 1 мл 100 мМ Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 10,5, диализовали против 1 л этого же буфера 24 часа с одной сменой раствора. К диализованному раствору белков добавили по 10 мг сухого флуоресцеинизотиоцианата и инкубировали 24 часа при 37°C и перемешивании без доступа света. Реакционные смеси 5 раз переосаждали сульфатом аммония pH 7,0 и растворяли осадок в буфере 20 мМ Трис-HCl pH 7,5, 50 мМ NaCl (до полного обесцвечивания надосадочной жидкости), затем диализовали против 1 л этого же буфера 24 часа с двумя сменами раствора. Для долгосрочного хранения диализованные флуоресцентные субстраты смешивали с насыщенным раствором сульфата аммония pH 7,0 в соотношении 1:1 и хранили в форме суспензии при 4°C без доступа света.

При исчерпывающем трипсинолизе полученных субстратов изменение сигнала для gp120-FITC составило 7, а для BSA-FITC – 10 раз. Для исследования каталитической активности пул антител из сывороток крови экспериментальных групп мышей предварительно очищался с помощью аффинной хроматографии на колонке Protein A HP (GE Healthcare), согласно рекомендациям производителя. Очищенные антитела и один из флуоресцентных субстратов BSA-FITC или gp120-FITC смешивали в TN буфере с конечными концентрациями 0,7 и 0,25 мкМ, соответственно. Три независимых измерения интенсивности флуоресценции при  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=480/530$  нм осуществлялись в точках времени

0, 24 часа и 48 часов. Относительное увеличение флуоресценции (RFI) рассчитывали как отношение разницы между медианой интенсивности флуоресценции в точке  $t$  ( $F_t$ ) и медианой интенсивности флуоресценции в начальной точке ( $F_0$ ) к интенсивности флуоресценции в начальной точке ( $F_0$ ) в процентах:

$$\%, \text{RFI} = (F_t - F_0) / F_0$$

### **Окрашивание ПААГ на наличие бутирилхолинэстеразной активности по методу Карновского**

По окончании электрофоретического разделения белков в нативном ПААГ-электрофорезе, пластина с гелем переносилась в раствор, содержащий 125 мМ NaOH, 125 мМ малеиновой кислоты, 12 мМ цитрата натрия, 10 мМ CuSO<sub>4</sub>, 550 мкМ, K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] и 1 мМ бутирилтиохолин йодида. Гель инкубировали в растворе в течение 0.5–3 ч при комнатной температуре на шейкере.

### **Определение концентрации рчБуХЭ**

Концентрацию активной рчБуХЭ определяли по методу Элмана с использованием 1 мМ бутирилтиохолин йодида (Sigma, США) и 0.5 мМ 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной кислоты) (Sigma, США) в 0.1 М калий-фосфатном буфере pH 7.0, при 25°C. Образование продукта реакции, 5-тио-2-нитробензойной кислоты, регистрировали спектрофотометрически при длине волны 405 нм, исходя из молярного коэффициента поглощения продукта 13600 М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>. Концентрацию БуХЭ оценивали исходя из удельной активности 720 единиц активности на 1 мг и  $A_{1\text{ см}}^{1\%}$ , 280 18 для препарата чистой БуХЭ.

### **Выделение и очистка 4рчБуХЭ**

#### *Ультрафильтрация и концентрирование культуральной среды*

Культуральную среду, полученную в результате продукции 4рчБуХЭ в клетках линии CHO-K1, трансфицированных векторами GII, GIII и GIII+, в объеме ~10 л размораживали и подвергали фильтрации от клеточного дебриса с использованием фильтрационных модулей 0.45 мкм и 0.22 мкм (Millipore, США). Полученный фильтрат концентрировали с помощью ультрафильтрационного модуля Pelicon 2 (Millipore, США) с размером пор 100 кДа до объема системы ~100 мл согласно инструкции производителя. Далее с использованием того же модуля осуществляли диафильтрацию против буфера нанесения на аффинный сорбент прокаионамид-сефарозу (50 мМ калий-фосфатный буфер pH 7.4) для проведения первой стадии хроматографической очистки. Для этого концентрат среды разбавляли до 2 л раствором 50 мМ калий-фосфатного буфера pH 7.4 и снова концентрировали. Процедуру повторяли три раза после чего полученный концентрат

выдавливали из системы обратным потоком воздуха и использовали для дальнейшей очистки. Конечный объем концентрированной среды составлял 400 мл.

#### *Хроматографическая очистка 4рчБуХЭ*

200 мл концентрированной среды наносили на 50 мл колонку XK10/50 (GE Healthcare, США), заполненную сорбентом прокаинамид-сефарозой, в течение 16 часов в режиме рециркуляции при скорости потока 3 мл/мин. После этого сорбент промывали 10 объемами колонки буфера нанесения, затем 5 объемами 120, 200, 300, 450 и 900 мМ NaCl в 20 мМ калий фосфатном буфере pH 7.4. Регенерацию колонки проводили 10 объемами 2 М NaCl. Полученные фракции анализировали с целью определения уровня активности БуХЭ и определяли количество активной БуХЭ в каждой фракции. Фракции 300, 450 и 900 мМ были сконцентрированы до 10-12 мл при помощи мембраны Pelicon XL (Millipore, США) с размером пор 100 кДа и переведены под буфер А (20 мМ калий-фосфатный буфер pH 7.4) для нанесения на ионообменную колонку MonoQ 10/100 GL (GE Healthcare, США). Объем нанесения на колонку составлял 3-4 мл. После нанесения колонку промывали 10 объемами буфера нанесения и проводили градиентную элюцию NaCl от 0 до 0.3 М буфером Б (1 М NaCl в 20 мМ калий-фосфатном буфере pH 7.4) в 10 объемах колонки. Фракции собирали через каждые 4 мл (0.5 объема колонки) и анализировали с целью определения уровня активности БуХЭ. Фракции, обладавшие одинаковым уровнем специфической активности (соответствовавшие интервалу времени выхода 18.5-21 мин), объединяли, концентрировали на концентраторах Amicon Ultra-15 (Millipore, США) с размером пор 100 кДа и анализировали методом ПААГ-электрофореза с целью оценки чистоты препарата БуХЭ. Чистота препарата БуХЭ после двух стадии очистки составляла более 90%.

#### **Выделение и очистка мутантов рчБуХЭ**

В отличие от 4рчБуХЭ, мутанты рчБуХЭ (cl 14, cl 15, cl 19 и контрольная рчБуХЭ дикого типа – WT), полученные в клетках линии FreeStyle™ 293-F, использовались исключительно для экспериментов *in vitro* и содержали преимущественно мономерную рчБуХЭ. Для проведения процедуры ультрафильтрации и концентрирования культуральной среды (в объеме 30-100 мл) использовалась мембрана Pelicon XL (Millipore, США) с размером пор 30 кДа. Далее с использованием того же модуля осуществляли диафильтрацию против буфера нанесения на металл-хелатный аффинный сорбент (300 мМ NaCl, 50 мМ натрий-фосфатный буфер pH 8.0). Для проведения металл-хелатной аффинной хроматографии использовали 1 мл колонку Tricorn 5/50 (GE Healthcare, США) с сорбентом Ni-NTA Superflow (QIAGEN, США). Концентрат среды наносили на предварительно уравновешенную буфером А (50 мМ натрий-фосфатный буфер pH 8.0, 300 мМ NaCl) колонку на скорости 0.5 мл/мин. Затем колонку промывали с той же скоростью 20 объемами

буфера А и проводили изократическую элюцию 5 объемами буфера Б (50 мМ натрий фосфатный буфер рН 8.0, 300 мМ NaCl, 300 мМ имидазол). Далее полученный элюат диализовали против 20 мМ калий-фосфатного буфера рН 7.4.

Вторую стадию очистки осуществляли с использованием анионообменной колонки MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare) согласно инструкции производителя. Для нанесения использовали 20 мМ калий-фосфатный буфер рН 7.4, объем нанесения – 3 мл. Элюцию проводили солевым градиентом NaCl от 0 до 0.3 М в 20 мМ калий-фосфатном буфере рН 7.4 в 10 объемах колонки при скорости потока 1 мл/мин. Элюат собирали по 0.5 мл, полученные фракции анализировали на наличие активности БуХЭ, объединяли и концентрировали на концентраторах Amicon Ultra-15 (Millipore, США) с размером пор 30 кДа.

#### **Химическое полисиалирование препаратов рчБуХЭ**

Препараты рчБуХЭ были химически конъюгированы с окисленными полисиаловыми кислотами (ПСА) со средней молекулярной массой 24 кДа (Xenetic Biosciences, Великобритания) по реакции восстановительного аминирования согласно [177]. Конъюгацию проводили в 0.1 М калий-фосфатном буфере рН 6.9, молярное соотношение рчБуХЭ : ПСА составляло 1 : 50 в расчете на мономер рчБуХЭ. Конечная концентрация NaBH<sub>3</sub>CN – 3 мг/мл. Реакцию проводили в течение 48 ч при 25°C. Полученный в результате конъюгат рчБуХЭ-ПСА очищали от побочных продуктов реакции многократным диализом с использованием концентраторов Amicon Ultra-15 (Millipore, США) с размером пор 30 кДа. Эффективность модификации определяли с помощью электрофореза в 8% полиакриламидном геле (с ДСН, но без меркаптоэтанола). Концентрацию активной рчБуХЭ определяли по методу Элмана.

#### **Введение радиоизотопной метки <sup>125</sup>I в препараты рчБуХЭ**

Радиоактивную метку <sup>125</sup>I в препараты 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА вводили по стандартной методике с использованием хлорамина Т (Sigma, США) и препарата KI (Изотоп, Россия), содержащего радиоизотоп <sup>125</sup>I. Белок инкубировался в течение 30 мин в PBS вместе с хлорамином Т (0.15 мг/мл) и KI (50 мкМ) в дозе 10<sup>6</sup> распадов в минуту на 1 мг белка. Реакцию останавливали добавлением 0.01% раствора тиосульфата натрия, после чего подвергали гель-фильтрации с использованием колонки HiTrap Desalting (GE Healthcare, США) объемом 5 мл.

#### **Оценка кинетических характеристик мутантов БуХЭ, устойчивых к ингибированию ФОТ**

Очищенные мутанты БуХЭ были использованы для определения констант скорости бимолекулярного ингибирования ( $k_1/K_i$ ) [192]. Высокорастворимые (с концентрацией  $\approx 2$  нМ) образцы мутантов БуХЭ и БуХЭ дикого типа (WT) инкубировались с различными

концентрациями ФОТ (в диапазоне 1.6-0.012 мкМ для РОХ и 125-1 мкМ для GD<sub>C</sub>) в течение различных интервалов времени в диапазоне 1 мин – 2 ч, после чего остаточная активность БуХЭ была измерена по методу Элмана. Константа скорости самореактивации  $k_2$  была определена по тангенсу угла наклона сигнала флуоресценции (RFU) с использованием различных концентраций БуХЭ в диапазоне 0.2-1 мкМ в процессе инкубации с 0.7-6 мкМ флуорогенного аналога РОХ-R или 1-4 мкМ GD<sub>C</sub> в течение 14 часов. Измерение флуоресценции уходящих групп флуорофоров производили на приборе Varioscan Flash (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием длин волн  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=570/585$  нм (для РОХ-R) и  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=360/450$  нм (для GD<sub>C</sub>).

#### **Очистка Fab-фрагментов.**

Среду после культивирования собирали и центрифугировали в течение 10 минут при 2000g. Супернатант фильтровали от клеточного дебриса с использованием фильтрационных модулей 0.45 мкм и 0.22 мкм (Millipore, США). Полученный фильтрат концентрировали с помощью ультрафильтрационного модуля Pelicon 2 (Millipore, США) с размером пор 10 кДа до объема системы ~100 мл согласно инструкции производителя. Далее с использованием того же модуля осуществляли диафильтрацию против буфера нанесения на металл-хелатный сорбент Ni-NTA Superflow (300 mM NaCl, 50 mM натрий-фосфатный буфер pH 8.0) для проведения первой стадии хроматографической очистки. Для этого концентрат среды разбавляли до 2 л буфером диафильтрации и снова концентрировали. Процедуру повторяли три раза после чего полученный концентрат выдавливали из системы обратным потоком воздуха и использовали для дальнейшей очистки. Конечный объем концентрированной среды составлял 300-400 мл. Колонку уравнивали указанным выше буфером и наносили образец. Fab-фрагменты антител элюировали буфером, содержащем 300 mM имидазола, 300 mM NaCl, 50 mM натрий-фосфатный буфер pH 8.0. Далее элюат диализовали против 20 mM натрий-фосфатного буфера pH 8. Дальнейшую очистку проводили на ионообменной колонке топоQ (Amersham) в 20 mM натрий-фосфатном буфере pH 8. Элюцию проводили градиентом соли – от 0 M до 1 M NaCl в 20 mM натрий-фосфатном буфере pH 8. Заключительным этапом очистки являлась гель-фильтрация на колонке Superdex 75 (Amersham) в буфере 20 mM натрий-фосфат pH 8 и 150 mM NaCl на 0,5 мл/мин.

Отсутствие видимых белковых примесей в очищенных препаратах антител контролировали ДСН-ПААГ с последующим окрашиванием Кумасси синим и иммуноблоттингом.

#### **Модификация Fab-фрагментов антитела фосфонатом и параоксоном.**

Кинетику модификации исследовали при температуре 25<sup>0</sup>С. Концентрацию фосфоната X и параоксона варьировали от 20 до 1000 мкМ и использовали 5-15 мкМ антител. Детекцию протекания реакции вели спектрофотометрически по образующемуся продукту реакции – п-нитрофенолу на 405 нм, на плащечном спектрофотометре VarioScan (Termo), оснащенного термостатируемой ячейкой. Коэффициент молярного поглощения рассчитывали исходя из рН реакционного буфера по формуле:

$$\epsilon_{\text{pNP-OH}} = ((\epsilon_{\text{pNPH}} - \epsilon_{\text{pNP}}) \times 10^{\text{pH-pK}_a}) / (1 + 10^{\text{pH-pK}_a}),$$

где  $\epsilon_{\text{pNPH}} = 114 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  и  $\epsilon_{\text{pNP}} = 18\ 131 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  молярный коэффициент протонированной и непротонированной формы п-нитрофенола, соответственно. Константы модификации определяли в соответствии с кинетической схемой Китца-Уилсона [193], в координатах Хиксона-Кребса [194]. Количественную обработку результатов кинетических экспериментов осуществляли с помощью пакета программ DynaFit software (BioKin, США). Точную концентрацию субстрата определяли спектрофотометрически по концентрации выделяющегося п-нитрофенола в результате гидролиза 0,2 М NaOH. Каждую экспериментальную кривую строили за вычетом фонового распада субстрата в растворе того же состава, но без добавления антитела.

#### **Предстаационарная кинетика взаимодействия антитело-субстрат методом остановленного потока.**

Флуоресцентные кинетические кривые были зарегистрированы на спектрофотометре «остановленной струи» SX.18MV (Applied Photophysics, Великобритания). «Мертвое время» прибора составляло 1,1 мсек. За реакцией следили по изменению внутренней флуоресценции триптофана в молекуле антитела,  $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ нм}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 320 \text{ нм}$ . Реакционный буфер содержал 50 мМ Na-фосфата рН 7,4, 150 мМ NaCl, 40% глицерина. Глицерин был использован для замедления скорости реакции в соответствии с [195]. Концентрация антитела составляла 10 мкМ, концентрацию субстрата варьировали от 5 до 1000 мкМ. Каждую кинетическую кривую усредняли минимум по данным черырех экспериментов с коррекцией фоновой флуоресценции. Количественную обработку результатов экспериментов осуществляли путем оптимизации параметров, входящих в кинетические схемы. Для этого использовали метод нелинейной регрессии, включающий численное интегрирование дифференциальных уравнений, описывающих кинетику процесса с помощью пакета программ DynaFit software (BioKin, США).

#### **Масс-спектрометрия MALDI.**

Масс-спектрометрию проводили в институте ИБХ РАН при помощи масс-

спектрометра Ultraflex II MALDI ToF-ToF (Bruker Daltonics, Германия) Масс-спектрометрические данные анализировали в программе flexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics, Germany).

### **Кристаллизация Fab-фрагмента антитела L-S35R и рентгеноструктурный анализ.**

Кристаллы модифицированного и немодифицированного параокосном мутанта L-S35R были получены с помощью метода “висящей капли” с помощью смешивания равных объемов белка (8 мг/мл в буфере 50 mM трис-HCl pH 7,4) и преципитирующего раствора (0.15-0.2 M MgCl<sub>2</sub>, 12-18% (w/v) полиэтиленгликоль 6000, 0.1 M ADA буфер pH 7.5), условия кристаллизации были очень близки к условиям кристаллизации нативного антитела A17 [196]. Через несколько дней были получены кристаллы палочковидной формы с примерными размерами 0.4 × 0.2 × 0.2 мм. Данные рассеяния для немодифицированного белка были получены на оборудовании European Molecular Biology Laboratory/Deutsches Elektronen-Synchrotron (EMBL/DESY, Гамбург) на луче X13 на накопительном кольце DORIS, используя длину волны 0.8123 Å и детектор MARCCD 165mm. Данные рассеяния для модифицированного параокосном белка были получены на оборудовании European Molecular Biology Laboratory/Deutsches Elektronen-Synchrotron (EMBL/DESY, Гамбург) на луче P14 на накопительном кольце PETRA III, используя длину волны 0.8266 Å и детектор Pilatus 6M. Данные были получены при температуре жидкого азота (100 K) и в качестве криопротектного буфера использовали буфер (0.15-0.2 M MgCl<sub>2</sub>, 12-18% (w/v) полиэтиленгликоль 6000, 0.1 M ADA буфер pH 7.5, 20% (v/v) PEG 400). Дифракционные данные были проиндексированы и интегрированы с помощью XDS [197] и масштабированы с помощью SCALA [198]. Значения I/σ(I) и CC1/2 были использованы для поредления границ разрешения для мутанта L-S35R, модифицированного параокосном, в то время как для немодифицированного белка были использованы данные с самым высоким разрешением [199]. Значения I/σ(I) и CC1/2 были использованы для определения границ разрешения для мутанта L-S35R, модифицированного параокосном, в то время как для немодифицированного белка были использованы данные с самым высоким разрешением (таблица 6). Координаты атомов и экспериментальные структурные факторы были размещены в Банке белковых структур (Protein Data Bank) с идентификационными кодами **5ADP** и **5ADO** для немодифицированного и модифицированного белков, соответственно.

**Создание комбинированного ДНК-белкового липосомального препарата для иммунизации мышей.**

В работе использовались однослойные липосомы –small unilamellar vesicle (SUV), средний размер составляет 80-200 нм. Липосомы получали методом дезинтеграции в проточном дезинтеграторе ударного типа. Для этого готовили раствор 2,3-дипальмитоил-sn-глицеро-1-фосфохолина с 2-диолеол-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламином и диолеол триметиламмония пропаном в соотношении 4:2:1, соответственно, 1% манозилированного фосфатидилэтаноламина (ManDOG). Общая концентрация липидов составляла 50 мг/мл. Полученный раствор разливали по стеклянным чашкам Петри по 20 мл и сушили в вытяжном шкафу. После полного высыхания проводили регидратацию добавлением 20 мл воды. Полученную эмульсию объединяли со всех чашек для последующей дезинтеграции. Дезинтеграцию вели в проточном дезинтеграторе для получения гомогенных малоразмерных липосом под давлением. Давление ударного воздействия составляло 150 МПа, единовременная загрузка раствора липосом 100 мл. Рабочий цикл велся при комнатной температуре в токе азота в течение 2 мин. По окончании процесса дезинтеграции полученный раствор перемешивали для усреднения. Размер частиц определяли на приборе Zetasizer Nano (Malvern). В результате были получены малые липосомы с размером  $70 \pm 10$  нм. Методика криогенной вакуумной сушки липосомированных препаратов с инкапсулированными липидно-белковыми препаратами включала в себя следующие стадии:

- Подготовка липосомной смеси к сушке
- Внесение в смесь необходимого количества водосвязывающего агента –сахарозы
- Глубокая заморозка образцов в криоблоках
- Непосредственно криогенная вакуумная сушка

Смесь липосом, полученных на предыдущей стадии, смешивали с раствором белка gp13 и плазмидной ДНК pDNA13 в массовом соотношении 333:1:2.4, соответственно. В результате смешивания инкапсуляции не происходит и компоненты представляют собой коллоидную смесь. Следующим этапом было добавление сахара до массового соотношения 1:3 по липидному компоненту. Далее подготовленную смесь стерильно в вытяжном шкафу разносили в стеклянные флаконы по 2 мл (таким образом, во флаконе получалось шесть экспериментальных доз), помещали в низкотемпературный холодильник, поддерживающий температуру  $-75^{\circ}\text{C}$ . Время глубокой заморозки составляло в среднем 10 часов.

Криогенная вакуумная сушка проводилась в два этапа. На первом происходила сублимация воды из образцов под высоким вакуумом 10-30 мм.рт.ст. при интенсивном охлаждении в течение 24 часов. На втором – охлаждение снимали для сублимации остатков

воды в образцах и со стенок вакуумной камеры. Контроль над параметрами сушки вели по показаниям уровня вакуума и температуры в камере, а также с помощью визуального осмотра. На последнем этапе лиофилизированные препараты с соответствующими мерами предосторожности переносили в стерильный бокс, где вытесняли атмосферный кислород наслоением обезвоженного фильтрованного газообразного азота. Описанная процедура позволяет снизить до минимума окисление полученные липосомных препаратов и хранить их до полугода без потери их свойств. На завершающем этапе работы осуществлялась вторичная регидратация. Вторичную регидратацию проводили в стерильных условиях непосредственно перед использованием препарата, при этом происходило окончательное инкапсулирование пептидного компонента в липосомальную оболочку. Для этого во флакон по каплям добавляли 900 мкл стерильной воды для инъекций. Отбирали пробу для анализа размера получившихся липосом.

### **Методы работы с животными**

#### **Животные, уход за животными**

Животные были получены из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН, г. Пущино. Животные разведены специально и ранее не участвовали в исследованиях. Производитель животных предоставил данные последнего контроля здоровья животных, подтверждающие их SPF-статус (животные, свободные от патогенов). Животных до начала исследования помещали в отдельную комнату содержания на период адаптации в течение 7 дней при групповом содержании в клетках. Во время этого периода у животных контролировали проявление признаков отклонения в состоянии здоровья. В эксперимент были отобраны животные без признаков отклонений здоровья, случайным образом, так, чтобы индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения в пределах пола более чем на 10%. Животных содержали индивидуально в макролоновых клетках Тип-2, оборудованных стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением, стальными разделителями для корма и стальными держателями этикеток. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды (18-26°C и 30-70% относительная влажность, 12 часовой цикл освещения и, по крайней мере, 10-ти кратная смена объема воздуха комнаты в час). В качестве подстилки использовался беспылевой подстил для грызунов, представляющий собой древесную крошку (LIGNOCEL JRS, Germany). Стандартный гранулированный корм для содержания крыс и мышей «Чара» (Ассортимент-агро, Россия) давался *ad libitum* в кормовое углубление крышки клетки. Специально подготовленная вода системой Milli-RO (Millipore, США) давалась *ad libitum* в стандартных автоклавированных питьевых бутылочках со стальными крышками-носиками.

## **Иммунизация животных**

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

Иммунизацию мышей линии SJL/J с использованием антигена – LAEEEEV-фосфоната, конъюгированного с белком носителем KLH, и контрольного антигена – Val-фосфоната для оценки специфичности ответа, проводили по стандартной «короткой» схеме, опубликованной ранее [200]. Через 21 день от начала эксперимента мыши были использованы для спленэктомии и отбора крови для иммуноферментного анализа.

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

Самок мышей линии SJL в возрасте 6-8 недель иммунизировали дважды с перерывом в 7 дней рекомбинантным белком gp15 (gp120 I-III-mbp) в дозе 150 мкг на мышь в полном адьюванте Френда с конечной концентрацией инактивированного нагреванием *M. tuberculosis* 2мг/мл. Инъекции проводили подкожно по трем точкам вдоль спины в случае первой иммунизации и в подушечки лап – в случае второй. Препарат пертуссис токсин вводили перитонеально в количестве 400 нг за день до первой иммунизации антигеном и через 2 дня после нее. Развитие клинических признаков ЕАЕ наблюдали ежедневно со следующего дня после повторной иммунизации. Через 17 дней после первой иммунизации проводили перитонеально дополнительное бустирование антигеном в буфере PBS в количестве 50 мкг белка gp15 на мышь. Одновременно у мышей производили забор крови из глазного синуса в объеме 100 мкл. Отобранную кровь смешивали со 100 мкл физиологического раствора, отделяли форменные элементы центрифугированием, добавляли глицерин до 20% и перемешивали. Препараты сыворотки крови использовали для оценки титра специфических антител. Неиммунизированные мыши были использованы в качестве отрицательного контроля. Через 21 день от начала эксперимента мыши, продемонстрировавшие в иммунологических тестах максимальный антиген-специфичный ответ, были использованы для отбора крови.

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

Для иммунизации использовали три группы мышей (два экспериментальных препарата и контроль) по 5 самок возрастом 6-8 недель. Инъекции осуществляли трижды с интервалом в 14 дней. Первой группе мышей вводили комбинированный ДНК-белковый липосомальный препарат в дозе, соответствующей инкапсулированным 50 мкг ДНК pDNA13 и 150 мкг белка gp13. Второй группе мышей вводили очищенный рекомбинантный белок gp13. Третья группа мышей, выступающая в качестве контрольной, получала инъекции физиологического раствора. Отбор крови из глазного синуса проводили во всех

группах через 7 дней после каждой иммунизации для мониторинга развития иммунного ответа. На 35 день мыши, продемонстрировавшие в иммунологических тестах максимальный антиген-специфичный ответ, были использованы для отбора крови.

### ***Исследование защитной эффективности, модифицированной рчБуХЭ in vivo***

#### **Определение фармакокинетических параметров препаратов рчБуХЭ и конъюгатов рчБуХЭ-ПСА**

Для оценки фармакокинетических характеристик полученных вариантов БуХЭ использовали мышиную модель внутривенного введения препаратов и определение остаточной специфической активности в сыворотке крови. Использовали 4 группы мышей линии BALB/c по 18 животных в каждой. Каждая группа состояла из трех подгрупп по шесть животных в каждой для отбора образца крови при различных временных интервалах 2–160 мин (подгруппа I), 1 час–72 часа (подгруппа II) и 1–8 дней (подгруппа III). Препараты БуХЭ вводили внутривенно в дозе 200 мкг/мышь (подгруппы I и II) и 500 мкг/мышь (подгруппа III). Образцы крови объемом 10-30 мкл были отобраны из глазного синуса через 2, 5, 10, 15, 30 мин, 1, 2, 3, 6, 9, 24 ч, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 дней после введения, заморожены и хранились при температуре -20°C до проведения анализа. Концентрацию БуХЭ в сыворотке крови мышей определяли, исходя из ее активности, по методу Элмана. Фармакокинетические характеристики препаратов получены, исходя из аппроксимации кривой выведения БуХЭ, в рамках двухкамерной модели [177] с использованием программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (Systat software, США).

#### **Определение профиля биораспределения препарата 4рчБуХЭ и конъюгата 4рчБуХЭ-ПСА**

Радиоизотопная метка  $^{125}\text{I}$  была введена в препараты 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА по стандартной методике. Препараты меченой 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА были введены внутривенно мышам линии BALB/c (три группы по шесть животных для каждого препарата) в дозе  $10^5$  cpm в минуту ( $\approx 100$  мкг рчБуХЭ) на мышь. Эвтаназию мыше проводили через 0.5, 3 и 48 ч после введения препаратов, образцы крови и тканей были отобраны и взвешены. Радиоактивность отобранных образцов измеряли с использованием автоматического гамма-счетчика WIZARD (PerkinElmer, США). Накопление в ткани было определено как отношение радиоактивности органа к радиоактивности крови в соответствующий момент времени.

## **Оценка протективного действия препарата 4рчБуХЭ**

Для оценки протективного действия препарата 4рчБуХЭ были использованы мыши линии BALB/c дикого типа (WT) и мыши, нокаутированные по гену БуХЭ (KO). Для каждой линии мышей были использованы 12 групп мышей-самок. Группы 1-6 получали препарат 4рчБуХЭ, группы 7-12 получали физраствор в эквивалентном объеме. Для специфического ингибирования карбоксилэстеразы плазмы крови мыши (ES1) всем группам мышей был подкожно введен высокоспецифичный ингибитор ES1 2-(*орто*-крезил)-4Н-1:3:2-бензодиоксафосфорин-2-оксид (CBDP) в дозе 1.5 мг/кг, эта временная точка принималась за «0». Через 15 минут после введения внутривенно вводили препарат 4рчБуХЭ в дозе 50 мг/кг или физраствор. Через 30 минут после начала эксперимента, обе группы мышей получали различные дозы параоксона (POX). Для определения протективной эффективности препарата 4рчБуХЭ дозы в подгруппах (n=4-9) варьировались от нелетальных (400 мкг/кг) до 100% летальных (700 мкг/кг). После введения POX происходила автоматическая регистрация тяжести проявления признаков отравления с использованием платформы TSE ActiMot Measuring System (TSE Systems, Германия). Наблюдение за животными проводилось в течение 5 суток после введения POX. Полученные кривые выживаемости были проанализированы с использованием программного обеспечения SigmaPlot 12.5 (Systat software, США) в рамках четырех-параметрической логистической модели.

## **Микрофлюидная платформа для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической и антимикробной активности**

### **Изготовление микрофлюидных чипов**

Микрофлюидные чипы имели геометрию фокусировки потока с размерами сопла 60×70 мкм или 20×22 мкм и были спроектированы с использованием САПР AutoCAD (Autodesk, США) и получены с использованием стандартной технологии мягкой литографии [201]. Мастер штампы из фоторезиста SU-8 (MicroChem, США) на кремниевой подложке были получены по технологии фотолитографии. Мастер-штампы покрывались слоем смеси эластомеров 1:10 Sylgard® 184 (Dow Corning, США) в стеклянной чашке Петри и выдерживались при 70°C в сушильном шкафу в течение 2 часов, после чего охлаждались и отделялись в стерильных беспыльных условиях от полидиметилсилоксановой (PDMS) реплики. Полученная PDMS-реплика разрезалась на отдельные половины чипов, в которых были сделаны отверстия с использованием штампа для биопсии диаметром 1.2 мм (Harris Uni-Core, США). Полученные половины чипов были ковалентно соединены с предметными стеклами 25×76 мм (Стеклоприбор, Россия), очищенными промыванием в ацетоне,

изопропанолу и MQ, с использованием плазменного окисления в установке Atto plasma cleaner (Diener, Германия). Окисление проводилось в течение 1 минуты в атмосфере кислорода с давлением 0.7 мбар в режиме максимальной мощности. Непосредственно после окисления каналы чипов были обработаны 1% водным раствором поливинилового спирта Mowiol 23-88 (Kuraray Specialities Europe, Германия) для создания гидрофильного покрытия. Для гидрофобизации чипы обрабатывали 0.5% раствором трихлор(октадецил)силана (Sigma, США) в минеральном масле или гидрофобизатором Aquapel (PPG Industries, США). Спустя 1 минуту после обработки каналов чипа, остатки модификаторов были удалены при помощи вакуума, после чего чипы нагревали в течение 3 минут в сушильном шкафу при 120°C. После модификации гидрофильные чипы сохраняли свои свойства в течении более чем года, гидрофобные более 3 лет.

### **Установка для генерации монодисперсной микрофлюидной эмульсии**

Контроль за течением жидкостей осуществлялся при помощи пьезоэлектрического контроллера давления OB1 MkII (Elveflow, Франция), который отдельно управлял течением четырех потоков жидкостей: внутренней водной фазы 1 (ВВ<sub>1</sub>) – суспензии клеток, внутренней водной фазы 2 (ВВ<sub>2</sub>) – раствора субстрата, масляной фазы (М) – минерального или фторуглеродного масла и внешней водной фазы (В<sub>3</sub>). Скорость потока каждой фазы измерялась при помощи сенсоров скорости потока (Elveflow, Франция), соединенных петлей обратной связи с контроллером давления, что позволяло автоматически поддерживать заданные скорости течения жидкостей с высокой точностью. Резервуар с внутренней водной фазой 1 и соответствующий сенсор потока располагались вертикально для того, чтобы минимизировать седиментацию клеток. Две внутренние водные фазы ВВ<sub>1</sub> и ВВ<sub>2</sub> соединялись непосредственно перед входом в чип с использованием коннектора MicroTee P-890 (IDEX, США) с мертвым объемом порядка 100 нл. Объединенный поток внутренней водной фазы подвергался последовательной эмульсификации с использованием гидрофобного и гидрофильного чипа с использованием масляной фазы. В качестве масла использовали 3% раствор эмульсификатора Abil EM 180 (Evonic, Германия) в светлом минеральном масле (Sigma, США) или 2% Pico-Surf 2 во фторуглеродном масле HFE-7500 (Dolomite, Великобритания). В качестве внешней водной фазы был использован 2% раствор Pluronic F-127 (Sigma, США), 0.1% Mowiol 23-88 в 50 мМ калий-фосфатном буфере pH 7.4. Скорости потоков ВВ<sub>1</sub>: ВВ<sub>2</sub>:М В<sub>3</sub> составляли 6:6:4:200 мкл/мин для чипов с размером каналов 60 мкм и 4:4:2:50 мкл/мин для чипов 20 мкм.

### **Инкапсуляция дрожжевых клеток и проведение ферментативных реакций в каплях**

Дрожжи, продуцирующие заякоренные ферменты или Fab-фрагмент антитела, растили в жидкой культуре YPD 16 часов, после чего индуцировали экспрессию ферментов заменой среды на ВММУ. Через 24 часа индукции клетки отмывали 3 раза 50 мМ калий-фосфатным буфером pH 7.4 и ресуспендировали в соответствующем буфере для инкапсуляции (1 мМ  $MnCl_2$ , 0.1 мМ  $CaCl_2$ , 20 мМ Трис-НСl pH 7.4 в случае ДНКазы; 0.2 мМ  $CaCl_2$ , 20 мМ Трис-НСl pH 7.4 для ЭК; 50 мМ калий-фосфатный буфер pH 7.4 для БуХЭ). Полученную суспензию клеток фильтровали через фильтр А-313 20 мкм (IDEX, США). Отфильтрованную суспензию разводили до оптической плотности 0.3 и 3 ОЕ при длине волны 600 нм для чипов 60 мкм и 20 мкм, соответственно для достижения  $\lambda=0.5$ . Клетки, продуцирующие фермент, смешивали с клетками, продуцирующие неактивное антитело, в соотношении 1:10-1:10<sup>5</sup>. Полученные смеси подвергались микрофлюидной компартиментализации (поток ВВ<sub>1</sub>) вместе с соответствующим субстратом в буфере (поток ВВ<sub>2</sub>). Использовали следующие концентрации субстратов:

фермент ДНКаза – 1 мкМ FAM-AAAAAAAAACCCCCCATATAGCGCGTTTTTTTT-RTQ1,  $\lambda_{ex}=488$  нм,  $\lambda_{em}=516$  нм;

фермент ЭК – 10 мкМ SensoLyte Rh110,  $\lambda_{ex}=490$  нм,  $\lambda_{em}=524$  нм;

фермент ВChE – 30 мкМ ВТС и 30 мкМ 3-(7-гидрокси-2-оксо-2H-хромен-3-илкарбамоил)акриловой кислоты метиловый эфир,  $\lambda_{ex}=405$  нм,  $\lambda_{em}=450$  нм.

### **Визуализация капель**

Капли микрофлюидной эмульсии с инкапсулированными клетками дрожжей или бактерий ресуспендировали и 5-10 мкл, полученной суспензии, переносили в камеру Горяева. Визуализацию капель производили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti (Nikon, Япония) с использованием стандартных фильтров для FITC и Texas Red (Nikon, Япония).

### **Отбор капель двойной микрофлюидной эмульсии с использованием FACS и регенерация клеток из капель**

Капли были отобраны с использованием клеточного сортера FACSAria III (BD, США). Выбор популяции капель двойной эмульсии осуществлялся с использованием светорассеяния и фоновой флуоресценции субстрата или ростовой среды. Отбор позитивных событий (активаторов) осуществлялся с использованием 530/30 нм эмиссионного фильтра (или 450/50 нм в случае БуХЭ). Дрожжевые были регенерированы переносом отобранной эмульсии на чашки с SAK-агаром, регенерацию проводили в трех повторях. Через 3 дня индивидуальные дрожжевые колонии переносили на свежие чашки с ВММУ-агаром для индукции экспрессии целевых ферментов. Через 3 дня чашки

анализировали на наличие флуоресценции белка-репортера mCherry с использованием прибора VersaDoc (Bio-Rad, США) в режиме освещения зеленым светодиодом и эмиссии красной флуоресценции.

#### **Отбор мутантов БуХЭ с различным уровнем активности**

Для отбора из библиотеки БуХЭ в каплях двукратной эмульсии с использованием FACS AriaIII выбирали три гейтов с различным уровнем флуоресценции капель, соответствующим 1%, 5% и 50% активности контрольных клеток, несущих на своей поверхности БуХЭ дикого типа (G3<G2<G1). Полученные в результате дрожжевые клоны и клоны до отбора регенерировали из капель как описано выше. Анализ специфической активности проводили по методу Элмана с использованием 30 мкМ ВТС и 30 мкМ 3-(7-гидрокси-2-оксо-2Н-хромен-3-илкарбамоил)акриловой кислоты.

#### **Отбор мутантов БуХЭ, устойчивых к инактивации ФОТ**

Дрожжи, продуцирующие библиотеку БуХЭ, были культивированы в жидкой среде, индуцированы и отмыты как описано выше. После этого суспензия клеток инкубировали с 0.2 мМ параоксона (РОХ) или 1 мМ аналогом зомана (GDС) в течение 30 минут при 25°C. После инкубации клетки промывали 50 мМ калий-фосфатным буфером, содержащего 2 мкМ соответствующего ФОТ. Суспензию фильтровали и использовали для инкапсуляции в капли двукратной эмульсии с использованием субстрата 100 мкМ ВТС и 100 мкМ 3-(7-гидрокси-2-оксо-2Н-хромен-3-илкарбамоил)акриловой кислоты. Эмульсию инкубировали 3 часа при 25°C и проводили отбор. Регенерированные дрожжевые клоны анализировали на наличие активности БуХЭ и устойчивости к ингибированию ФОТ.

### **Расчетные методы.**

#### **Молекулярный докинг.**

Докинг был выполнен при помощи программы AutoDock Vina 1.1.2. Проводили кластерный анализ конформаций, в которых атомы кислорода L-Y37 и фосфора параоксона находились на расстоянии не более 3.5Å. Полученные кластеры ранжировали по энергии связывания. Для каждого положения лиганда в кластере получали 50 конформаций боковых групп.

#### **КМ/ММ расчеты.**

Для проведения расчетов использовали стартовое положение полученное с использованием молекулярного докинга. Атомы боковых цепей L-Ser35 и L-Tyr37, двух ближайших молекул воды и параоксона были включены в квантово-механическую часть системы. Для проведения расчетов остальной части системы был применен метод

молекулярной механики с использованием силового поля parm99 [202]. Так как основным ожидаемыми процессами были образование и разрыв водородных связей, КМ подсистема была описана полуэмпирическим Гамильтоном PM6-D3H4 [203]. При каждом моделировании система была заполнена молекулами воды, описанными моделью TIP3P [204], общий заряд был нейтрализован ионами  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ . Вода и ионы были уравновешены вокруг комплекса белок-параоксон путем проведения МД моделирования в течение 100 псек. Расчеты гибридного КМ/ММ моделирования были проведены с помощью программного обеспечения GROMACS/MOPAC2012 [205, 206]. Время моделирования составило 10 псек, с шагом – 0.2 фсек. Термостат Нозе-Хувера был использован для проведения расчетов при фиксированной температуре 273К. Для преодоления активационного барьера применили метод метадинамики [207] с использованием плагина PLUMED. <http://www.plumed-code.org/>, [208]. Метадинамику проводили в два этапа:

до стадии образования переходного состояния с использованием одной коллективной переменной – связи между гидроксильным кислородом и протоном L-Tyr37 (Tyr-O...H)

после образования переходного состояния с использованием двух коллективных переменных – расстояние от протона до фосфорильного кислорода (P=O...H) и между кислородом уходящей группы и атомом фосфора параоксона (P...O-PNP).

параметры  $W$  и  $\sigma_i$  (высота и ширину функции Гаусса по каждой из коллективных переменных, соответственно) были выбраны  $W = 0,5$  кДж/моль и  $\sigma_i = 0,01$  нм.

Для исключения диффузии параоксона от активного остатка L-Tyr37, расстояние между ними ограничили  $2,5\text{\AA}$  [209].

Весь этот набор коллективных переменных привел примерно к 50% вероятности образования переходного состояния.

### **Расчет поверхности свободной энергии.**

Четырехмерный график был построен как зависимость энергии реакции взаимодействия с параоксоном мутантов и антитела дикого типа от трех коллективных переменных. Были выбраны три интервала значений коллективных переменных, соответствующих стадиям реакции перехода от предреакционного комплекса к переходному состоянию. Для различных этапов реакции были определена плотность конформаций на основе коллективных значений переменных. Было выбрано три области, соответствующих стадиям реакции: предреакционный комплекс соответствовал коллективным переменным: (Tyr-O ... H) $<1,2\text{\AA}$ ; (P=O ... H) $>2,5\text{\AA}$  и (P...O-PNP) $<1,9\text{\AA}$ . Активированный с помощью вращения, предреакционный комплекс, соответствовал

коллективным переменным: (Тур-О...Н)<1,2Å; (P=O...Н)<2,5Å и (P...О-РNP)<1,9Å. Переходное состояние соответствовал коллективным переменным: (Тур-О...Н)>1,2Å; (P=O...Н)<1,2Å и (P...О-РNP)<1,9Å.

### **Вычисление коэффициента диффузии.**

Моделирование структуры. Координаты параоксона были построены с помощью OpenBabel с использованием спецификации SMILES. Геометрия молекулы была оптимизирована с помощью функционала B3LYP 6-31G(3d,2f) с последующим точечным расчетом атомного заряда. Точечные заряды были получены из ESP с тем же уровнем теории с использованием R.E.D., основанного на подходе RESP [210]. Молекулярная топология с оптимизированными координатами и полученные точечные атомные заряды были построены с помощью ACPYPE [211]. Исходные структуры всех комплексов были построены на основе позиции параоксона в активированном предреакционном комплексе. Все эксперименты проводили в программном пакете GROMACS 5.0. Для расчета параметров моделирования было использовано силовое поле Parm99SB-ILDN [212]. При расчете электростатических взаимодействий был использован метод суммирования по Эвальду (Particle Mesh Ewald, PME) [213]. В расчетах была использована модель воды TIP4P [213]. Заряд системы был нейтрализован добавлением ионов Cl<sup>-</sup>. Коэффициенты диффузии были рассчитаны на основе моделирования в течении 1 нсек из соотношения Эйнштейна:

$$D = \mu_r \times k_B \times T$$

где  $D$  – коэффициент диффузии,  $\mu_r$  – подвижность частиц,  $k_B$  – постоянная Больцмана,  $T$  – абсолютная температура.

## Результаты и обсуждение.

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

#### 1.1. ПОЛУЧЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ И НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ПОВЕРХНОСТНОМУ ГЛИКОПРОТЕИНУ ВИЧ-1 GP120.

Пандемический характер ВИЧ-инфекции свидетельствует об особой актуальности этой проблемы, имеющей мировое значение. Несмотря на то, что ингибиторы протеазы ВИЧ активно используются в терапии, остро стоит вопрос об образовании лекарственно-устойчивых штаммов вируса, несущих мутантную протеазу. Определенные трудности возникают и при составлении «ингибиторного коктейля» в связи с мутантными формами ревертазы. Задачи по получении эффективно действующей вакцины также нельзя назвать полностью решенными. Миллиардные инвестиции в этот проект пока принесли относительно скромные результаты. На повестку вновь выдвинулись проекты по стимулированию собственного иммунного ответа пациентов, а также по разработке эффективной схемы «пассивной иммунизации», связанной с получением различного рода «вирус-связывающих антител». На сегодняшний день в России только официально зарегистрировано 353 тыс. людей, инфицированных ВИЧ. Наибольшее количество инфицированных – в возрасте от 21 до 25 лет. Стоимость лечения современными препаратами одного больного оценивается в 250 000 рублей ежегодно. Отсутствие эффективных препаратов с учетом высокой структурной изменчивостью вирусных компонентов требует развитие принципиально новых разработок.

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 [214]. Безуспешность попыток нейтрализации ВИЧ-1 *in vivo* антителами, полученными классическими методами иммунизацией животных поверхностными антигенами [215-217], а также существование ограниченного количества вируснейтрализующих антител требует разработки новых подходов к терапии.

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.

Особенностью гликопротеина gp120 является высокая степень гипервариабельности иммунодоминантных регионов gp120 и экранирование константных частей белка вследствие тримеризации гликопротеина, а также различными олигосахаридными группами [218, 219]. В



упаковку поверхностного антигена и сделать легкодоступными его константные эпитопы для элиминации собственной иммунной системой пациента, а направленная доставка пептидных фрагментов константных регионов gp120 в антиген презентующие клетки (АПК) позволит сместить эпитопную представленность индуцируемых антител в сторону антител, специфичных к константным регионам, увеличив, таким образом, вероятность образования нейтрализующих антител.

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 клетки АПК (Рис. 18).

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

Метод «реакционной иммунизации» основан на использовании химически активных гаптен, как правило механизм-зависимых ингибиторов протеаз, способных к ковалентной модификации активного центра выбранного фермента. Реакционный гаптен при этом может быть конъюгирован с последовательностью выбранного эпитопа для увеличения специфичности продуцируемых антител. В своей работе мы использовали дифенил-фосфонаты – ковалентные ингибиторы сериновых протеаз и эпитоп, соответствующий аминокислотным остаткам 265-270 gp120 – LAEEEEV. В работе [219] 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. 18).

Для доказательства применимости такого метода с целью индукции специфических антител была проведена иммунизация мышей линии SJL/J. Мыши линии SJL/J способны к спонтанному развитию аутоиммунного экспериментального энцефаломиелиита. Ранее было показано, что иммунизация мышей линии SJL/J приводит к образованию высокого титра каталитических протеолитических антител.

Для иммунизации использовали антиген LAEEEEV-Phosphonate, конъюгированный с белком носителем KLH, и контрольный антиген Val-phosphonate для оценки специфичности ответа.

Было показано, что сыворотки иммунизированных мышей обладали высоким статистически отличимым уровнем ковалентного связывания со специфическим субстратом (Рис. 19).

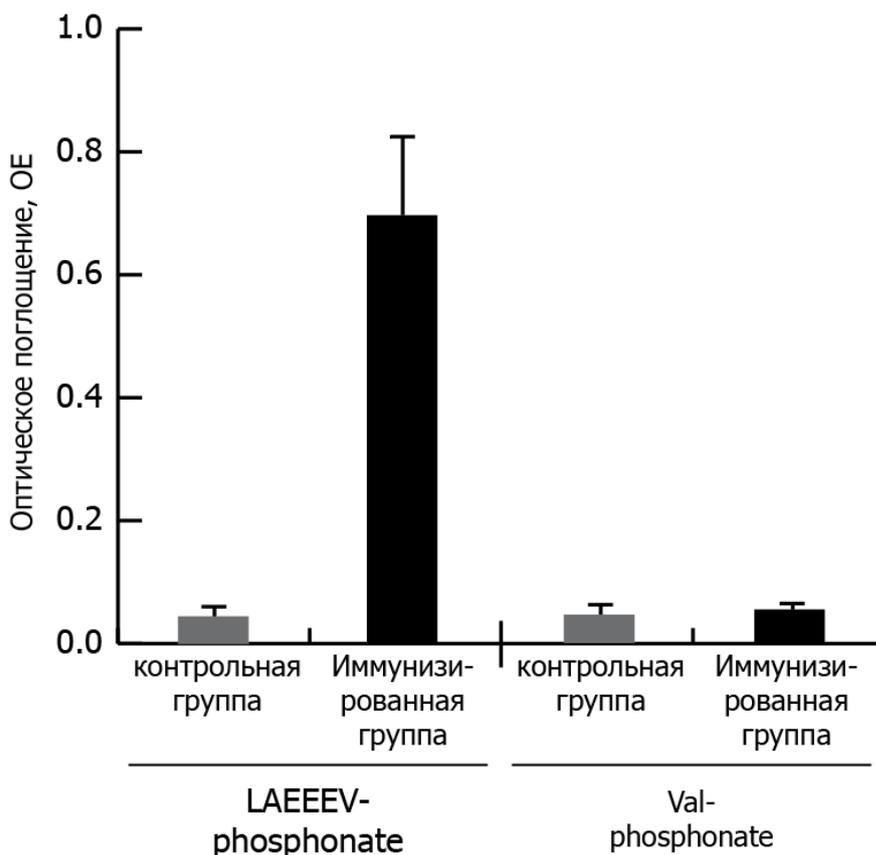


Рис. 19. ИФА-анализ сывороток мышей, иммунизированных препаратом KLH-LAEEEEV-Phosphonate, Val-phosphonate и контрольных групп.

Были получены одноцепочечные антитела 1A3E6 и 1A1E11, которые способны гидролизовать специфический флуоресцентный субстрат LAEEEEV-MCA с кинетическими константами  $k_{cat}=1.1\pm 0.5\cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$ ,  $K_M=0.053\pm 0.014 \text{ mM}$ ,  $k_{cat}/K_M=20.7\pm 14.9\cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  для одноцепочечного антитела 1A3E6 и  $k_{cat}=3.2\pm 0.7\cdot 10^{-4} \text{ мин}^{-1}$ ,  $K_M=0.048\pm 0.011 \text{ mM}$ ,  $k_{cat}/K_M=6.7\pm 2.9\cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  для одноцепочечного антитела 1A1E11.

Полученные результаты доказывают принципиальную возможность получения каталитических антител, специфичных к эпитопу gp120, методом реакционной иммунизации.

#### ***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 (Рис. 20А). На основании литературных данных для индукции экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у мышей линии SJL был выбран пептид 89-104 основного белка миелина (ОБМ, mbr),

следующего состава: VVHFFKNIIVTPRTPPPS [222, 223]. Для иммунизации были созданы генетические конструкции, кодирующие гены белков gp120 I-III (gp13) и gp120 I-III-mbp (gp15) (Рис. 20Б). Для последующей идентификации и очистки белкового препарата в генетические конструкции были введены последовательности шести-гистидинового кластера и эпитоп человеческого белка р62с-мус.

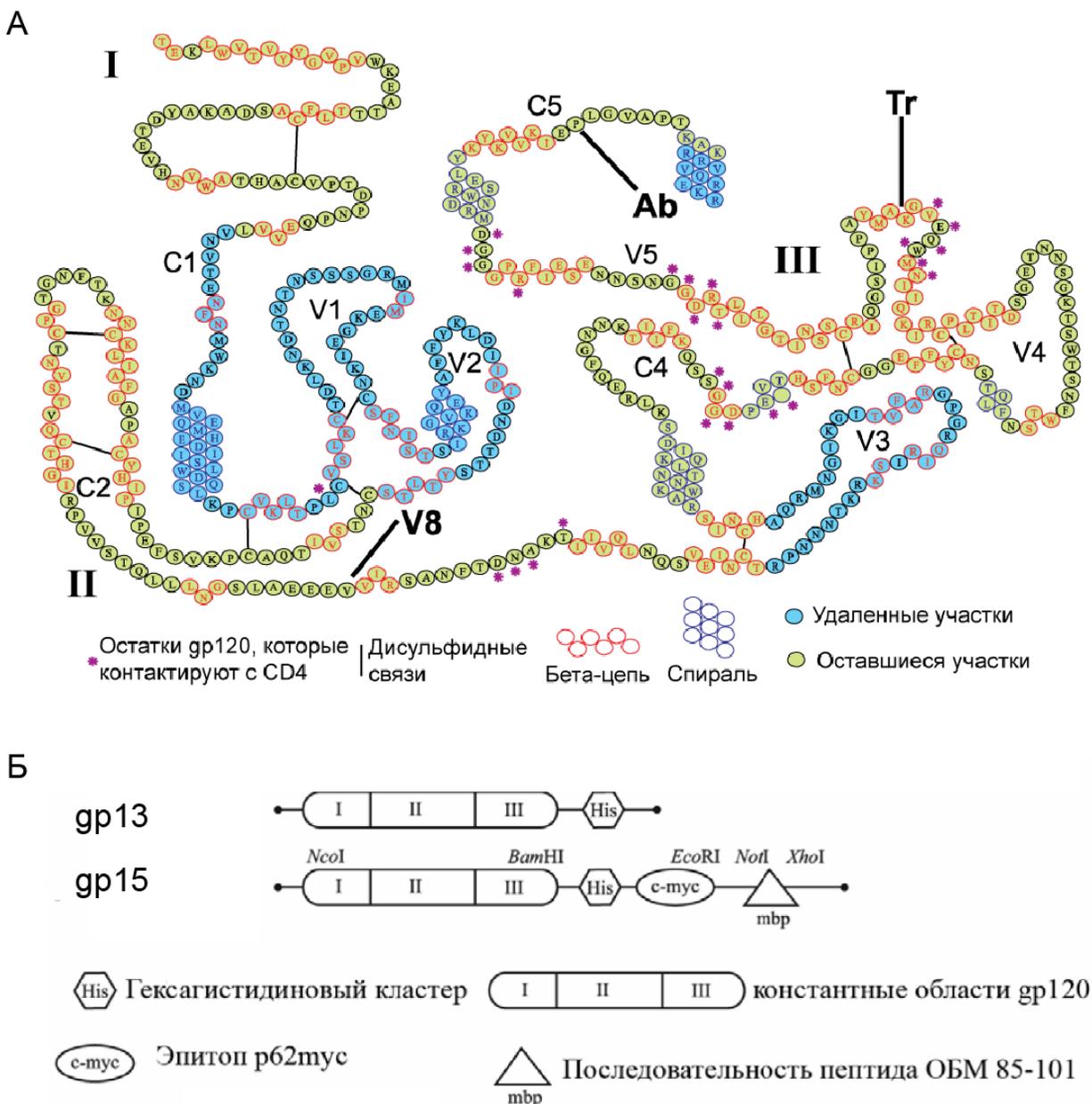


Рис. 20. (А) Последовательность гликопротеина gp120 ВИЧ-1. Отмечены константные области I, II и III; сайты расщепления трипсином и протеазой V8. (Б)Схема генетических конструкций для экспрессии генов химерных полипептидов gp13 и gp15. Адаптировано из [224]]

Экспрессию рекомбинантных белков проводили с использованием клеток линии *E.coli* BL21(DE3). Уровень экспрессии составил 15-20 мг с одного литра культуральной

среды. Получаемые препараты телец включения были очищены методом металл-хелатной хроматографии в денатурирующих условиях. Дополнительную очистку проводили с использованием обращено-фазовой хроматографии (ОФ ВЭЖХ) на полупрепаративной колонке С4. Элюат целевого препарата белка подвергали лиофилизации. Было установлено, что лиофилизированные препараты gr13 и gr15 были способны растворяться в водных растворах до концентрации 7 мг/мл. Полученный раствор белка был стабилен в течении не менее 14 дней при температуре +4С°. В случае долгосрочного хранения для стабилизации белков в раствор дополнительно добавляли дитиотриетол до концентрации 2 мМ. Чистота полученных препаратов по денситометрической оценке ДСН-ПААГ составляла не менее 95% (Рис. 21).

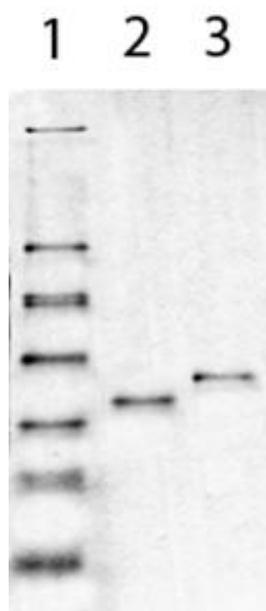


Рис. 21. ПААГ-электрофорез рекомбинатных белков gr120 (grI-III). Дорожка 1 – маркер молекулярных масс, дорожка 2 – очищенный препарат gr13, дорожка 3 – очищенный препарат gr15.

Идентичность препаратов очищенных белков была подтверждена масс-спектрометрией (Таблица 2).

Таблица 2. Молекулярные массы рекомбинантных белков. Измерение молекулярной массы белков проводили при помощи TOF MALDI (time of flight mass spectrometry with matrix assisted laser desorption-ionization) с использованием 2,4-дигидроксibenзойной кислоты в качестве материала матрицы.

Название	Рассчитанная масса смеси изотопов, Да	Измеренная масса, Да	Погрешность, %
gp13	39245	37735	3.84
gp15	42307	42075	0.54

Иммунизацию мышей линии SJL рекомбинантным белками gp13 и gp15 проводили по ранее отработанной схеме индукции иммунного ответа на чужеродный антиген на фоне развития EAE [224]. Для определения протеолитической активности были использованы неспецифический флуоресцентный субстрат BSA-FITC и специфический флуоресцентный субстрат gp120-FITC. Принцип детекции основан на описанном в литературе факте тушения флуоресценции в избыточно меченном флуорофором белке. При гидролизе такого субстрата происходит разгорание флуоресценции за счет снятия эффекта самотушения флуорофорных групп. Для проведения эксперимента получали поликлональные антитела из сывороток крови иммунизированных мышей методом аффинной хроматографии при использовании колонок Protein A HP (GE Healthcare). Результаты проведенного анализа 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. 22). Также очевидна антигенная специфичность протеолитической активности по сравнению с активностью антител из группы неиммунизированных мышей. Для 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. Преинкубация полученных поликлональных антител из иммунизированных и контрольных групп мышей с анти-видовыми антителами полностью ингибирует протеолитическую активность, что доказывает ее абзиматическую природу.

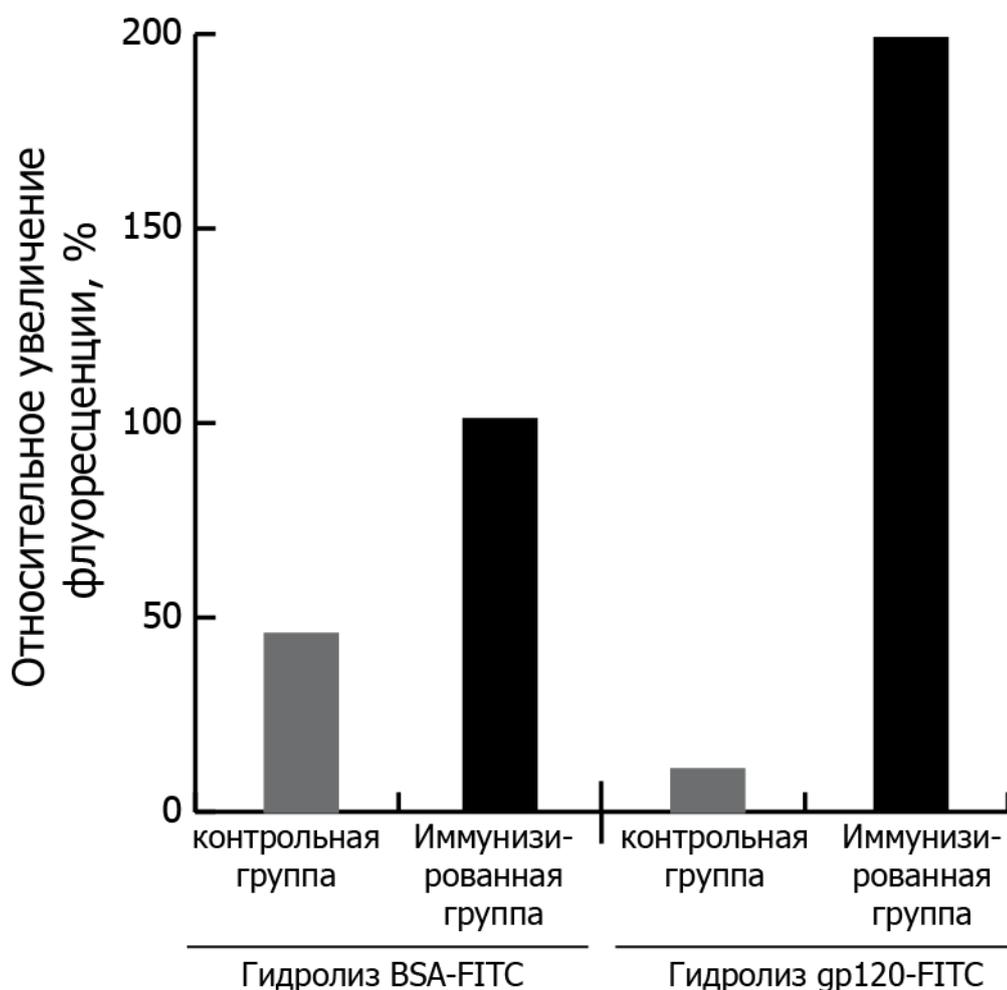


Рис. 22. Количественная характеристика каталитической активности антител по отношению к неспецифическому субстрату BSA-FITC и специфическому субстрату gr120-FITC.

Таким образом, использование метода индукции каталитической активности на фоне аутоиммунного процесса позволяет получать специфические биокатализаторы на основе антител.

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

Для увеличения титра специфических антител к gr120 был создан комбинированный ДНК-белковый препарат, состоящий из белковой компоненты – химерного белка gr13, ДНК-компоненты – плазмидной ДНК pDNA13, несущей последовательность гена белка gr13 под управлением сильного эукариотического промотора цитомегаловируса человека (CMV), заключенных в однослойные липосомы (SUV). Липидная оболочка представляет собой смесь 2,3-дипальмитоил-sn-глицеро-1-фосфохолина, 2-диолеол-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина и диолеол-триметиламмония-пропана в соотношении 4:2:1, соответственно, а также 1% маннозилированного фосфатидилэтаноламина.

Маннозилированный липид является лигандом адресной доставки липосом в дендритные клетки, которые имеют высокую плотность рецепторов маннозы [225].

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 (Рис. 23).

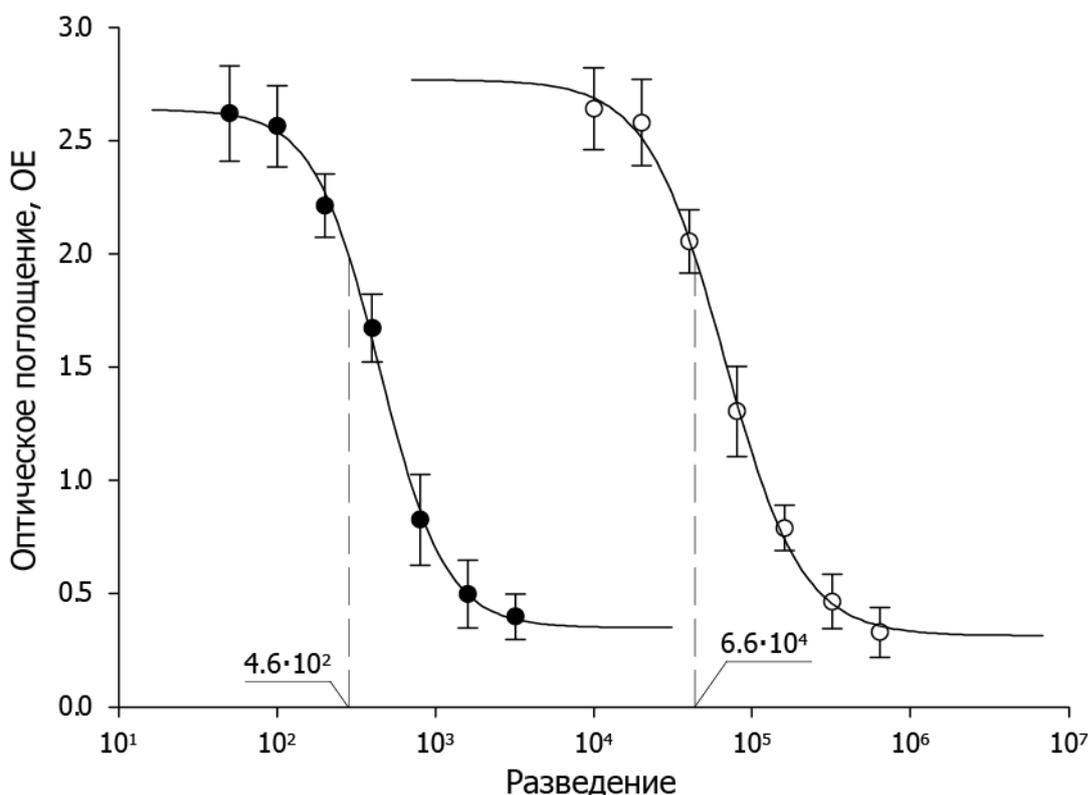


Рис. 23. Анализ титра специфических антител, полученных иммунизацией белком gp13 (черные кружки) и комбинированным ДНК-белковым липосомальным препаратом (белые кружки).

Как видно из рисунка 23 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. Эффективность нейтрализации оценивали как уменьшение Tat-индуцированной экспрессии репортерного гена люциферазы после единичного раунда заражения. Контроли включали в себя следующий набор: среда DMEM, незараженные клетки, нейтрализующая

сыворотка от зараженного пациента с длительным отсутствием прогрессии и сыворотка здорового человека в качестве отрицательного контроля. Согласно данным, представленным на рисунке 24, только комбинированная ДНК-белковая липосомальная композиция приводила к получению антител с детектируемой нейтрализующей активностью на модели вируса HIV-1.

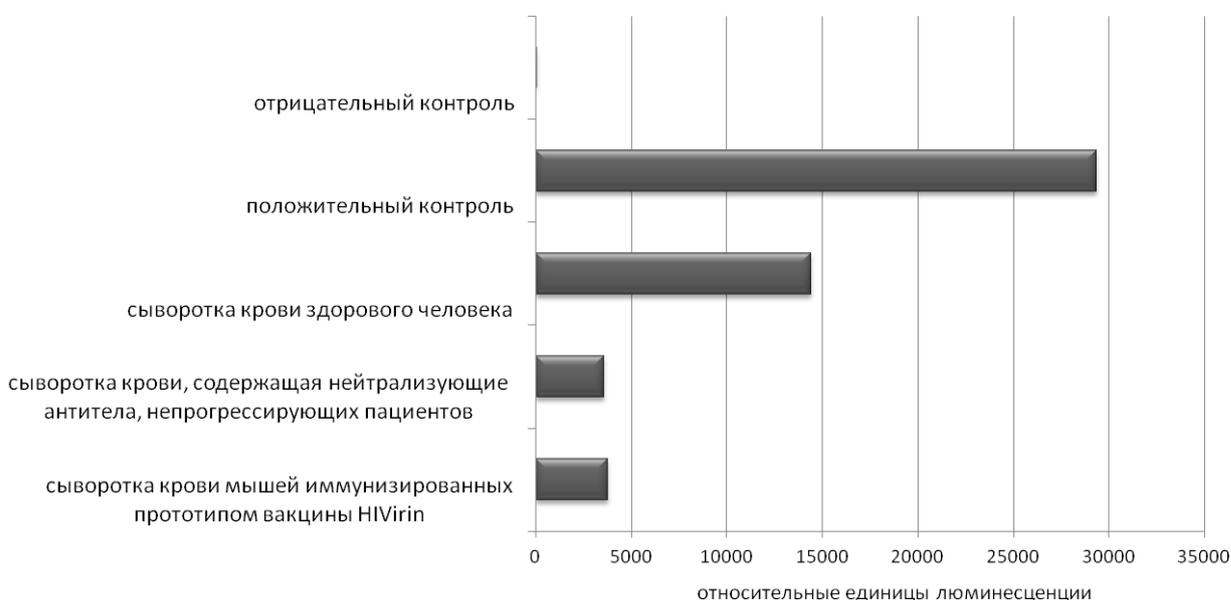


Рис. 24. Определение нейтрализующей активности сыворотки крови модельных животных после иммунизации комбинированным ДНК-белковым липосомальным препаратом.

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 биохимические основы 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.

Классический метод иммунизации аналогом переходного состояния реакции позволяет получать каталитические антитела, способные к ковалентному катализу, однако этот метод имеет существенный недостаток. Биокаталитический акт – это динамическая процесс, в ходе которого субстрат проходит через несколько переходных состояний до образования продукта. Активный центр ферментов, как эволюционно совершенных биокатализаторов, также динамически изменяется в ходе реакции. Метод иммунизации аналогом переходного состояния реакции обеспечивает существование структуры активного центра специфичного к только одному, может быть самому представленному, переходному состоянию и не позволяет учесть динамики активного центра биокатализатора. В результате, эффективность полученных таким методом антител была крайне невысокой [29, 30]. Более того, для индукции каталитических и нейтрализующих антител невозможно проводить иммунизацию токсинами. Сочетание быстрого отравляющего эффекта и высокой химической активности таких антигенов требуют разработки новых методов отбора. Текущая работа была направлена на усовершенствование существующего метода 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.

Схематично метод представлен на рисунке 25. 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) (рис. 1) (повторение – ковалентный ингибитор сериновых эстераз и протеаз выше) [226].

Наличие уходящей *n*-нитрофенильной группы делает арил-фосфонат высоко реакционноспособным по отношению к сериновым гидролазам и в тоже время соединение устойчиво в водных растворах и не проявляет неспецифической реакционной способности по отношению к инертным белкам. 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.

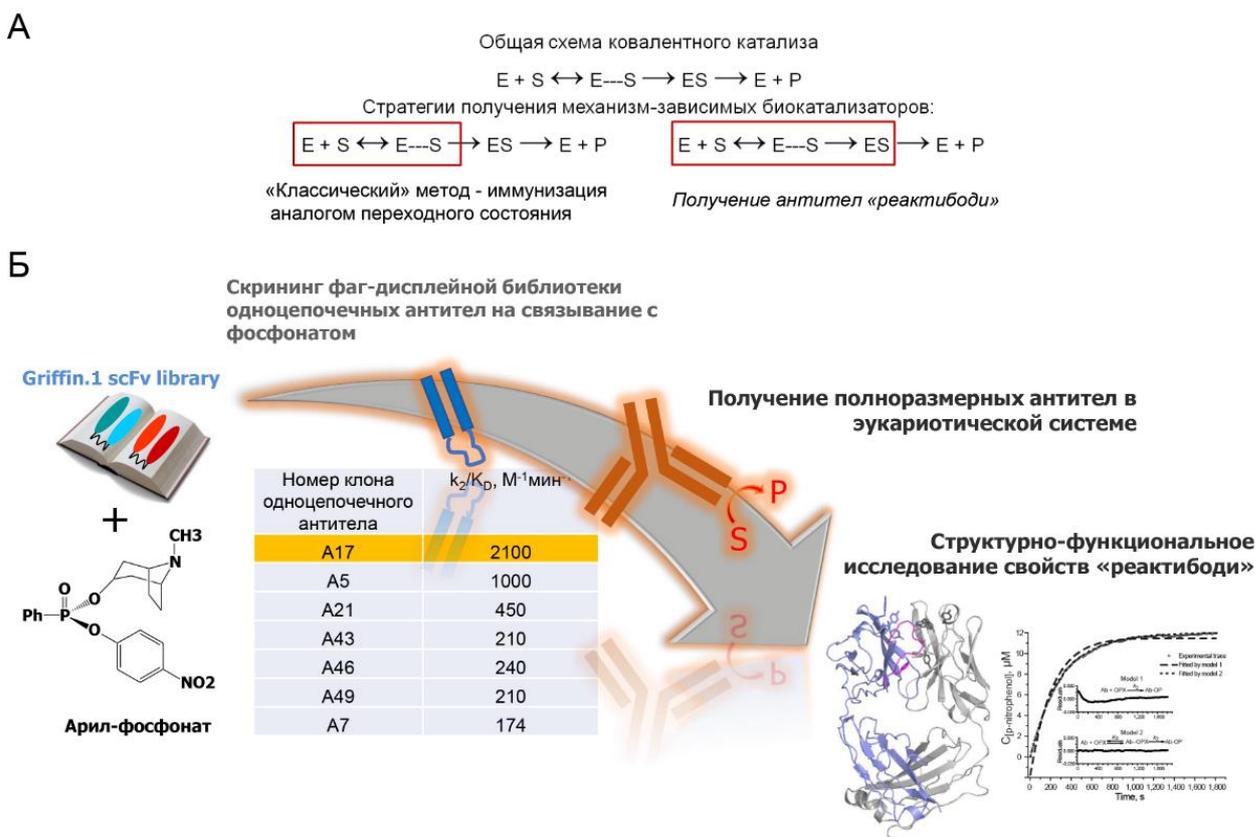


Рис. 25. Метод получения «реактибоди», предрасположенных к «ковалентному катализу». (А) – Общая схема «ковалентного катализа». Красной рамкой отмечены стадии реакции, на которые направлены методы индукции каталитических антител. (Б) – Общая схема технологии получения и исследования «реактибоди».

Для проведения всего спектра структурно-функциональных исследований была проведена работа по получению полноразмерного антитела A17 и его Fab-фрагмента.

## ***Получение полноразмерного антитела A17 в системе экспрессии клеток млекопитающих.***

Для получения полноразмерного антитела A17 его вариабельные фрагменты легкой и тяжелой цепей были переклонированы в вектора для экспрессии в клетках млекопитающих в виде полноразмерных легкой (каппа-изотип) и тяжелой цепей (гамма-изотип).

Были получены генетические конструкции pSV40/Zeo2 Lch A17 и pcDNA.1.3Hygro Hch A17. Основными элементами генетической конструкции pSV40/Zeo2 Lch A17 являются последовательность гена легкой каппа цепи антитела A17 под управлением сильного промотора CMV и ген устойчивости к зеоцину.

Основными элементами генетической конструкции pcDNA.1.3Hygro Hch A17 являются последовательность гена тяжелой гамма-1 цепи антитела A17 под управлением сильного промотора CMV и ген устойчивости к гигромицину.

Использование различных антибиотиков позволило проводить селекцию только тех клонов, которые одновременно содержали обе цепи антитела.

Полученные генетические конструкции были использованы для проведения ко-трансфекции клеточных линий CHO-K1 и миеломы NSObcl2. После получения стабильных линий трансфектом, продуцирующих антитело, были подобраны оптимальные условия экспрессии, выделения и очистки целевого белка.

Было установлено, что для клона G3 на основе клеточной линии NSObcl2 наиболее оптимальным являлось использование культуральной среды 49%DMEM (Gibco), 49% RPMI (Gibco), 2% фетальной сыворотки телят (FBS). Максимальный уровень продукции достигался через 5 суток инкубации при 37C° в CO<sub>2</sub>-инкубаторе и составлял 18 мг/л. Для клона 2B5, полученного на основе клеток линий CHO-K1, оптимальной для экспрессии являлась бессывороточная среда Pro-CHO4 (Lonza). В этом случае концентрация целевого продукта в культуральной среде достигала максимума на 8 день и составляла 10 мг/л.

Клон G3 был использован для проведения препаративной наработки антитела A17. Был получен 1 литр культуральной среды, которую осветляли центрифугированием при 13000 g в течение 10 минут с последующей фильтрацией через бумажные фильтры. Осветленную культуральную среду использовали для ультрафильтрации на приборе Pellicon (Millipore) на мембранах 300 кДа для отделения от остатков клеточного дебриса и высокомолекулярных примесей. Фильтрат концентрировали на мембранах 30 кДа и подвергали трехстадийному хроматографическому фракционированию, включающему в себя две стадии аффинной очистки – на колонке Protein A Sepharose и сорбенте с иммобилизованными антителами козы, специфичными к иммуноглобулинам человека (а-

human IgG). На финальной стадии очистки проводили гель-фильтрацию на колонке Superdex 200 (GE Healthcare). Выход целевого белка оценивали методом ИФА, он составил 70% (таблица 3).

Таблица 3. Таблица очистки полноразмерного рекомбинантного антитела А.17 из среды культивирования трансфектомы 2G3 клеточной линии NSO-*bcl2*.

Фракция	объем фракции, л	концентрация антитела, мг/л (ИФА)	количество антитела, мг	выход, %
культуральная среда	1	18	18,0	100,0
фракция, задержанная мембраной 30 кД	0,1	165	16,5	91,7
элюат с колонки Protein A Sepharose	0,006	2590	15,5	86,3
элюат с колонки $\alpha$ -human IgG	0,006	2560	15,4	85,3
элюат Superdex 200	0,004	3300	13,2	73,3

Чистота полученного препарата антитела А17 составляла не менее 95%, оценку проводили с использованием денатурирующего электрофореза в 12% ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях с последующей окраской Кумассии синим R250 и денситометрией геля. (Рис. 26А). Специфическую идентификацию очищенного антитела А17 проводили методом Вестерн-блоттинга с использованием антител константным регионам как легкой, так и тяжелой цепи (Рис. 26Б).

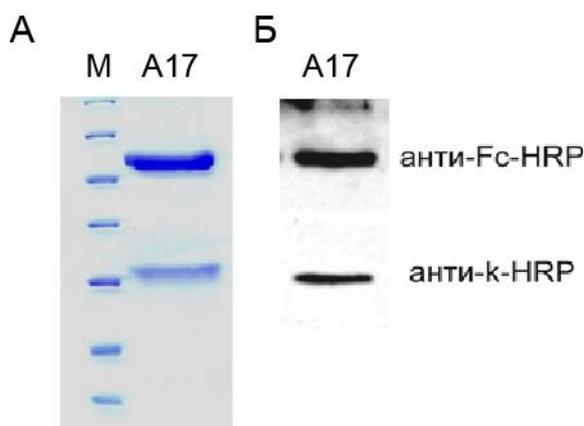


Рис. 26. Электрофореграмма денатурирующего 12% ПААГ в восстанавливающих условиях с последующей окраской Кумассии синим R250 (А) и Вестерн-блот анализ (Б) очищенного препарата полноразмерного рекомбинантного антитела А.17 из среды культивирования трансфектомы 2G3 клеточной линии NSO-*bcl2*. Визуализацию осуществляли с использованием антител козы, специфичных к Fc фрагменту (верхняя панель) и каппа цепи (нижняя панель) антител человека, конъюгированных с пероксидазой хрена. М –маркер молекулярных весов.

### ***Получение Fab-фрагмента антитела A17 в дрожжевой системе экспрессии.***

Экспрессия антител в клетках млекопитающих имеет ряд очевидных преимуществ перед прокариотическими системами, в частности позволяет достигать высоких уровней продукции полноразмерных антител. Однако серьезным недостатком этого способа является относительная длительность и трудозатратность процедуры. Таким образом, создание репертуара мутантных форм с измененной структурой CDR представляет собой большую практическую проблему. Система экспрессии рекомбинантных белков в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris* в короткие сроки зарекомендовала себя как удобный, сравнительно недорогой и технически доступный способ получения рекомбинантных продуктов. Дрожжевая культура *P. pastoris* не требует для своего роста сложнокомпонентных сред и достигает высокой плотности при росте на минимальной среде [227]. При этом она, безусловно, обеспечивает значительно более высокий уровень экспрессии рекомбинантных белков, чем система экспрессии в культуре клеток млекопитающих. Серьезным преимуществом *P. pastoris*, как системы экстраклеточной экспрессии, является ограниченное количество собственных секретируемых белков [228], что существенно облегчает очистку рекомбинантного продукта из среды. Кроме того, система экспрессии *P. pastoris* позволяет при помощи сайт-направленного мутагенеза создавать и осуществлять отбор каталитических антител с улучшенными кинетическими параметрами связывания ФОТ, что сильно затруднено в случае культуры клеток млекопитающих. Помимо этого, экспрессия в дрожжевой системе может дать принципиальную возможность изменять «активный центр» антитела с помощью подходов направленной эволюции. Это особенно ценно в случае каталитических антител [229].

Для разработки системы экспрессии каталитических антител в дрожжах *P. pastoris* были получены экспрессионные генетические конструкции, предназначенные для получения тяжелых и легких цепей Fab-фрагментов антител, pPICZαA/A17Hch и pPICZαA/A17Lch, соответственно. Конструкции были созданы на основе плазмиды pPicZα (“Invitrogen”) и содержали следующие элементы: индуцибельный промотор гена AOX1 (алкоголь оксидазы); нативный терминатор и сигнал полиаденилирования гена AOX1 дрожжей *P. pastoris* дикого типа; ген Sh ble, продукт которого обеспечивает устойчивость трансформантов к антибиотику зеоцин; нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерный пептид α-фактора из *S. cerevisiae*, необходимую для секреции продуктов экспрессии, и последовательность целевого гена легкой или тяжелой цепи, слитную с с-тус эпитопом и шестью остатками гистидина, для стандартизации процесса обнаружения и очистки целевых белков.

Полученные конструкции pPICZαA/A17Hch и pPICZαA/A17Lch были линейризованы и использованы для одновременной котрансформации клеток штамма GS115 *P. pastoris* (Invitrogen). Селекцию проводили с использованием антибиотика зеоцин. Среди полученных трансформантов были отобраны клоны с ярко выраженным ростом на MM-агаре (Mut<sup>+</sup> фенотип).

Для аналитической экспрессии было отобрано несколько клонов трансформантов. Клетки выращивали в среде BMGY, осаждали центрифугированием, меняли среду на BMMY и культивировали 96 часов, добавляя в культуральную среду метанол до 0.5% каждые 24 часа. По окончании экспрессии аликвоты культуральной жидкости анализировались с помощью денатурирующего электрофореза в 12 % ДСН-ПААГе и Вестерн-блот анализом.

Клетки, трансформированные смесью линейризованных плазмид pPICZαA/A17Hch и pPICZαA/A17Lch экспрессировали набор секреторных белков, имеющих подвижности около 54 и 27 кДа и связывающихся с антителами к константным регионам каппа цепи антител человека. Белок, имеющий подвижность около 54 кДа, также связывался с антителами к 3xFLAG эпитопу. По результатам денситометрического анализа наибольший уровень экспрессии целевого белка A17Fab составил 15 мг/л.

С целью получения высоко очищенного Fab-фрагмента антитела A17 проводили комплекс хроматографических процедур. Ниже представлена сводная таблица (Табл. 4) оценки чистоты и выхода рекомбинантного Fab-фрагмента A17 после каждой из стадий очистки.

Таблица 4. Характеристика выделения препарата рекомбинантного Fab-фрагмента антитела A17.

№ п/п	Стадия очистки	Выход, % (от общего количества белка)	Степень чистоты, полученного образца, %
1	Ультрафильтрация и концентрирование среды	100 %	40%
2	Металл-хелатная хроматография (Ni-NTA Superflow)	78 %	65%
3	Анионообменная хроматография (MonoQ 5/50 GL)	65 %	85%
4	Гель-фильтрационная хроматография (26/600 Superdex75 pg)	60 %	95%
5	Гидрофобная хроматография (HiTrapPhenyl FF)	30 %	Более 95 %

Фильтрацию с использованием модулей 0.45 мм и 0.22 мм проводили для удаления клеточного дебриса, агрегатов и высокомолекулярного содержимого погибших дрожжевых клеток. С помощью ультрафильтрационного модуля Pelicon2 10 кДа удаляли низкомолекулярные примеси, компоненты ростовой среды, при этом культуральная среда концентрировалась в 10-30 раз. Так как на С-концах цепей антитела присутствует последовательность из шести гистидинов, наиболее оптимально было использовать в качестве первой стадии выделения рекомбинантного белка металл-хелатную хроматографию. С использованием анионообменной смолы MonoQ (GE Healthcare) осуществляли отделение свободной легкой цепи, сильно гликозилированных форм белка и фракционировали гомологичные по суммарному заряду белка формы Fab-фрагмента. Далее образец очищали с помощью гель-фильтрации, что позволяло отделить Fab-фрагмент от агрегатов и свободной тяжелой цепи антитела, имеющих сходный заряд, но отличающихся по молекулярному весу. Следующая стадия хроматографической очистки была предназначена для окончательного удаления родственных Fab-фрагменту примесей, а именно для удаления гликозилированной формы белка, не адсорбирующейся на гидрофобном сорбенте Phenyl Sepharose FF.

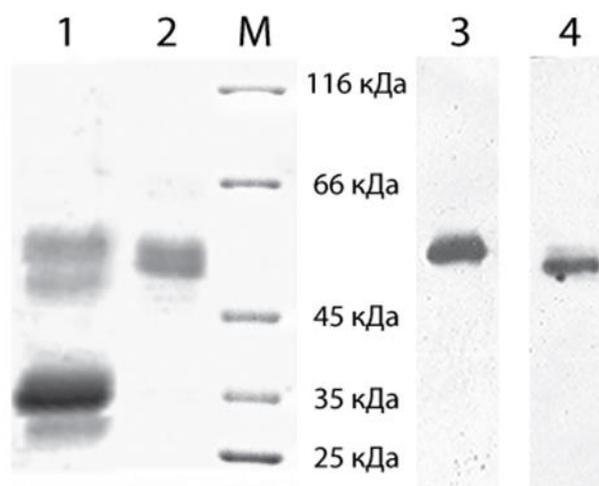


Рис. 27. Электрофоретический анализ очистки препаратов Fab-фрагмента A17. Дорожка 1 соответствуют аликвоте концентрата культуральной жидкости; дорожка 2 – очищенному препарату; дорожки 3 и 4 – Вестерн-блот анализ аликвоты очищенного препарата Fab-фрагмента A17, проявленный с использованием конъюгатов  $\alpha$ -3xFLAG-HRP (3) и  $\alpha$ -каппа-HRP (4); M – маркер молекулярного веса

Первичная аминокислотная последовательность исследуемых Fab-фрагментов не содержит сайтов для N-гликозилирования, наблюдаемое O-гликозилирование проходит в дрожжевой системе по остаткам серина, треонина и тирозина бессистемно, в случайном

порядке. Стадия гидрофобной хроматографии необходима в случаях жесткой необходимости получения гомогенного образца. После каждой стадии очистки проводили электрофорез в ДСН-ПААГ в невосстанавливающих условиях с последующей оценкой чистоты препарата с помощью денситометрического анализа, а также качественную оценку препарата методом иммуноблоттинга с использованием специфических антител. На рисунке 27 представлен препарат Fab-фрагмента A17 после заключительной стадии очистки.

### **Функциональный анализ антитела A17.**

На первом этапе был проведен сравнительный анализ реакционной способности одноцепочечного антитела A17, Fab-фрагмента антитела A17 из *P.pastoris* и полноразмерного антитела A17, полученного в клетках *NSO-bcl2*.

Анализ реакционной способности показал, что переменные фрагменты легких и тяжелых цепей A17, полученных в виде Fab-фрагмента и полноразмерного антитела человека, сохранили способность взаимодействовать с арил-фосфонатом. При этом кинетические параметры всех трех вариантов были в целом схожи (таблица 5), при этом эффективность взаимодействия с арил-фосфонатом, отражаемая параметром ( $k_2/K_D$ ) была примерно в два раза выше. Это обусловлено меньшим значением  $K_D$ , что, по-видимому, связано большей стабильностью структуры полноразмерного антитела в сравнении с его Fab-фрагментом и одноцепочечным вариантом. Поэтому дальнейшие функциональные и структурные исследования проводили с использованием полноразмерного антитела A17.

Таблица 5. Кинетические параметры реакции одноцепочечного (scFv A17), Fab-фрагмента (Fab A17) и полноразмерного антитела A17 с арил-фосфонатом. Измерение проводили при 25°C, концентрация активных биокатализаторов 1 мкМ, концентрацию фосфоната варьировали от 10 до 1000 мкМ. Расчет вели согласно схеме Китца-Вилсона.

Биокатализатор	$k_2$ , мин <sup>-1</sup>	$K_D$ , мкМ	$k_2/K_D$ , мин <sup>-1</sup> М <sup>-1</sup> x 10 <sup>-4</sup>
scFv A17	0.32 ± 0.05	150 ± 20	2100 ± 300
Fab A17	0.28 ± 0.05	130 ± 20	2100 ± 300
A17	0.23 ± 0.05	40 ± 4	5600 ± 600

Так было показано, что полноразмерное антитело сохранило способность взаимодействия с биотинилированным производным арил-фосфоната (Bt-X) и имело

субстратную специфичность по отношению к аналогам ФОТ, сравнимую с одноцепочечным А17. В обоих случаях модификация фосфонатом Bt-X ингибируется диизопропилфосфатом (ДФФ), аминоэтилсульфонилфторидом (АЭБСФ) и параоксоном, ингибирование в случае экотиофата отсутствует (Рис. 28).

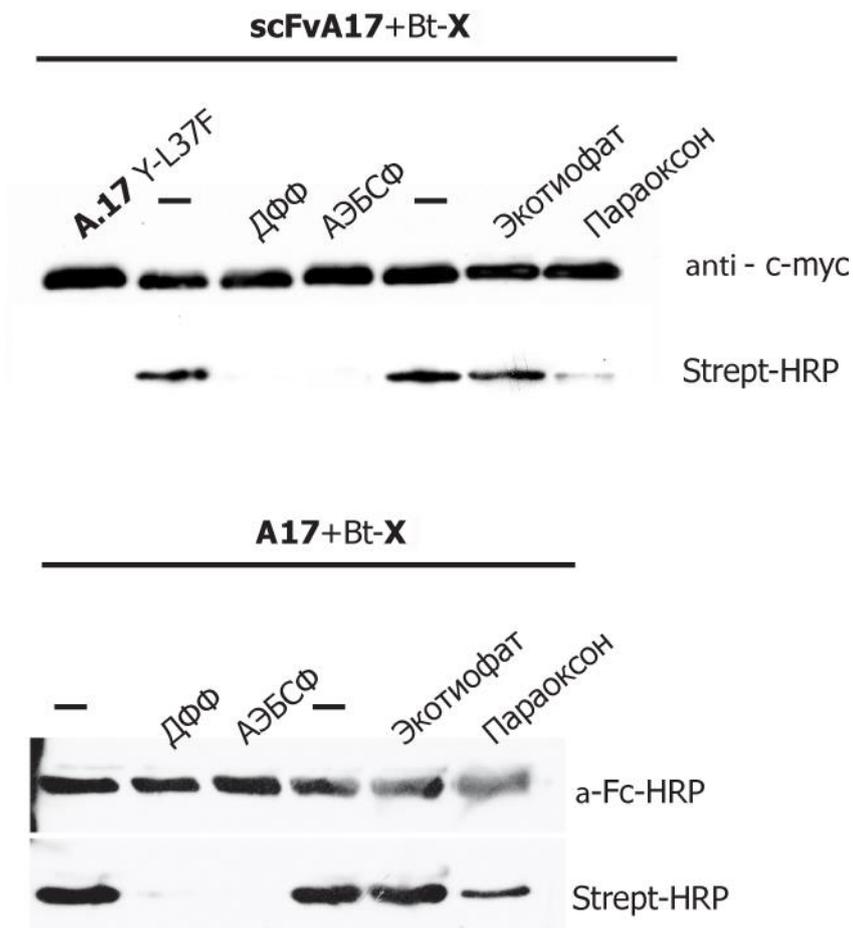


Рис. 28. Анализ взаимодействия одноцепочечного (scFvA17) и полноразмерного антитела А17 с необратимыми ингибиторами. Концентрация активных центров биокатализаторов составляла 1 мкМ, концентрация ингибиторов составляла 1 мМ. Прединкубацию с ингибиторами проводили в течение часа при 37°C, объем реакционной смеси 20 мкл. Длительность прединкубации для ДФФ и АЭБСФ составляла 1 час, для параоксона и экотиофата - 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 одноцепочечных антител нормировали по окраске антителами, специфичными к с-мус эпитопу. Концентрацию полноразмерных антител нормировали по окраске антителами, специфичными к Fc фрагменту тяжелой цепи антитела человека.

Мы обратили особое внимание на изучение реакции взаимодействия антитела А17 с параоксоном. Нейтрализация параоксона представляет прикладное значение, так как он

является активным метаболитом распространённого пестицида паратион и проблема профилактики отравлений этим соединением стоит достаточно остро.

Исследование кинетики взаимодействия антитела с параоксоном показало, что скорость реакции линейно зависит от количества антитела А17 (Рис. 29А), продукт реакции образуется в количестве, превышающем число активных центров антитела, оттитрованных в реакции с фосфонатом X (Рис. 29Б). Эти данные позволили предположить, что реакция антитела А17 с параоксоном является каталитической.

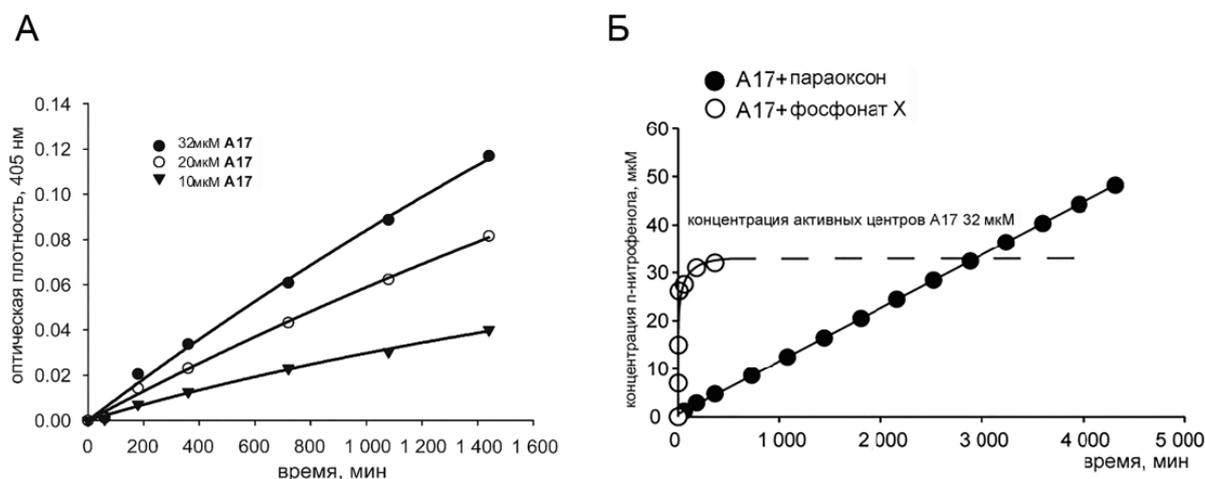


Рис. 29. Кинетический анализ гидролиза параоксона антителом А17. (А) Кривые зависимости скорости гидролиза от концентрации субстрата. (Б) Кривые взаимодействия параоксона и арил-фосфоната с антителом А17. За протеканием реакции следили по изменению оптической плотности при  $\lambda_{\text{погл}} = 400$  нм. Кривые приведены за вычетом фонового гидролиза субстрата в растворе того же состава, но без добавления антитела.

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 гидроксилamina. Молекулы гидроксилamina обладают большей нуклеофильностью и способны конкурировать с молекулами воды на стадии дефосфорилирования. Полученные результаты однозначно свидетельствуют о том, что реакция антитела А17 с параоксоном является каталитической и проходит через стадию образования ковалентного интермедиата (Рис. 30). Оценка кинетических параметров реакции показала, что дефосфорилирование является скоростью-лимитирующей стадией.

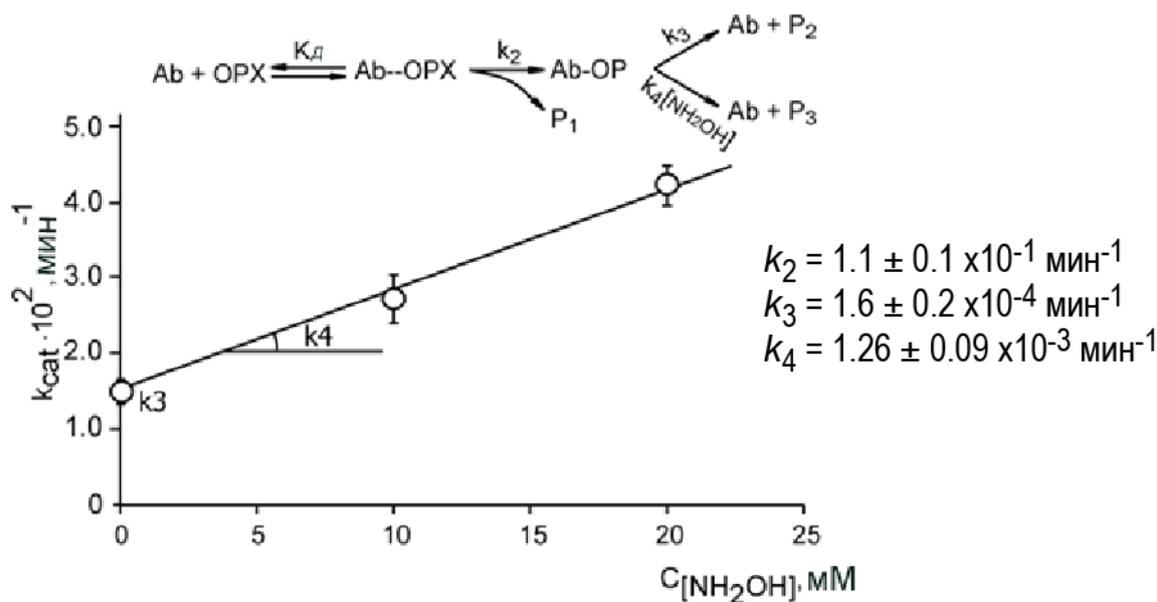


Рис. 30. Кинетический анализ реакции гидролиза пестицида параоксон антителом А17 в присутствии гидросиламина.

Медленная скорость дефосфорилирования позволила детектировать ковалентный интермедиат реакции – диэтоксифосфорильное производное антитела. Детекцию проводили с использованием масс-спектрометрии (Рис. 31).

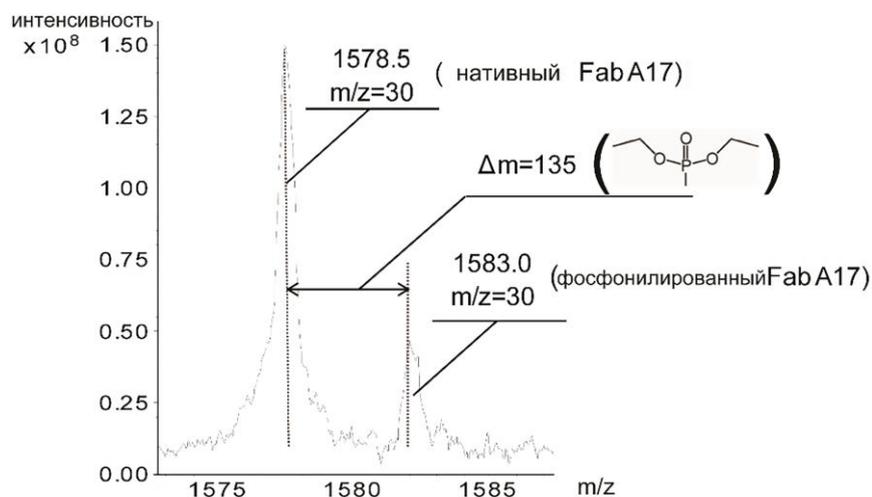


Рис. 31. Масс-спектрометрический анализ антитела А17, модифицированного параоксоном. Молекулярная масса первого пика соответствуют полноразмерному антителу, молекулярная масса второго пика соответствует модифицированному параоксоном антителу А17. Изменение массы составляет 135 Да, что соответствует массе остатка параоксона.

Было показано, что антитело A17, полностью модифицированное арил-фосфонатом, а также неактивный по отношению к арил-фосфонату мутант A17 L-Y37F не взаимодействуют с параоксоном. Это свидетельствует об участии в катализе гидролиза параоксона реакционного остатка Y37 легкой цепи.

Для изучения дальнейшего молекулярных основ каталитического механизма катализа антитела A17 был проведен его рентгеноструктурный анализ.

#### *Структурный анализ Fab фрагмента антитела A.17.*

Для кристаллизации использовали Fab фрагмент антитела A17, после обработки полноразмерного антитела папаином и дополнительной очистки из реакционной смеси методом гель-фильтрации. Кристаллизация, сбор кристаллографических данных и их анализ осуществляли в сотрудничестве с лабораториями профессора П. Массона (Гренобль, Франция), профессора А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния) и профессора А. Фрибуле (Компьень, Франция). 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. Структурные данные представлены в таблице 6.

#### *Пространственная структура Fab фрагмента антитела A.17.*

Анализ структуры 2XZA показал, что антиген-связывающий центр антитела A17 образован тремя β-тяжами варибельного фрагмента легкой и четырьмя β-тяжами варибельного фрагмента тяжелой цепи. Они образуют глубокий карман, в формировании которого участвует петля H-CDR3. Можно выделить две структурные части кармана (Рис.32, А-В). В составе верхней части выделяется группа ароматических аминокислотных остатков H-Y33, H-Y53, H-Y59; L-Y33, L-Y50 и L-W92. Подобные кластеры аминокислотных остатков тирозина являются характерной чертой антител, специфичных к фосфорорганическим соединениям и ДНК. Нижняя часть содержит ароматические аминокислотные остатки L-F100, H-W48 и H-W109, формирующие гидрофобный карман, а также L-Y37, находящийся на дне этого кармана (Рис.32, Г). Глубина активного центра антитела A17 составляет 15 Å, что не типично для каталитических антител и более характерно для активных центров холинэстераз (Рис. 33). Петля H-CDR3, содержащая остатки H-N104, H-N105 и H-W109, представляет собой неупорядоченную структуру со значением В-фактора в диапазоне 40 – 50 Å<sup>2</sup>, в сравнении со средним В-фактором 19 Å<sup>2</sup>.

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.32Д, 34А); атом азота тропинольного кольца арил-фосфоната формирует водородную связь с атомом кислорода основной цепи Н-N105. За счет этого взаимодействия петля Н-CDR3 стабилизируется в уникальной конформации и В-фактор снижается до 15–25 Å<sup>2</sup> (Рис.35). Фосфорильный атом кислорода стабилизирован молекулой воды w614, которая участвует в образовании кластера молекул воды (Рис.34Б). Этот кластер молекул воды может являться потенциальным участником гидролитической атаки фосфотирозинового аддукта.

Таблица 6. Статистика обработки дифракционных данных и уточнения структурных моделей.

	Fab A17	
	немодифицированный, pdb 2XZA	фосфонированный, pdb 2XZC
<b>Структурные данные</b>		
пространственная группа	P1211	P1211
параметры ячейки, a,b,c (Å)	52.15, 66.71, 66.10	52.15, 66.95, 66.21
общее число рефлексов	251, 440	335,57
число уникальных рефлексов	68, 859	92,464
разрешение, Å	50-1.5 (1.6-1.5)	50-1.356 (1.4-1.3)
полнота покрытия, %	99.5 (100)	98.5 (100)
R-фактор усреднения <sup>a</sup> , %	7.8 (54.1)	5.9 (39.6)
<i>I</i> / $\sigma$ <i>I</i>	23.8 (3.7)	27.8 (4.7)
избыточность	3.6 (3.6)	3.6 (3.3)
<b>Статистика улучшения</b>		
R-фактор <sup>b</sup> (R-free фактор) <sup>c</sup>	16.1 (20.5)	16.5 (18.7)
число атомов белка	3,278	3,272
число молекул растворителя	664	767
средний B-фактор, Å <sup>2</sup>	18.8	14.3
среднеквадратическое отклонение от идеального		
длина связи, Å	0.028	0.014
угол, °	2.345	1.641
хиральность, Å <sup>3</sup>	0.182	0.159

\* Значения в скобках указаны для зоны высокого разрешения.

<sup>a</sup>R-фактор усреднения (R merge)=( $\sum |I - \langle I \rangle|$ )/ $\sum I$ , где *I* экспериментальное значение интенсивности рефлекса, а  $\langle I \rangle$ - арифметическое среднее интенсивностей эквивалентных рефлексов из всех полученных наборов данных.

<sup>b</sup>R-фактор =  $\sum |F_o - F_c| / \sum F_c$ , где *F<sub>o</sub>* – экспериментальные значения структурных амплитуд, *F<sub>c</sub>* – значения структурных амплитуд, полученных на основании модели. Суммирование осуществляется по всем рефлексам набора, за исключением случайным образом выбранных рефлексов, которые включены в 5% тестовый набор и не участвуют в уточнении.

<sup>c</sup>R-free характеризует 5% тестовый набор, не участвующий в уточнении во избежание искажения модели, и рассчитывается аналогично R.

Интересным наблюдением является то, что стереохимическая конфигурация фосфотирозинового комплекса - P(S). Учитывая особенности строения активного центра,

рассмотренные выше, можно предположить, что фосфонилирование может осуществляться только одним единственным образом. Это означает, что каталитическое антитело обладает стереоспецифичностью по отношению к P(R) энантиомеру арил-фосфоната и реакция, предположительно, реализуется по  $S_N2$  механизму.

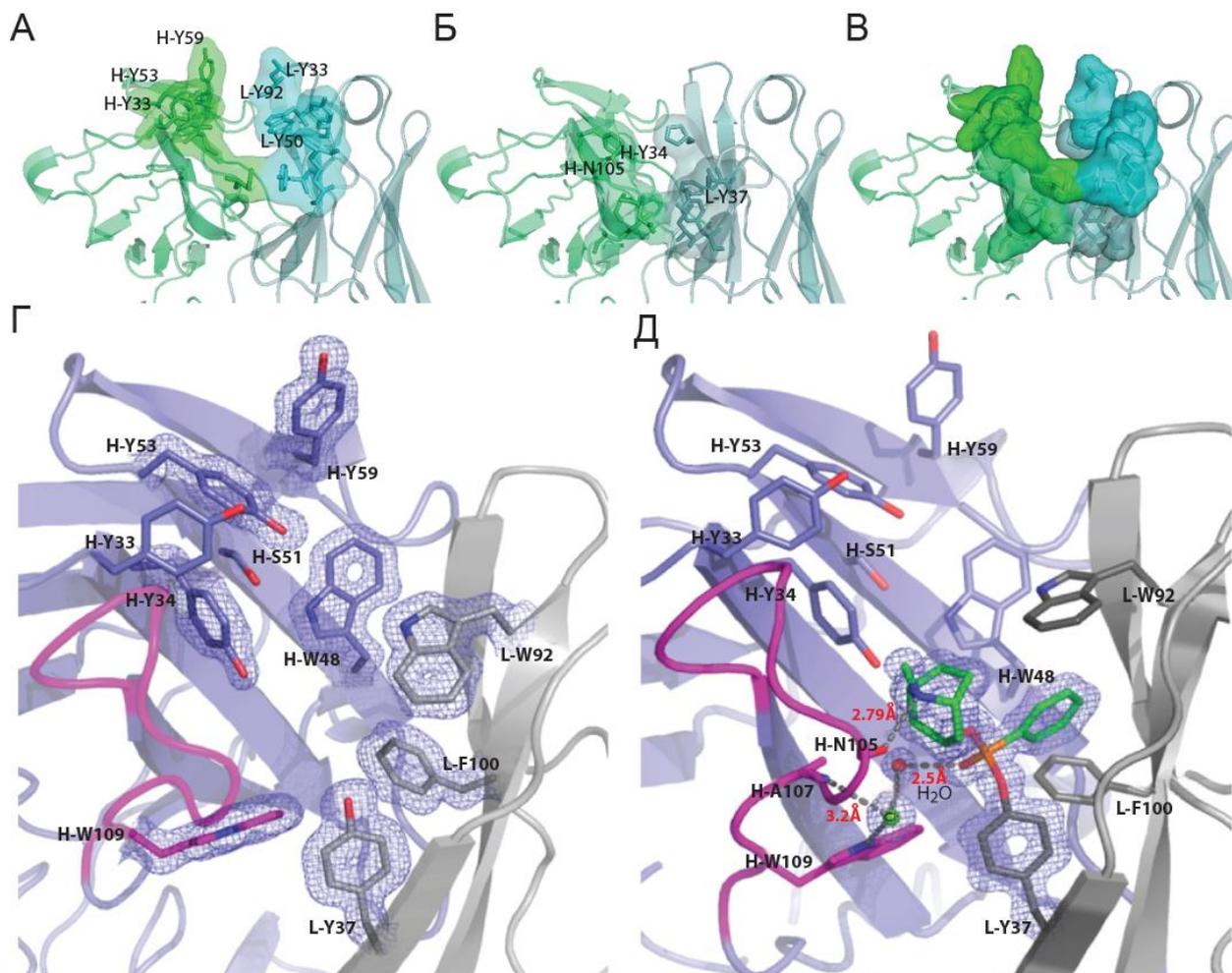


Рис. 32. Рентгеноструктурный анализ Fab A17. Активный центр антитела состоит из двух структурных частей - верхней (А) и нижней (Б), - образующих совместно сигмовидный карман (В). Легкая цепь отмечена голубым, тяжелая – зеленым цветами (А-В). Изображение структуры активного центра антитела А17 в нативном (Г) и модифицированном арил-фосфонатом (Д) состояниях. 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. Атом хлора, изображенный зеленой сферой, присутствует только в структуре модифицированного Fab-фрагмента.

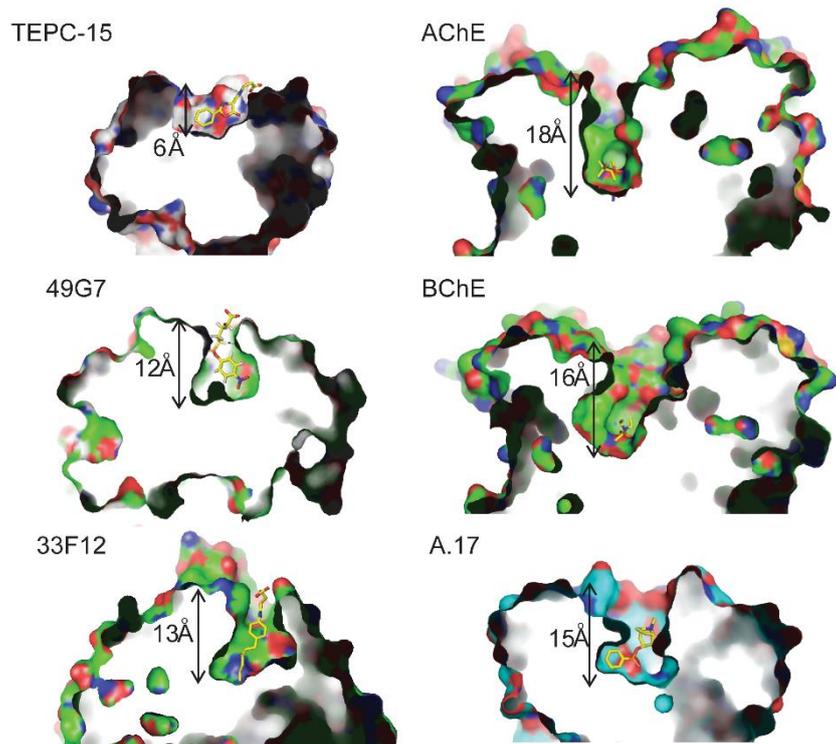


Рис. 33. Сравнение глубин карманов активных центров биокатализаторов различной природы. TEPC-15 и 49G7 – антитела с эстеролитической активностью, 33F12 – антитело с альдозазной активностью, AChE и BChE – ферменты ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы, соответственно. Глубина активного центра соответствует высоте пирамиды, вписанной в полость активного центра таким образом, что ее вершина совпадает с реакционным остатком, а основание лежит в плоскости, проведенной через три аминокислотных остатка ближайших ко верхней части активного центра биокатализатора.

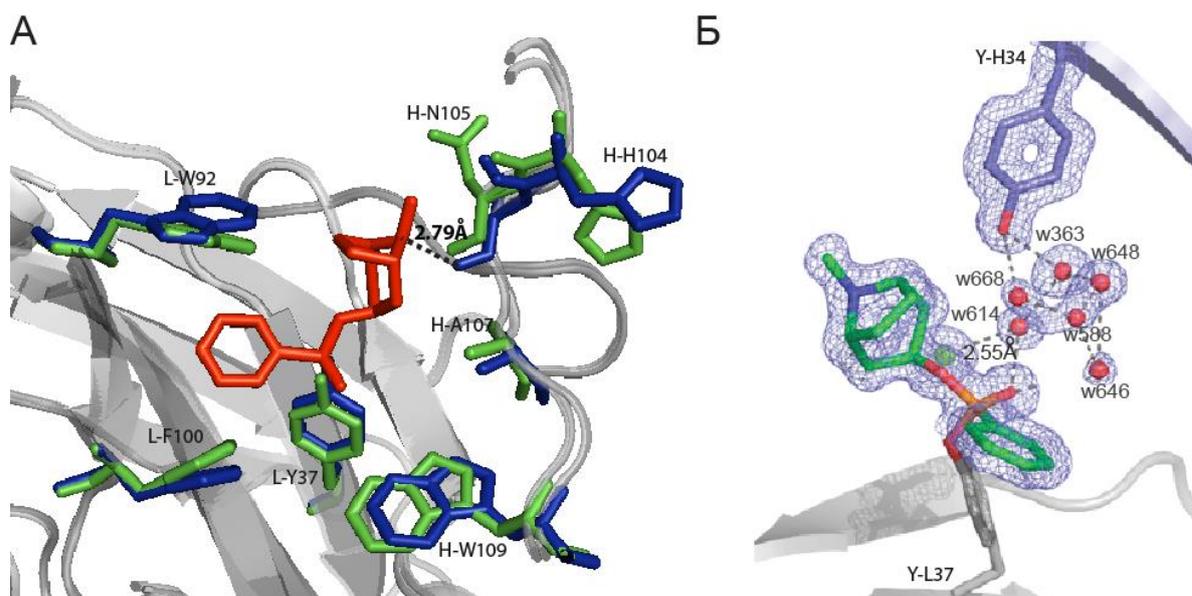


Рис. 34. Рентгеноструктурный анализ активного центра антитела A17. (А) Суперпозиция активных центров немодифицированного антитела A17 (зеленый цвет) и его ковалентного производного с остатком арил-фосфоната (синий). Показаны изменения в положении аминокислотных остатков L-Y37, L-W92, L-F100 и петли H-CDR3 (H-H104, H-N105, H-A107 и H-W109). Остаток арил-фосфоната выделен красным. (Б) Визуализация кластера молекул воды в активном центре модифицированного арил-фосфонатом антитела A17. Легкая цепь антитела отмечена серым цветом, тяжелая – голубым, остаток арил-фосфоната – зеленым. Водородные связи показаны пунктирными линиями.

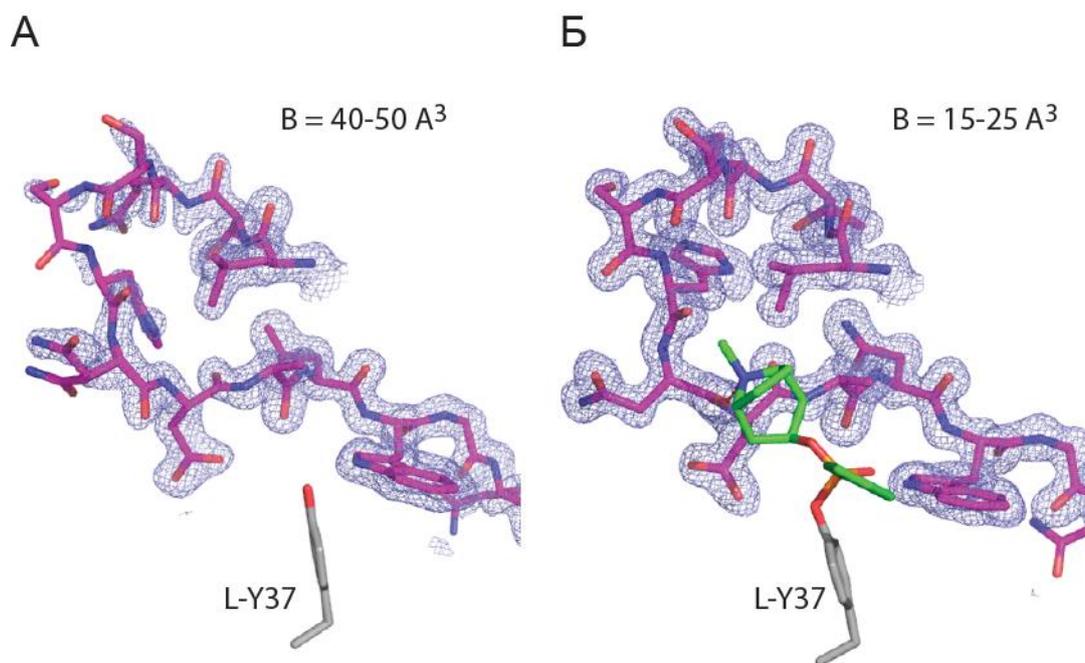


Рис. 35. Структурные изменения в H-CDR3 антитела A17 до и после фосфонирования.

Анализируя данные структурного анализа антитела A17, было предположено, что активный центр этого каталитического фермента может обладать значительной степенью подвижности. Для оценки конформационных изменений была изучена термодинамика взаимодействия антитела A17, неактивного мутанта A17 L-Y37F и фермента бутирилхолинэстеразы (БуХЭ) с арил-фосфонатом методом изотермической калориметрии титрования (ИТС, isothermal titration calorimetry). Реальная (для A17 L-Y37F) и наблюдаемые (для A17 и БуХЭ) константы диссоциации ( $K_D$ ), стехиометрия взаимодействия и изменение энтальпии системы были установлены методом нелинейной регрессии. Экспериментальные данные наиболее корректно описывались стехиометрической моделью 1:1. Расчеты производились с учетом того, что за время проведения эксперимента ковалентное взаимодействие проходит количественно. Значения полученных термодинамических параметров представлены в таблице 7.

Сравнение данных, полученных для неактивного мутанта A17 L-Y37F с результатами для ковалентно связывающих биокатализаторов – антитела A17 и БуХЭ – демонстрирует сходство термодинамических параметров взаимодействия. Это позволяет предположить, что основной вклад в интегральную величину изменения энтальпии вносит стадия нековалентного связывания. Таким образом, можно заключить, что наблюдаемые изменения термодинамических параметров по всей видимости связаны с конформационными изменениями антитела A17 при первичном взаимодействии с молекулой фосфоната.

Дополнительным фактом, подтверждающим конформационные изменения структуры антитела A17 при взаимодействии с арил-фосфонатом является изменение теплоемкости  $\Delta C_p$  в процессе реакции, которое составило  $-70 \text{ кал} \cdot \text{моль}^{-1} \text{K}^{-1}$ . По изменению теплоемкости было рассчитано изменение площади белковой поверхности, доступной растворителю, по эмпирической формуле:

$$\Delta C_p = 0.27\Delta A_{ар} + 0.4\Delta A_{неар},$$

где  $\Delta A_{ар}$  и  $\Delta A_{неар}$  – значение величины площади (в  $\text{Å}^2$ ) участков белковой молекулы, образованных ароматическими и неароматическими аминокислотными остатками, соответственно, недоступные растворителю.

Рассчитанные значения находились в диапазоне  $175 - 260 \text{ Å}^2$ , что соответствует данным полученным из кристаллической структуры –  $240 \text{ Å}^2$ .

Таблица 7. Термодинамические параметры взаимодействия антитела А17, его мутанта L-Y37F и BChE с арил-фосфонатом, установленные методом ИТС.

Абзим/фермент	Т, °С	$K_D^b$ , мкМ	$\Delta H^c$ , ккал/моль	$T\Delta S^d$ , ккал/моль	$\Delta G^e$ , ккал/моль
<b>A.17 wt</b>	10	2.9	-0.91	6.26	-7.17
	15	3.5	-1.18	6.02	-7.20
	20	2.8	-1.45	6.00	-7.45
	25	2.3	-1.89	5.78	-7.67
	37	1.7	-2.78	5.43	-8.21
<b>A.17 Y-L37F</b>	10	1.4	-1.49	6.08	-7.57
	15	3.2	-1.37	5.88	-7.25
	25	1.0	-1.50	6.65	-8.15
	37	0.72	-1.35	7.28	-8.63
<b>BChE</b>	15	7.9	-2.40	4.29	-6.69
	37	6.1	-4.35	2.93	-7.28

<sup>a</sup> Все измерения производились три-четыре раза в буфере PBS, pH 7.4.

<sup>b</sup>  $K_{Dис}$  – константа диссоциации для комплекса **A.17Y-L37F** с фосфонатом X и кажущаяся  $K_{Dис}$  для комплекса других белков с фосфонатом;

<sup>c</sup>  $\Delta H$  – изменение энтальпии; стандартное отклонение не превышало  $\pm 15\%$ .

<sup>d</sup>  $T\Delta S$  – изменение энтропии; рассчитано из уравнения  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

<sup>e</sup>  $\Delta G$  – изменение свободной энергии; рассчитано из уравнения  $\Delta G = -RT \ln K_a$ .

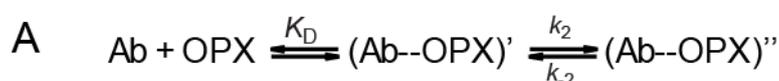
#### *Детализация механизма взаимодействия антитела А17 и арил-фосфоната.*

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 [230], [231], [232].

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 A17 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. Мы рассмотрели крайние случаи взаимодействия: механизм предсуществующих конформеров, описываемый уравнением A1 (Рис. 36А) и механизм индуцированного соответствия, описываемый уравнением A2 (Рис. 36А). Наблюдаемая в эксперименте зависимость имела гиперболический вид и описывалась уравнением A2, которое соответствует механизму индуцированного соответствия (Рис. 36Б):



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

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

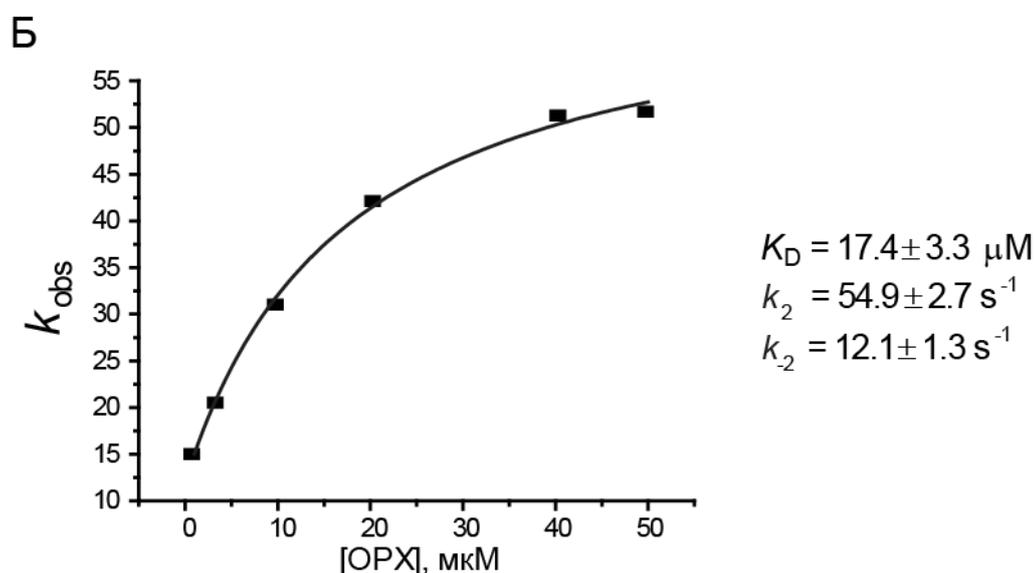


Рис. 36. Кинетическое описание механизма взаимодействия антитела A17 с арил-фосфонатом. (А) Схема реакции и уравнения, описывающие: A1 – механизм предсуществующих конформеров, A2 – механизм индуцированного соответствия. Б – кривая зависимости наблюдаемой скорости изменения флуоресценции триптофана в зависимости от концентрации добавленного арил-фосфоната (OPX) и соответствующие элементарные константы взаимодействия (справа).

Таким образом, совокупный структурный, кинетический и термодинамический анализ взаимодействия A17 с арил-фосфонатом указывает на динамическое изменение активного центра в процессе реакции. Несмотря на то, что не удалось достигнуть высоких значений каталитической эффективности, можно утверждать, что метод получения «реактибоди», предложенный в данной диссертационной работе позволяет получать эволюционно более совершенные биокатализаторы на основе антител, реализующие механизм «ковалентного» катализа. В частности, в результате использования этого подхода удалось получить каталитическое антитело, способное гидролизовать фосфорорганическое соединение параоксон по механизму ковалентного катализа.

Полученные на данном этапе работе 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.**

#### *Детализация механизма реакции антитела A17 с параоксоном.*

В предыдущем разделе описана, разработанная в ходе диссертационной работы технология получения «реактибоди» антител, предрасположенных к ковалентному катализу. Использование такого подхода позволило получить каталитическое антитело A17, гидролизующее параоксон через стадию образования ковалентного интермедиата. Структурные и кинетические исследования подтвердили образование динамической структуры активного центра антитела, включая наличие аминокислотного остатка L-Y37, непосредственно участвующего в образовании ковалентного интермедиата. Такая технология подразумевает использование в качестве источника разнообразия объектов любые комбинаторные библиотеки, в частности фаг-дисплейные библиотеки генов иммуноглобулинов. Использование библиотек генов антител имеет еще одно 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 методами отбора, что сужает размеры библиотеки, а также не позволяет осуществлять «созревание» антитела, свойственного живым системам. Получение каталитических антител с дополнительной подстройкой активного центра под заданный антиген, требует создания новых библиотек и систем отбора на каталитическую активность, а также проведения дополнительных раундов

скрининга, что увеличивает стоимость и длительность исследований. 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

### ***Определение стартовой ориентации субстрата в активном центре биокатализатора***

Для определения стартовой ориентации параоксона внутри активного центра антитела A17 был использован метод молекулярного докинга. Результаты экспериментальных исследований реакции антитела A17 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». Так как стартовое состояние реагирующих молекул не задано в явном виде, то можно ожидать определенные девиации в результатах независимых циклов расчета. Это может зависеть от конформации боковых этокси-групп параоксона. Для оценки влияния конформаций боковых групп на возможность образования «корректного» стартового состояния был проведен кластерный анализ 2000 связывающих состояний. Была зафиксирована кривая насыщения популяции «корректных» состояний, при этом ориентация параоксона, в котором возможна атака, наблюдалась примерно в 5% случаев (рис. 37).

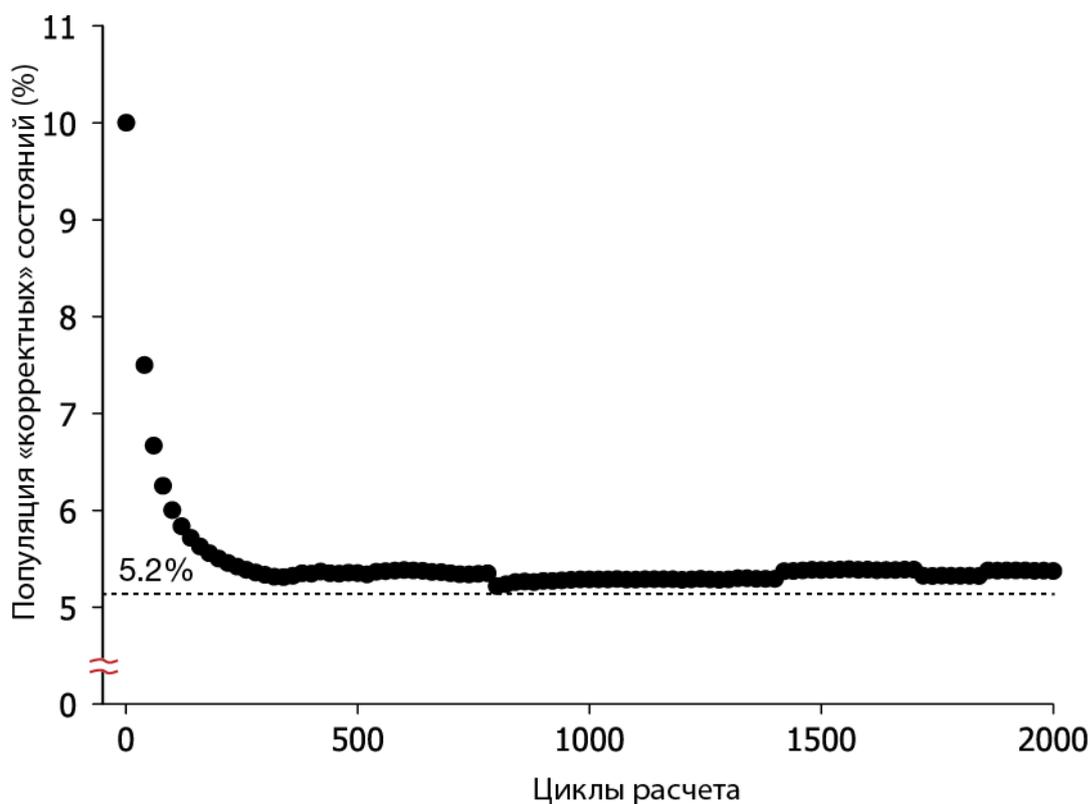


Рис. 37. Кривая насыщения популяции «корректных» состояний параоксона, взаимодействующих с молекулой антитела A17

Были найдены пять кластеров возможных положений параоксона, обладающие энергией  $-6.3$  до  $-5.8$  ккал/моль (Рис. 38 А-Г). Кластеры с энергией превышающей  $-5,7$  ккал/моль показали неупорядоченные положения субстрата (рис. 38Д).

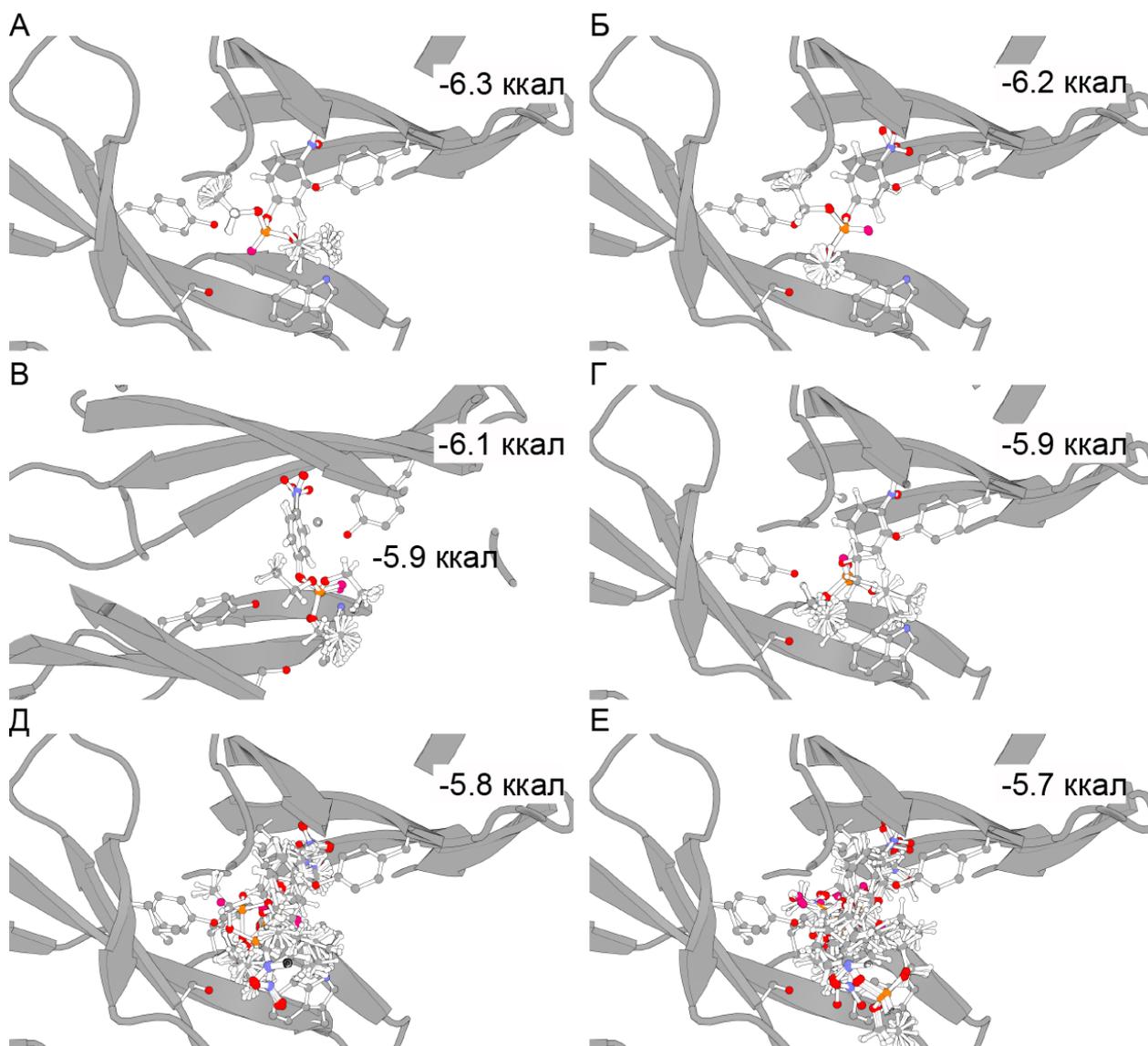


Рис. 38. Кластерный анализ состояний молекулы параоксона в активном центре антитела А17. Атомы кислорода показаны красным цветом, атом фосфора показан оранжевым цветом. Неоднородность состояний в каждом кластере представлена в виде индивидуальных конформаций. Приведены значения энергии связывания для каждого кластера.

Расчет конформаций показал, что только в кластере с энергией  $-6,3$  ккал/моль возможно *in-line* позиционирование параоксона в предреакционной ориентации. В таком состоянии происходит вращение одной С-О связи и одной Р-О и связи относительно неподвижного *p*-нитрофенольного кольца.

***Квантово-механическое описание реакции взаимодействия антитела А17 с параоксоном.***

Реакция образования ковалентной связи между атомами кислорода тирозина и фосфором параоксона достаточно редкое события, поэтому для расчета реакции была

использована метадинамика [233]. При проведении расчетов был выбран следующий набор параметров, приводивший к 50%-ой вероятности образования переходного состояния:

- До стадии образования переходного состояния следили за изменением расстояния от атома кислорода до протона нуклеофильного остатка тирозина L-Y37;
- После стадии образования переходного состояния следили за изменением расстояния от протона до фосфорильного атома кислорода (P=O...H) и расстояния от атома фосфора до атома кислорода уходящей группы (P...O-PNP);
- Для исключения диффузии параоксона от остатка Y-L37, расстояние между ними было ограничено 2.5Å;

Значения параметров  $W$  и  $\sigma_i$  установили равными 0,5 кДж/моль и 0,01 нм, соответственно. Частота добавления энергии была выбрана как +0,5 кДж/моль на каждые 50 циклов.

В результате расчетов было установлено, что реакция протекает по классическому  $S_N2$  механизму (рис. 39).

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 расстоянии 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 *m*-нитрофенольную группу, что приводит к образованию ковалентного производного и *p*-нитрофенола.



Рис. 39. Квантово-механическое описание стадии образования ковалентного интермедиата в реакции антитела A17 и параоксона.

На основании данных КМ метадинамики был построен график поверхности свободной энергии реакции образования ковалентного комплекса (рис. 5). График представляет собой зависимость энергии реакции взаимодействия от трех коллективных переменных. Зависимость энергии от плотности состояний описывается формулой:

$$F(s) = -k_B T \log(P(s)),$$

где  $k_B$  – константа Больцмана,  $T$  – температура (К) и  $P$  – вероятность обнаружить точный набор коллективных переменных.

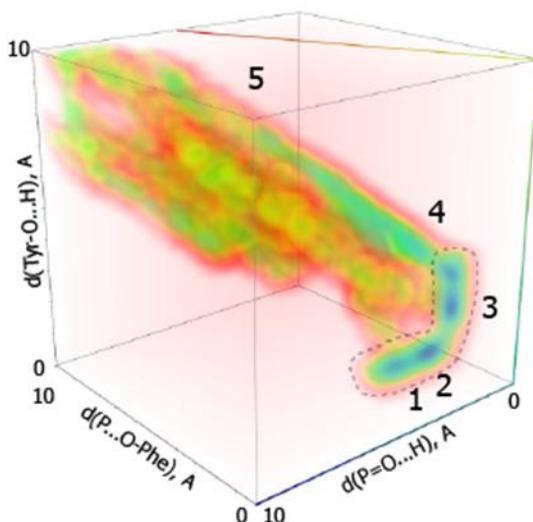


Рис. 40. График поверхности свободной энергии реакции образования ковалентного комплекса. По осям отложены значения расстояний трех коллективных переменных: расстояние от протона до кислорода L-Y37 (Tyr-O...H), расстояние от протона до фосфорильного кислорода (P=O...H), расстояние от атома фосфора параоксона до атома кислорода уходящей группы (P...O-PNP). Цветом показано изменение энергии, синий цвет соответствует низкой потенциальной энергии (большей представленности состояний), красный – высокой потенциальной энергии (меньшей представленности состояний). Цифрами отмечены стадии, соответствующие предреакционному комплексу (1), стадии образования раннего переходного состояния (2), стадии образования позднего переходного состояния (3) и разрыву связи P...O-PNP с образованием уходящей группы п-нитрофенола (4)

На рисунке 40 показаны ключевые стадии реакции антитела A17 и параоксона, соответствующие предреакционному комплексу (1), стадии образования раннего переходного состояния (2), стадии образования позднего переходного состояния (3) и разрыв связи P...O-PNP с образованием уходящей группы п-нитрофенола (4), и описанные выше.

### ***Создание виртуальной библиотеки для in silico скрининга.***

На следующем этапе была создана виртуальная библиотека для виртуального скрининга. При создании библиотеки исходили из необходимости учесть максимальное количество потенциальных мутантов. 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. 41). 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 аминокислот. В результате такого поиска было обнаружено 23 позиции (Рис. 41).

Простейший 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. Такой подход позволил сократить количество вариантов до  $1,7 \times 10^9$ . Расчет такого количества мутантов все еще велик для in silico скрининга и потребовал бы значительного количества времени.

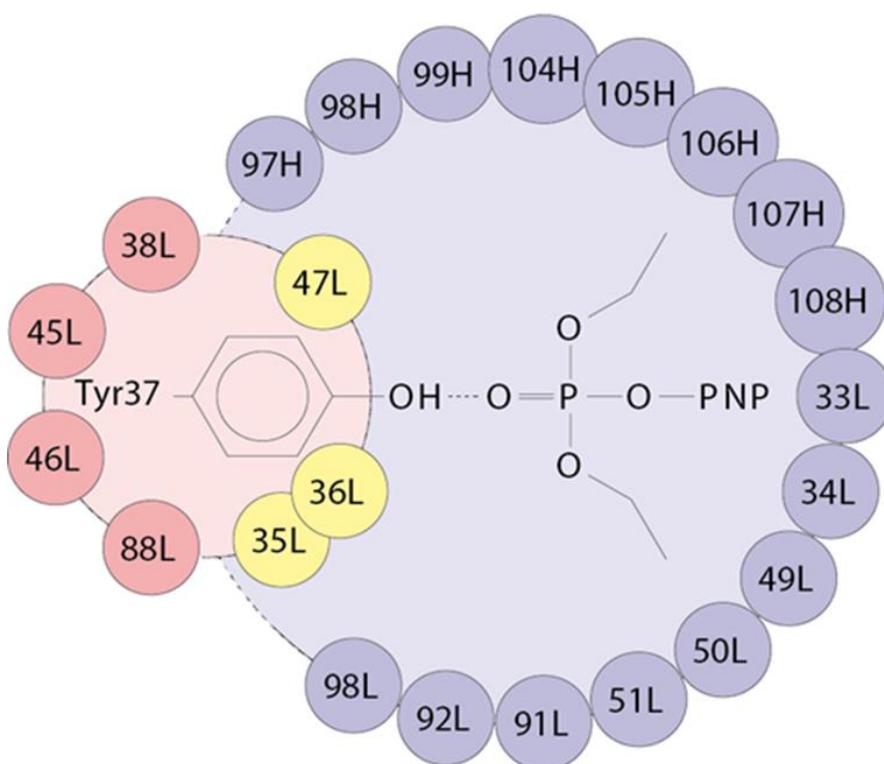


Рис. 41. Схематическое изображение позиций аминокислотных остатков активного центра антитела A17, удовлетворяющих критериям создания виртуальной библиотеки (в тексте). Синяя сфера представляет позиции аминокислотных остатков, способных образовывать водородные связи с параоксоном. Красная сфера представляет позиции аминокислотных остатков, потенциально влияющих на нуклеофильность тирозина. Желтые сферы удовлетворяют обоим условиям.

В связи с этим была проведена вторая итерация по рациональному сокращению размера виртуальной библиотеки. Для этого активный центр антитела был разделен на две сферы (Рис. 41):

- Для первой из них 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. Для определения позиций замены был проведен поиск аминокислотных остатков, расположенных вблизи молекулы параоксона и с ориентацией боковых групп в направлении субстрата. Было обнаружено 19 позиций (Рис. 41).
- Для второй сферы были выбраны позиции и остатки способные увеличить нуклеофильность L-Y37. Для этого были выбраны остатки Ser, Glu, Asp. Для определения позиций замены был проведен поиск аминокислотных остатков,

расположенных вблизи L-Y37 с ориентацией боковых групп в направлении остатка тирозина. Было обнаружено 7 позиций (Рис. 41).

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

### ***Скрининг виртуальной 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 возможность образовывать водородную связь между параоксоном и аминокислотными остатками получаемого активного центра, то есть расстояние между ними не должно превышать 3 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 антителом 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.
3. Критериям отбора удовлетворяло девять вариантов с одиночными заменами.

Сходимость результатов достигалась стократным проведением моделирования протекания реакции для каждого из девяти вариантов. Для более строгой оценки был установлен порог коллективных переменных, при которых вероятность образования переходного состояния составляла 20%, а расстояние между атомами фосфора и L-Y37 было ограничено 2,75Å. Мутанты H-A107K, L-S35H, L-S35K, L-S35R и L-L99R демонстрировали лучшую эффективность образования переходного состояния в сравнении с антителом дикого типа. Для мутантов L-W92R, L-P98K, L-P98R эффективность была ниже. Тем не менее, все девять отобранных варианта более чем на порядок чаще образовывали предреакционный комплекс (Таблица 8). 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. 42). 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 увеличивает вероятность образования переходного комплекса реакции. Таким образом, полученные результаты отражают эффективность позиционирования параоксона в активном центре мутантных антител. Как видно из рисунка 42 наиболее привлекательным кандидатом для дальнейшего изучения является вариант L-S35R.

При реализации ключевой стадии переноса протона есть вероятность образования водородной связи между гидроксилом L-Y37 и фосфорильным атомом кислорода. В таком случае приближение атома кислорода к атому фосфора на расстояние необходимое для атаки будет затруднено. Мы провели анализ вероятности возникновения такого ингибирующего эффекта для систем A17-параоксон и L-S35R-параоксон (рис. 43). Было обнаружено значительное снижение плотности конформаций на стадии переноса протона L-Y37 на фосфорильный атом кислорода (58102 в случае A17 против 9991 в случае L-S35R), это свидетельствует о снижении вероятности образования ингибирующей водородной связи).

Таблица 8. Таблица количества состояний, соответствующих различным стадиям реакции.

Антитело	Количество состояний, соответствующих не ковалентному связыванию.	Количество состояний, соответствующих переносу протона.	Количество состояний, соответствующих образованию тригональной бипирамиды.
H-A107K	100267	9919	3042
L-S35H	100387	12211	6065
L-S35K	110380	3102	6471
L-S35R	90632	19140	7801
L-W92R	54683	54770	9996
H-P98K	76117	41541	2297
H-P98R	64107	45779	9575
L-L99R	105537	2822	3334
A17	3293	3581	58674

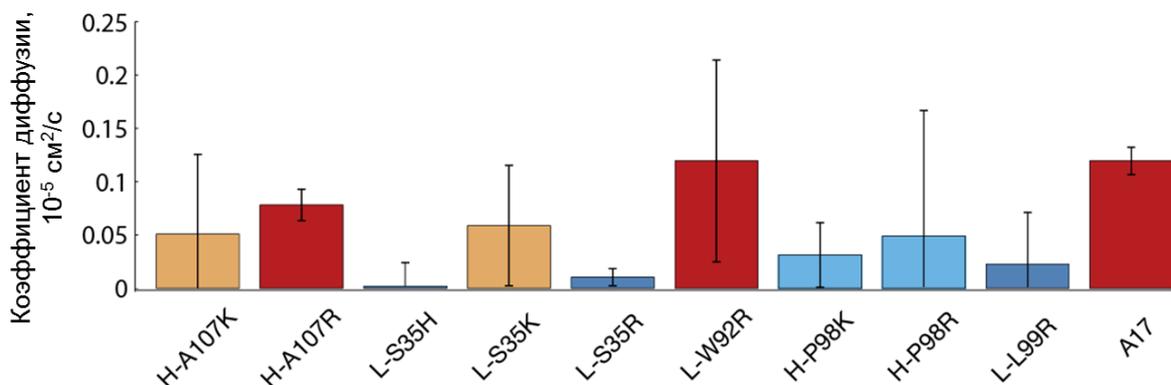


Рис. 42. Коэффициенты диффузии для параоксона в различных мутантах при классическом моделировании молекулярной динамики. Варианты, имеющие коэффициент в диапазоне  $(0-0.025) \times 10^{-5}$  выделены синим цветом,  $(0.025-0.05) \times 10^{-5}$  – голубым,  $(0.05-0.075) \times 10^{-5}$  – оранжевым,  $>0.075 \times 10^{-5}$  – красным.

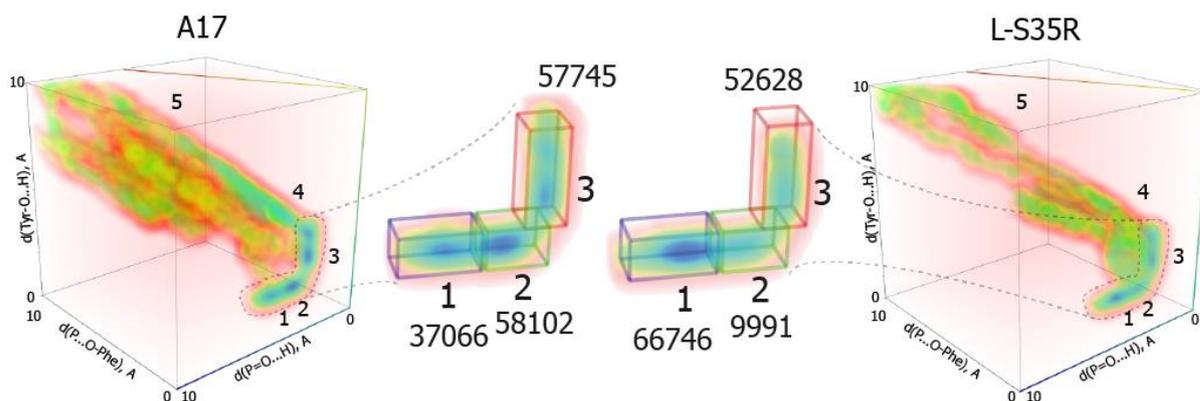


Рис. 43. График поверхности свободной энергии реакции образования ковалентного комплекса для антител A17 и L-S35R. По осям отложены значения расстояний трех коллективных переменных: расстояние от протона до кислорода L-Y37 (Tyr-O...H), расстояние от протона до фосфорильного кислорода (P=O...H), расстояние от атома фосфора параоксона до атома кислорода уходящей группы (P...O-PNP). Цветом указано изменение энергии, синий цвет соответствует низкой потенциальной энергии (большей представленности состояний), красный – высокой потенциальной энергии (меньшей представленности состояний). Цифрами отмечены стадии, соответствующие предреакционному комплексу (1), стадии образования раннего переходного состояния (2), стадии образования позднего переходного состояния (3) и разрыву связи P...O-PNP с образованием уходящей группы п-нитрофенола (4). На врезке приведены поверхности энергии и численные значения популяции состояний для стадий 1, 2 и 3.

Таким образом, в результате выполнения этой части работы был разработан алгоритм направленного изменения свойств каталитических антитела A17 в реакции с параоксоном. Общая схема и этапы алгоритма представлены на рисунке 44.



Рис. 44. “Пирамида”, представляющая общая схема и этапы действия алгоритма направленного изменения свойств каталитического антитела A17 в реакции с параоксоном.

### Экспериментальное подтверждение результатов скрининга.

Для экспериментального подтверждения разработанного алгоритма предсказания было проведено исследование структурно-функциональных свойств, отобранных в процессе расчёта вариантов антитела с наименьшим коэффициентом диффузии параоксона (рис.42, выделены синим цветом). Для наработки мутантов была выбрана дрожжевая система экспрессии, которая позволила получить клоны-продуценты антител в виде Fab-фрагментов с уровнем продукции от 8 до 20 мг с одного литра культуральной среды. Исключение составил мутант Н-Р89R, остаток пролина в 98 положении тяжелой цепи по всей видимости играет важную роль в организации структуры Fab-фрагмента и экспрессия тяжелой цепи для этого мутанта не детектировалась ни в одном из клонов. Для других мутантов проводилась наработка и выделение по схеме, описанной для антитела дикого типа, очищенные препараты антител использовались для кинетических и структурных исследований.

Результаты исследования кинетических характеристик мутантных антител в реакции с параоксоном приведены в таблице 9.

Таблица 9. Кинетические параметры реакции взаимодействия мутантов антитела А17 с параоксоном в условиях стационарной кинетики. Измерения проводили при 25°C, концентрация активных центров мутантов А17 – 10 мкМ, концентрацию параоксона варьировали от 20 до 1000 мкМ. Н. Д – не детектируется.

Параоксон				
	$k_2$ (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 с параоксоном показал, что мутант L-S35R проявляет более чем 170-кратное увеличение эффективности взаимодействия с параоксоном по сравнению с антителом дикого типа А17 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 9), 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.

Введение гистидина и лизина в 35 положение легкой цепи или аргинина в 99 положение тяжелой цепи также привело к увеличению эффективности связывания с параоксоном, однако в меньшей степени, чем для L-S35R (таблица 9). Это связано в первую очередь с увеличением значениями  $K_D$ , и, следовательно, менее эффективному образованию нековалентного комплекса, чем в случае мутанта L-S35R, для мутантов L-S35H и H-L99R при этом также наблюдается соответственно почти 4х и 8и кратное уменьшение констант скорости образования ковалентного комплекса. Полученные экспериментальные данные коррелируют с результатами по анализу коэффициента диффузии (Рис. 42), где было определено, что для L-S35H, L-S35K и H-L99R позиционирование субстрата в активном центре происходит с меньшей частотой.

Для дополнительной проверки корректности расчетов разработанного алгоритма был исследована активность мутанта с глутаминовой кислотой в положении 35 легкой цепи. Согласно компьютерным расчетам такой мутант должен быть неактивным в реакции с параоксоном. Экспериментальные данные полностью подтверждают этот факт. Это может быть объяснено тем, что отрицательно-заряженные аминокислоты конкурируют с фосфорильным атомом кислорода за протон нуклеофильного тирозина.

Введение аланина в положение 35 легкой цепи также привело к полной потере активности. По всей видимости остаток серина в положении 35 легкой цепи антитела A17 участвует в образовании водородной связи с протоном тирозина 37, стабилизируя таким образом нуклеофил для осуществления атаки.

Следует отметить, что мутанты L-S35R и L-S35K ковалентно связывают параоксон, но не обладают способностью его гидролизовать (таблица 9, не интерпретируемое значение  $k_3$ ). Для осуществления гидролиза фосфотирозинового производного антитела по всей видимости необходимо наличие гидроксил-иона в непосредственной близости от модифицированного остатка L-Y37. Однако, такое существование гидроксил-иона в активном центре в случае мутантов L-S35R и L-S35K маловероятно в связи с высоким положительным значением  $pK_a$  боковых цепей аргинина и лизина.

Единственный мутант, который сохранил способность гидролизовать параоксон – L-S35H, при этом мутант в значительно лучшей степени ковалентно связывает субстрат по сравнению с антителом дикого типа (таблица 9). Это объясняется тем, что  $pK_a$  боковой цепи гистидина равен 6.1 и присутствие гидроксил-иона, образующегося при передаче протона молекулой воды, вблизи активного центра возможно; в случае дикого типа при pH выше нейтрального остаток L-S35 также может присутствовать в депротонированной форме и выступать в качестве акцептора протона, поэтому гидролиз возможен.

Мы провели масс-спектрометрический анализ триптического гидролизата антитела L-S35R, модифицированного параоксоном. Результаты показали, что модификации подвергается пептид и показали, что модификации подвергается пептид WYQQLPGTAPK легкой цепи антитела с молекулярной массой 1288.4 Да, содержащий остаток тирозина 37, а молекулярная масса модифицированного пептида отличается на 135 Да, что равно молекулярной массе остатка параоксона. (рис. 45).

Для детализации механизма взаимодействия антитела A17, наиболее активного мутанта L-S35R и мутанта, сохранившего способность к гидролизу параоксона была изучена кинетика в предстационарных условиях методом остановленного потока. Результаты приведены в таблице 10.

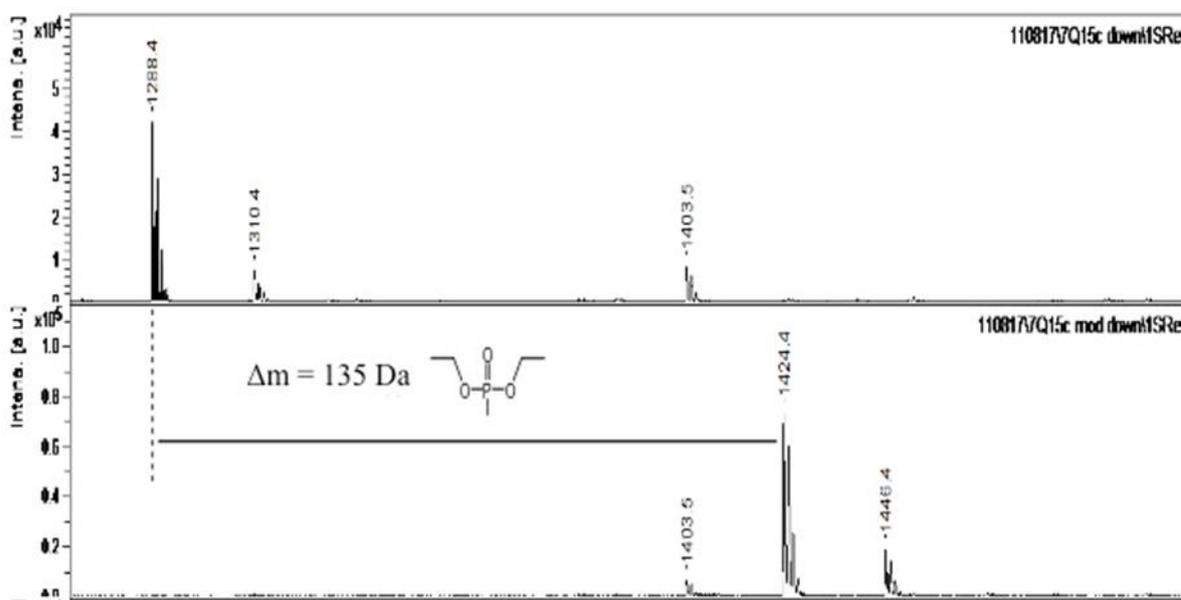


Рис. 45. Масс-спектрометрический анализ триптического гидролизата антитела L-S35R до (верхний спектр) и после (нижний спектр) модификации параоксоном. Разница молекулярных масс соответствующих пиков пептидов (WYQQLPGTAPK), содержащих и не содержащих модификацию составляет 135 Да, что соответствует молекулярной массе остатка параоксона.

Таблица 10. Данные предстационарной кинетики для Fab-фрагмента антитела дикого типа и мутантов L-S35R и L-S35H. Концентрация антитела составляла 10 мкМ, концентрацию субстрата варьировали от 5 до 1000 мкМ.

Антитело	$k_{\text{набл.1}}'$ -1 М мин	$k_{\text{набл.2}}'$ -1 МИН
A17	430±20	17±2
L-S35R	360±20	76±5
L-S35H	220±10	40±5

Из представленных данных следует, что все три белка - мутанты L-S35R и L-S35H и антитело дикого типа A17 - реализуют 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.

### ***Структурный анализ мутанта L-S35R.***

Для изучения молекулярных структурных особенностей механизма взаимодействия антитела L-S35R с параоксоном были получены кристаллические структуры не модифицированного антитела L-S35R и его ковалентного комплекса с остатком параоксона L-S35R-Par (PDB 5ADP и 5ADO, соответственно). Статистические характеристики наборов дифракционных данных и уточнения структурных моделей представлены в таблице 11.

Анализ структур L-S35R-Par показал, что остаток L-R35 в структуре ковалентного комплекса образует широкую сеть водородных связей с участием молекулы параоксона, остатка H-N105 и молекул воды (рис. 46А). Аналогичная ситуация наблюдалась в случае комплекса антитела A17 с арил-фосфонатом (рис. 46Б).

Очевидно, что эти взаимодействия стабилизируют фосфорилированный белок. Наложение структур L-S35R и L-S35R-Par позволило установить, что остаток L-R35 смещается 5.2 Å, и в освободившееся пространство укладывается остаток параоксона (рис. 46В). Это наглядно демонстрирует реализацию механизма индуцированного соответствия, показанного выше.

Проведенный выше анализ данных показывает, что в структуре L-S35R-Par имеется только одна дополнительная водородная связь между NH1-группой аргинина и фосфорильным кислородом (рис. 46А). Это показывает принципиально возможное участие L-R35 во взаимодействии с субстратом, обеспечивая тем самым наблюдаемое 170-кратное увеличение скорости реакции.

Структуру, полученного антитела L-S35R-Par, сравнили со структурами известных ферментов, в которых взаимодействие с фосфорорганическим соединением осуществляется через образование ковалентного интермедиата с остатком тирозина активного центра. Была обнаружена высокая степень сходства в организации основных элементов активного центра между мутантным антителом и ферментами топоизомеразой 1В и Cre-рекомбиназой (Рис. 47).

Таблица 11. Статистика обработки дифракционных данных и уточнения структурных моделей.

	Мутант L-S35R	
	Немодифицированный, pdb 5ADP	Модифицированный, pdb 5ADO
Структурные данные		
Источник	Луч X13, DORIS, EMBL/DESY	Луч P14, PetraIII, EMBL/DESY
общее число рефлексов	334	3600
диапазон колебаний (°)	0,45	0,1
пространственная группа	P 1 2 <sub>1</sub> 1	P 1 2 <sub>1</sub> 1
параметры ячейки	a=52.55 Å, b=67.04 Å, c=66.95 Å, β=107.6°	a=52.66 Å, b=67.08 Å, c=66.7 Å, β=107.5°
разрешение (Å)	19,4 – 2,13 (2,21 – 2,13)	20,0 – 1,53 (1,65 – 1,53)
длина волны (Å)	0,8123	0,8266
полнота покрытия, % (%)	97,7 (93,4)	99,7 (99,8)
избыточность	3,2 (2,9)	6,7 (6,9)
R <sub>merge</sub> (%)	4.3 (27.3)	4.6 (93.4)
R <sub>rim</sub> (%)	6.1 (38.5)	5.0 (100)
R <sub>pim</sub> (%)	4.3 (27.1)	1.9 (38.0)
CC <sub>1/2</sub>	99.9 (91.0)	99.9 (78.4)
<I/σI>	19.4 (4.7)	18.5 (2.0)
расчетный B-фактор (Wilson plot)	26,8	23,5
Статистика улучшения		
диапазон разрешения (Å)	19,3-2,1	20,0-1,53
число рефлексов/использованных для расчета R <sub>free</sub>	24208/1231	60774/3246
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> (%)	17.9/22.0	16.8/19.9
число атомов белка	3226	3267
число атомов лиганда	0	8
число атомов растворителя	241	494
B-фактор (Å), белок	29,3	31,1
B-фактор (Å), лиганд		38,9
B-фактор (Å), растворитель	34,7	42,2
среднеквадратичное отклонение, длина связи (Å)	0,003	0,01
среднеквадратичное отклонение, угол (Å)	0,8	1,2

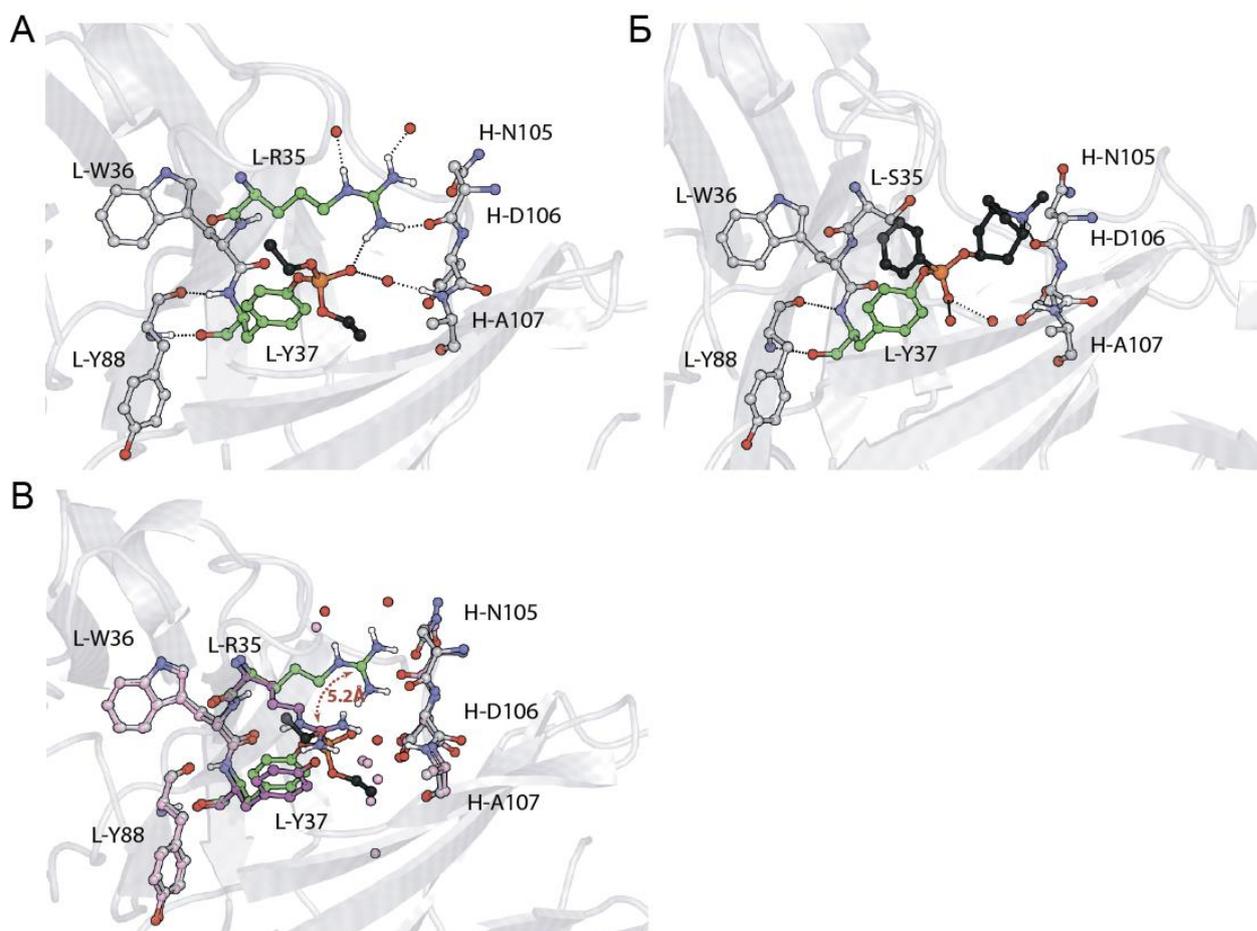


Рис. 46. Рентгеноструктурный анализ ковалентных комплексов антител L-S35R и A17 с параоксоном и арил-фосфонатом, соответственно. (А) Общий вид и водородные связи в активном центре L-S35R (PDB: 5ADO). (Б) Общий вид и водородные связи в активном центре A17 (PDB: 2XZC). (В) Суперпозиция структур активных центров L-S35R (розовый) и L-S35R-Par (зеленый). Каталитический остаток L-Тур37 показан зеленым, аминокислотные остатки – серым, остаток параоксона – черным, водородные связи – пунктирными линиями.

Таким образом, использованный в работе искусственный подход, позволил добиться направленного изменения строения активного центра антитела и приблизить его к структуре активных центров эволюционно совершенных биокатализаторов.

Суммируя результаты, полученные в данной части работы, можно сделать вывод, что разработанный алгоритм направленного улучшения функциональных свойств биокатализаторов, позволил провести поиск и предсказание мутанта L-S35R, обладающего более чем 170-кратным увеличением эффективности взаимодействия. Важно, что такой метод *in silico* созревания антител является универсальным. Он основан только на знании механизма каталитической реакции, который и определяет дальнейший вектор поиска улучшений, таким образом, он может быть применим к биокатализаторам любой природы.

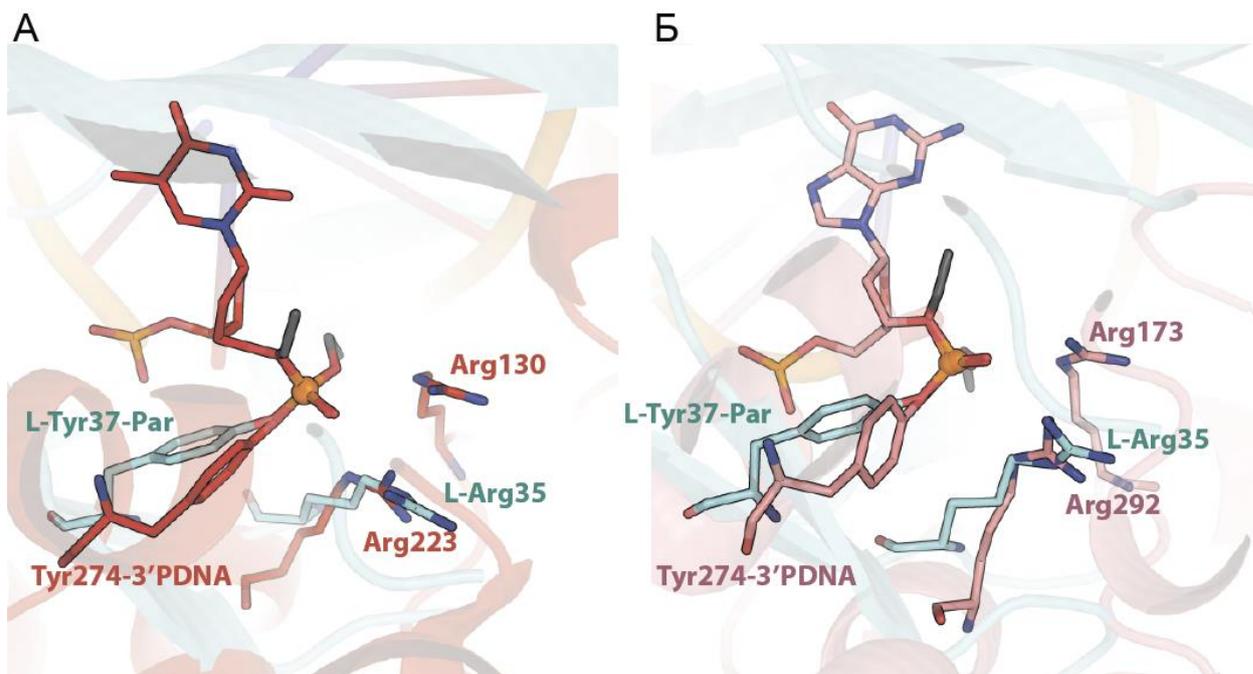


Рис. 47. Сравнение активных центров антитела L-S35R-Par с активными центрами топоизомеразы 1В (А) и Cre-рекомбиназы (Б). Остатки, соответствующие антителу отмечены голубым цветом, остатки, соответствующие ферментам – красным. Атом фосфора остатка параоксона, в случае структуры L-S35R-Par, и остатков фосфатной группы ДНК, в случае структуры ферментов, отмечен оранжевым цветом. Суперпозицию структуры получали, используя функцию «fit pairs» из пакета программ PyMol. Для наложения использовали атомы фосфора, фосфорильного кислорода и кислорода фосфоэфирных групп.

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

Для успешной реализации исследований по созданию и направленному изменению функциональной активности необходимо разрабатывать не только новые методы индукции каталитической активности и адаптации ее под заданный биокаталитический процесс, но и создавать новые технологии поиска биокаталитической активности. В настоящее время существует большое количество методов, направленных на скрининг функции связывания с лигандом (фаговый и клеточный дисплей, SELEX; рибосомальный дисплей и дисплей мРНК). Методов скрининга функциональной активности, в частности каталитической, существенно меньше. Можно выделить методы CatELISA, экспрессия гена биокатализатора в многоруночных планшетах и использование микрочипов. Однако такие методы имеют существенные недостатки, выраженные в невозможности проводить отбор из библиотек генов больших размеров, трудоемкость и длительность процедуры, также представленные методы скорее направлены на скрининг библиотек субстратов/ингибиторов, но не биокатализаторов. Таким образом, разработка высокопроизводительных методов поиска и отбора биокаталитической активности имеет высокий научный и прикладной потенциал.

Для решения проблемы скрининга биокаталитической активности в данной диссертационной работе была предложена новая технология, основанная на использовании микрофлюидных капель двойной эмульсии вода/масло/вода. Схематично она представлена на рисунке 48 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. 48. Общая схема микрофлюидной платформы для ультравысокопроизводительного скрининга биокаталитической активности.

При создании платформы был использован принцип компартиментализации *in vitro* в капли двойной 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 программно управлять условиями генерации капель, что позволяет точно контролировать количество клеток в каждой капле.

Выбор условий заполнения капель клетками и их оценку рассчитывали, используя формулу распределения Пуассона (Рис. 49А).

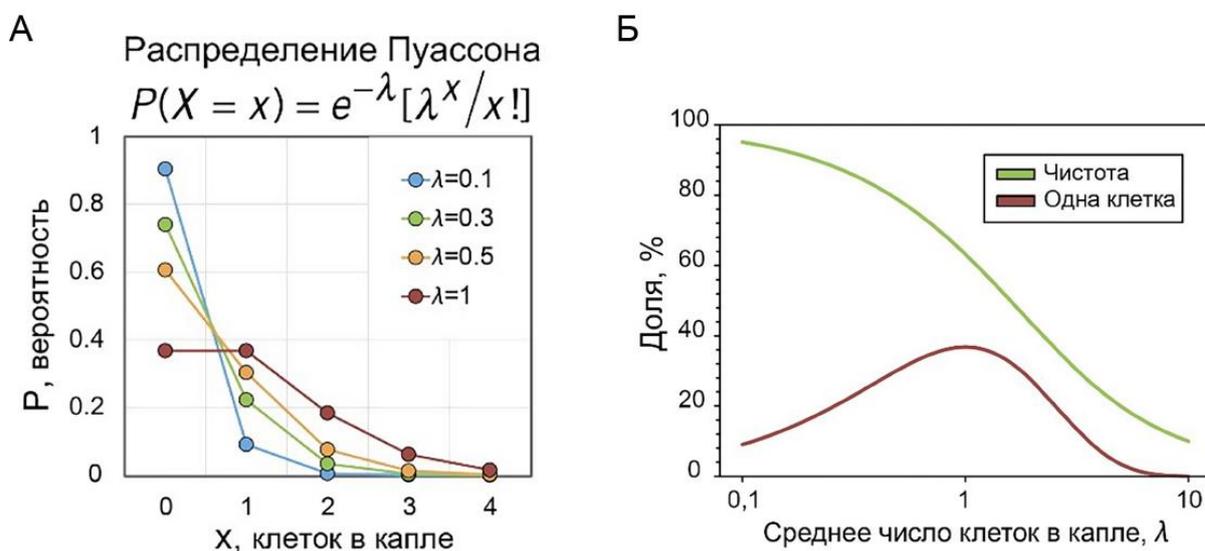


Рис. 49. Оценка заполнения капель микрофлюидной эмульсии клетками. (А) Расчет вероятности распределения заданного количества клеток в каплях при различных значениях степени заполнения  $\lambda$  согласно уравнению Пуассона. (Б) Кривые сравнения чистоты отбора и количества капель, содержащих единичную клетку, при различной степени заполнения  $\lambda$ .

Из формулы (Рис. 49А), очевидно, чем меньше числовое значение степени заполнения -  $\lambda$ , тем ниже вероятность попадания двух или более клеток в одну каплю и как следствие выше чистота отбора (Рис. 49Б). Однако дальнейшее снижение степени заполнения приводит к увеличению доли капель, не содержащих клетки, что требует большего времени для проведения скрининга и, таким образом, снижает эффективность системы отбора в целом. Например, при степени заполнения  $\lambda=0.1$  количество капель, которые несут одну клетку, составляет 95.1% от общего числа заполненных капель, в то же время количество пустых капель составляет не менее 90.5%. Для достижения компромисса между эффективностью и специфичностью отбора была выбрана степень заполнения  $\lambda=0.5$ . Это соответствует максимальной специфичности отбора в 78.7%.

Для генерации эмульсии использовали микрофлюидные чипы из полидиметилсилоксана (Рис. 50) на твердой стеклянной подложке. Использование полидиметилсилоксана (ПДМС) в качестве материала для изготовления чипов предпочтительно, так как имеет ряд преимуществ. В частности, использование ПДМС

позволяет получать чипы с использованием технологии мягкой литографии, то есть с помощью минимальных затрат на расходные материалы (требуется только ПДМС и матрица с текстурой каналов чипа) и максимально доступного оборудования (ламинарный шкаф, термостат, плазменный окислитель). Альтернативные технологии молдинга или 3D прототипирования высокого разрешения требуют значительно более дорогостоящего оборудования, кроме того, материалы, используемые для изготовления чипов по данным технологиям, не пригодны для дальнейшей химической модификации. Чипы на основе ПДМС обладают отличными физическими (эластичность и газопроницаемость) и оптическими (светопроницаемость в широком диапазоне длин волн) свойствами. Использование в качестве подложки чипа предметных стекол упрощает процедуру изготовления чипов, а также улучшает их оптические свойства. Кроме того, в отличие от ПДМС стекло не изменяет своих свойств в органических растворителях, что позволяет использовать широкий спектр углеводов в качестве масляной фазы при создании эмульсии.

Разные размеры чипов позволяют генерировать капли различного диаметра. Для проведения скрининга биокаталитической активности были использованы чипы с толщиной перекрестия 20 мкм, такая топология чипа позволяла получать капли с размером 15-40 мкм в зависимости от соотношения скорости потоков в чипе.

Процесс инкапсуляции клеток в капли двукратной эмульсии «вода-масло-вода» (ВМВ) осуществлялся в два этапа:

1. Смешивание, «прокапывание», потока клеточной суспензии в водном растворе в потоке масляной фазы.
2. Смешивание, «прокапывание», потока водно-масляной эмульсии в потоке внешней водной фазы.

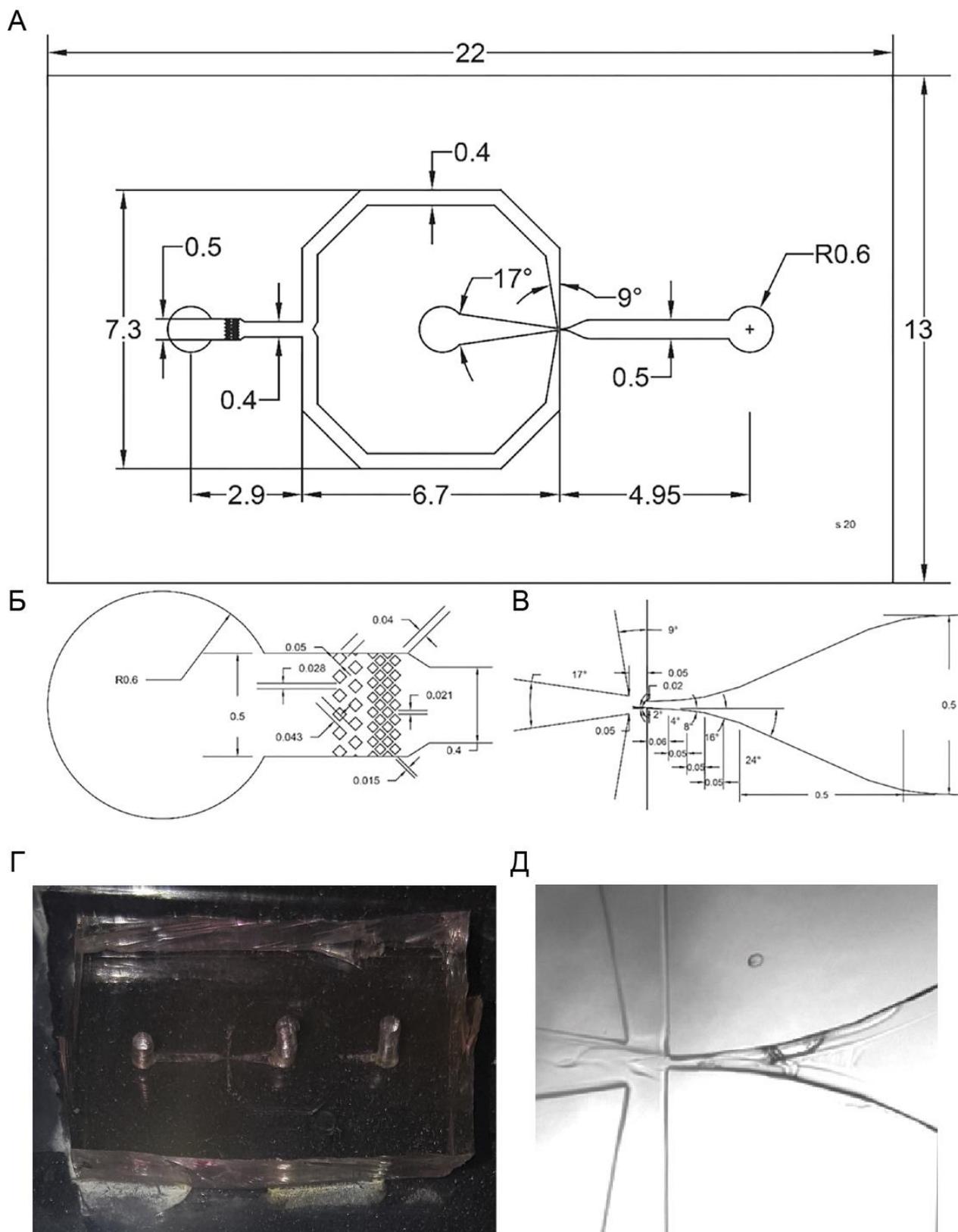


Рис. 50. Чертеж и микрофотографии микрофлюидного чипа для генерации капель 20 мкм, предназначенного для инкапсуляции бактериальных клеток в каплях двукратной эмульсии. (А) Общий вид. (Б) Детализация входного отверстия. (В) Детализация участка перемешивания потоков. (Г) Фотография микрофлюидного чипа, общий вид. (Д) Микрофотография участка перемешивания потоков. Все размеры указаны в миллиметрах. Для проектирования использовалось программное обеспечение AutoCAD (Autodesk, США).

Для того, чтобы чипы могли обеспечить стабильную генерацию эмульсии их поверхности должны иметь более высокую смачиваемость по отношению к выбранной дисперсионной среде. Таким образом, для получения однократной эмульсии вода в масле, поверхность первого чипа должна быть гидрофобной. Поверхность второго чипа, предназначенного для получения двукратной эмульсии вода/масло/вода, должна быть гидрофильной.

Из литературы известно, что высокая газопроницаемость и биосовместимость фторуглеродных масел облегчает проведение культивации клеток в каплях, увеличивая их выживаемость и скорость роста. Кроме того, высокая плотность фторуглеродных масел должна приводить к образованию седиментирующей эмульсии, что предпочтительно для последующего отбора с использованием флуоресцентно активированного клеточного сортирования (FACS). Поэтому в качестве масляной фазы использовали фторуглеродные масла HFE-7500 и FC-40, стабилизированные поверхностно-активным соединением Pico-Surf 2. Для химической модификации поверхности и получения гидрофобных чипов был выбран гидрофобизирующий реагент Aquapel. Мы установили, что использование Aquapel приводит к более эффективной смачиваемости каналов чипа выбранными фторуглеродными маслами.

В качестве «внешней» водной фазы использовали 10 мМ натрий-фосфатный буфер с pH 7.4, стабилизированный Pluronic F-127. Для химической модификации гидрофильных чипов был использован поливиниловый спирт в концентрации 1%.

Использование указанных выше компонентов масляной и «внешней» водных фаз позволило добиться  $85 \pm 15\%$  выживаемости дрожжевых клеток.

## **2.1. СКРИНИНГ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В КАПЛЯХ МИКРОФЛЮИДНОЙ ДВОЙНОЙ ЭМУЛЬСИИ**

### ***Дрожжевой дисплей биокатализаторов и высокочувствительная детекция биокаталитической активности***

Для доказательства применимости разработанной системы скрининга мы использовали дрожжевой дисплей в системе *Pichia pastoris*. Для реализации функций многих биокатализаторов, необходимо наличие правильной организации структуры фермента («фолдинга»). Дрожжевой дисплей представляет универсальный способ скрининга сложных эукариотических белков, так как обеспечивает корректное образование дисульфидных связей, а также реализацию различных типов пост-трансляционных модификаций.

Для демонстрации универсальности разработанной платформы были использованы три фермента с различными типами биокаталитической активности: фосфодиэстеразная (дезоксирибонуклеаза I – ДНКаза), протеазная (энтеропептидаза – ЭК) и эстеразная (бутирилхолинэстераза – БУХЭ) активности.

Были созданы генетические конструкции для экспрессии генов биокатализаторов на поверхности дрожжевой клетки (Рис. 51А). Полученные экспрессионные конструкции содержали:

- последовательность индуцибельного промотора гена алкогольоксидазы *AOX1* дрожжей *P. pastoris* дикого типа,
- нуклеотидную последовательность «самопроцессирующегося» пептида F2A, находящийся в единой рамке считывания с геном флуоресцентного белка mCherry и лидерным пептидом человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), необходимого для внеклеточного транспорта,
- нуклеотидную последовательность гена выбранного биокатализатора и последовательности якорного белка SAG1, обеспечивающего презентацию фермента на поверхности дрожжевой клетки,
- нуклеотидную последовательность эпитопа гемагглютинина (НА) для детекции заякоренного фермента.
- дополнительно генетические конструкции содержали последовательности нативного терминатора и сигнала полиаденилирования *AOX1* гена, а также последовательность гена *Sh ble*, продукт которого обеспечивает устойчивость трансформантов к антибиотику зеоцин.

Экспрессию кассеты генов биокатализатора детектировали флуоресцентным методом. Внутриклеточная экспрессия mCherry свидетельствовала об успешной трансформации клеток выбранными генетическими конструкциями, окраска флуоресцентными антителами, специфичными к НА-эпиту доказала наличие целевых ферментов на поверхности дрожжевой клетки (Рис. 51Б). Использование иммунофлуоресцентного окрашивания позволило оценить количество молекул биокатализатора, представленного на поверхности единичной клетки. Было показано, что количество каждого фермента на поверхности клетки составляет  $7000 \pm 3000$  молекул и не зависит от типа выбранного биокатализатора.

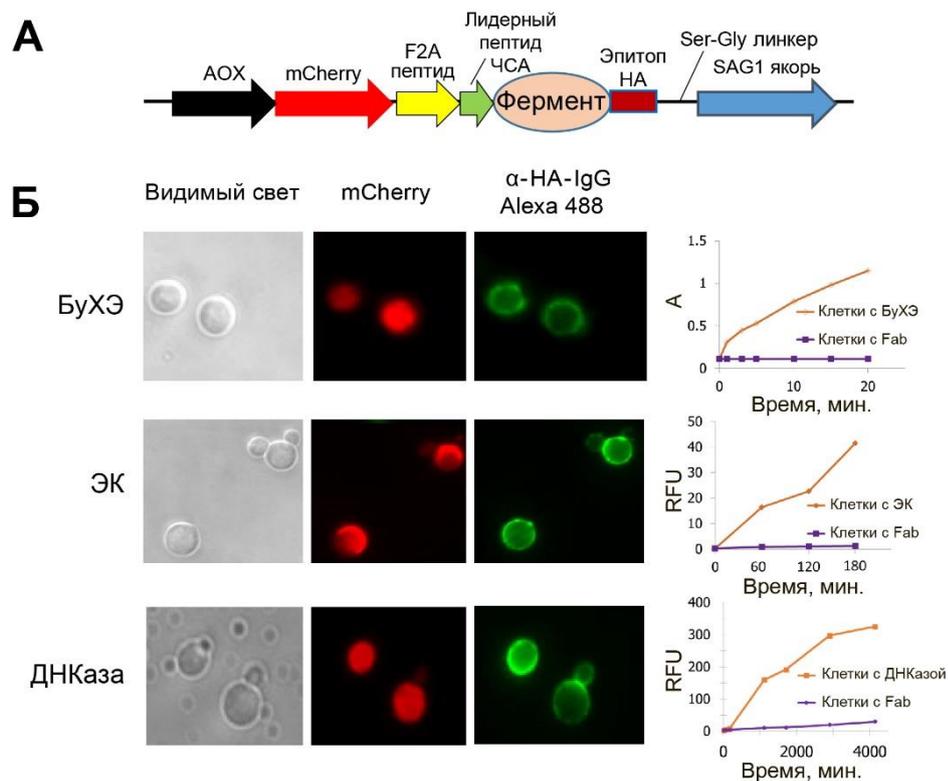


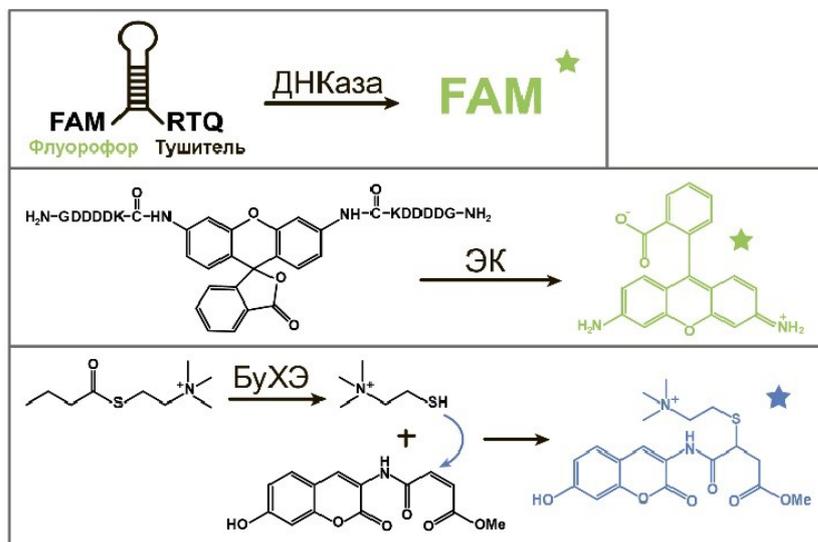
Рис. 51. Дрожжевой дисплей биокатализаторов. (А) Схема основных элементов генетической конструкции для экспрессии генов биокатализаторов на поверхности клетки. (Б) Анализ экспрессии генов функционально активных биокатализаторов на поверхности дрожжевой клетки, проведенный с использованием флуоресцентной микроскопии (слева) и кинетического анализа (справа).

Дрожжевые клетки, продуцировавшие заякоренные биокатализаторы, были проанализированы на наличие функциональной активности с использованием флуоресцентных субстратов. Для детекции ДНК-гидролизующей активности был выбран FRET-субстрат FAM-AAAAAAACCCCCCATATAGCGCGTTTTTTT-RTQ1. Анализ протеолитической активности проводили с использованием субстрата Gly-(Asp)<sup>4</sup>-Lys-нафтиламида. Бутирилхолинэстеразную активность анализировали с использованием сопряженной реакции и флуоресцентного аналога реактива Элмана. Выбранные субстраты и принципы генерации флуоресцентного сигнала представлены на рисунке 52А. В качестве контроля во всех случаях использовали клетки дрожжей, продуцировавшие Fab-фрагмент антитела А17 (Рис. 52Б). Результаты эксперимента показали, что разработанная система дрожжевого дисплея позволяет получать функционально-активные биокатализаторы на поверхности клеток дрожжей.

Были проанализированы кинетические параметры реакции суспензии клеток, содержащих заякоренный фермент (Рис. 51Б). Было установлено, что соотношение скоростей ферментативного и самопроизвольного гидролиза составляет 550, 120 и 85 для

ДНКазы, ЭК и БуХЭ, соответственно. Через 24 часа инкубации соотношение снижалось до значений 33, 9.3 и 6.5, соответственно. Таким образом, все предложенные варианты дрожжевых клеток с заякоренными ферментами могут быть использованы для анализа биокаталитической активности в каплях двукратной эмульсии.

А



Б

Фермент	Чистый фермент		Фермент, заякоренный на дрожжах			
	$k_{кат.}, c^{-1}$	$K_M, \mu M$	$k_{кат.} \text{ набл.}, c^{-1}$	$K_M \text{ набл.}, \mu M$	$k_{кат.}/k_{некат.}$	Сигнал/фон через 24 ч
ДНКаза	8±2	11±3	6	13	550	33
ЭК	80±20	4±1	1.2	6	120	9.3
БуХЭ	780±60	13±4	120	16	85	6.5

Рис. 55. Ферментативные реакции, использованные для тестирования микрофлюидной технологии скрининга биокаталитической активности. (А) Специфические субстраты и принципы генерации флуоресцентного сигнала. (Б) Кинетический анализ ферментов, заякоренных на поверхности дрожжевой клетки с использованием соответствующих специфических флуоресцентных субстратов.

### Эффективность отбора биокатализаторов из смеси активных и неактивных клеток

Для того, чтобы показать принципиальную возможность отбора биокатализаторов заякоренных на поверхности дрожжевых клеток с помощью микрофлюидной технологии был поставлен следующий эксперимент (Рис. 53). Смесь в соотношении 1:10 «активных» дрожжевых клеток, продуцирующих заякоренный фермент ДНКазаI и внутриклеточный красный флуоресцентный белок-репортер mCherry, и «неактивных» клеток, продуцирующих Fab-фрагмент антитела A17, инкапсулировали совместно с субстратом в капли двойной эмульсии. После протекания реакции, полученные капли анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии (Рис. 57А) и отбирали с помощью FACS (Рис. 57Б).

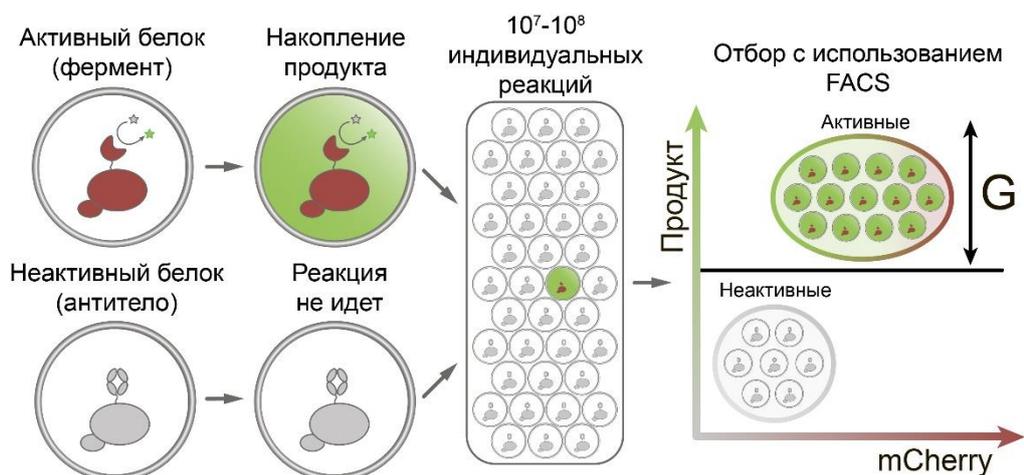


Рис. 53. Общая схема отбора дрожжевых клеток с заякоренными биокатализаторами с применением микрофлюидной технологии скрининга биокаталитической активности.

Анализ результатов эксперимента показал, что микрофлюидная эмульсия обладала высокой степенью монодисперсности, а также то, что только капли, содержащие «активные» клетки (и соответственно белок-репортер), накапливали флуоресцентный продукт ферментативной реакции (Рис. 54).

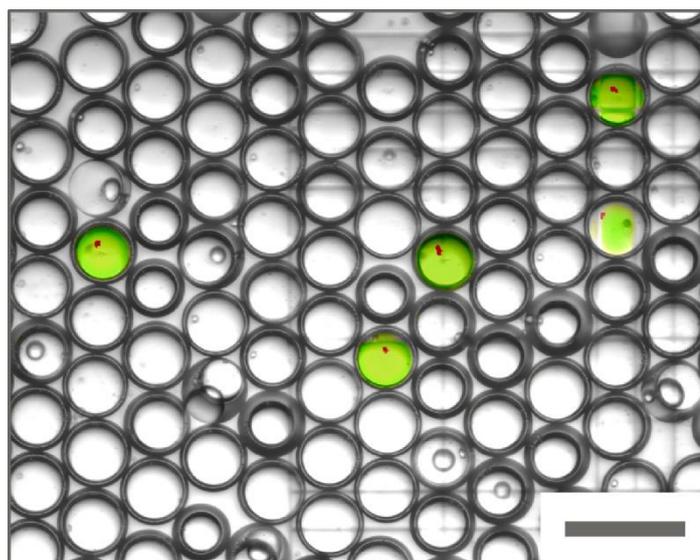


Рис. 54. Микроскопия микрофлюидной эмульсии смеси «активных» и «неактивных» клеток в соотношении 1:10. Представлено наложение изображений, полученного в видимом свете, зеленой флуоресценции продукта ферментативной реакции, а также красной флуоресценции белка-репортера. Приведенная шкала размера составляет 100 мкм.

Популяцию активных клеток, отобранную с использованием FACS (популяция «после»), переносили на чашки с питательной средой, где происходила регенерация дрожжевых клеток из капель. Аналогичную процедуру проводили и для популяции капель до проведения отбора (популяция «до»). Колонии, соответствующие популяциям «до» и

«после», переносили на чашки, содержащие метанол для проведения индукции экспрессии гена флуоресцентного репортера. Через 2-3 дня проводили анализ с использованием прибора для флуоресцентной документации BioRad MP-4000. Результаты, представленные на рисунке 55 свидетельствуют, что регенерация клеток проходит успешно, и происходит эффективное обогащение клеток с ферментом на поверхности.

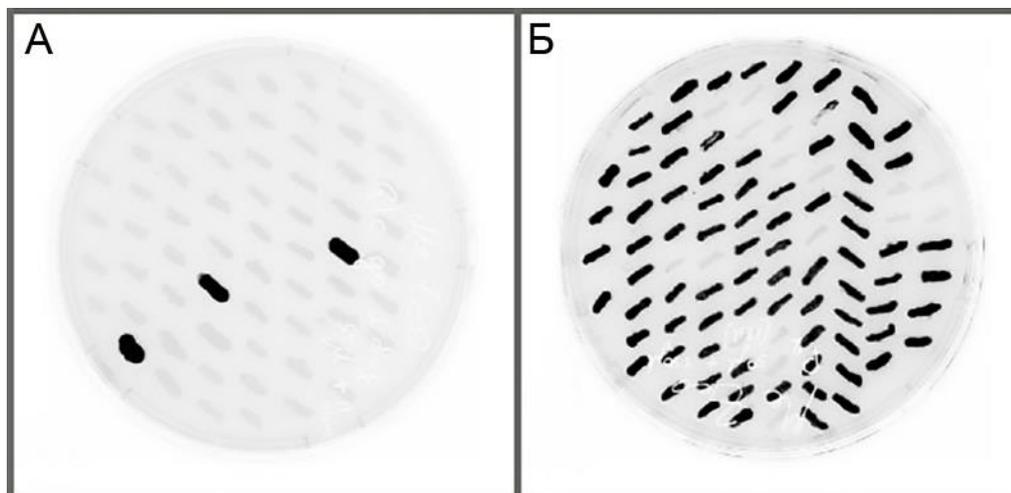


Рис. 55. Анализ регенерированных колоний популяций клеток до (А) и после отбора (Б) с применением микрофлюидной технологии скрининга биокаталитической активности.

Для того чтобы оценить эффективность скрининга биокаталитической активности от соотношения «активных» и «неактивных» клеток, была проведена серия отборов клеток с заякоренным ферментом ДНКазаI из смеси с различным соотношением неактивных клеток в диапазоне от 1:10 до 1:100000 (Рис. 56).

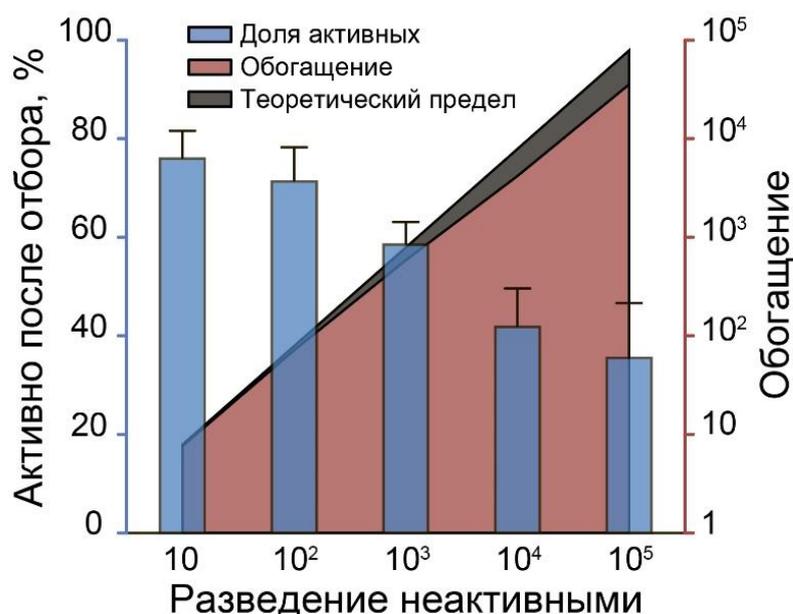


Рис. 56. Анализ эффективности отбора биокаталитической активности от соотношения «активных» и «неактивных» клеток.

Для каждого соотношения был проведен один раунд отбора. Как видно из рисунка 56 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  $\lambda$ . Как было указано выше для степени заполнения  $\lambda=0.5$  максимальной 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.

### ***Селективность отбора биокатализаторов из смеси биокатализаторов с разной специфичностью или различным уровнем активности***

Одной из важнейших преимуществ разрабатываемой технологии скрининга является ее высокая специфичность по отношению к выбранному типу биокаталитической активности. Для демонстрации этого был проведен эксперимент по отбору заданного биокатализатора из смеси ферментов с различными типами биокаталитической активности. Было создана “искусственная библиотека активностей”, представляющая собой смесь «активных» дрожжевых клеток, каждая из которых несет один из трех биокатализаторов (ДНКаза, ЭК, БуХЭ), и «неактивных» клеток в соотношении 1:1:1:100. “Библиотеку активностей” инкапсулировали с одним из флуорогенных субстратов, специфичных для соответствующего типа активности (Рис. 52А), после чего проводили отбор.

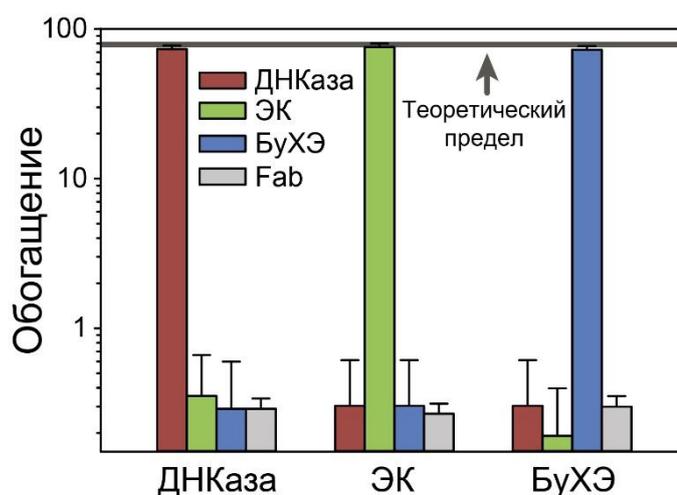


Рис. 57. Анализ специфичности отбора заданного биокатализатора из смеси ферментов с различными типами биокаталитической активности.

Как видно из рисунка 57 за один раунд селекции каждый из типов ферментов был специфично отобран на соответствующую биокаталитическую активность с эффективностью, близкой к теоретическому пределу, при этом «активные» клетки с другим типом активности и «неактивные» клетки не обогащались.

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 оценить 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. (Рис. 58А). Размер библиотеки составил  $3 \times 10^5$  вариантов. Полученная библиотека была клонирована в вектор для клеточного дисплея pPic9k- $\alpha$ -Lib\_VChE-FLAG-anchor. Данный вектор сконструирован на основе вектора pPic9k и содержит последовательность индуцибельного промотора гена алкогольоксидазы *AOX1* дрожжей *P. pastoris* дикого типа, нуклеотидную последовательность лидерного пептида альфа-фактора дрожжей *S. cerevisiae*, необходимого для внеклеточного транспорта, последовательность полилинкера, содержащего сайт рестрикции *SfiI* для клонирования генов библиотеки, нуклеотидную последовательность эпитопа 3xFLAG для детекции заякоренного фермента, последовательность якорного белка SAG1, обеспечивающего презентацию фермента на поверхности дрожжевой клетки. Дополнительно генетическая конструкция содержала последовательность гена *kan*, продукт которого обеспечивает устойчивость трансформантов к антибиотику генетицин (G418) и последовательность гена *HIS4*, кодирующего гистидинол дегидрогеназу и позволяющего проводить отбор клонов после трансформации в His<sup>-</sup> штамм на минимальной среде по способности расти без добавления гистидина. Клеточная библиотека была инкапсулирована в капли двукратной эмульсии совместно с соответствующим флуорогенным субстратом. Полученная библиотека обладала существенно более низким средним уровнем специфической активности (Рис. 58Б, 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. 61Б).

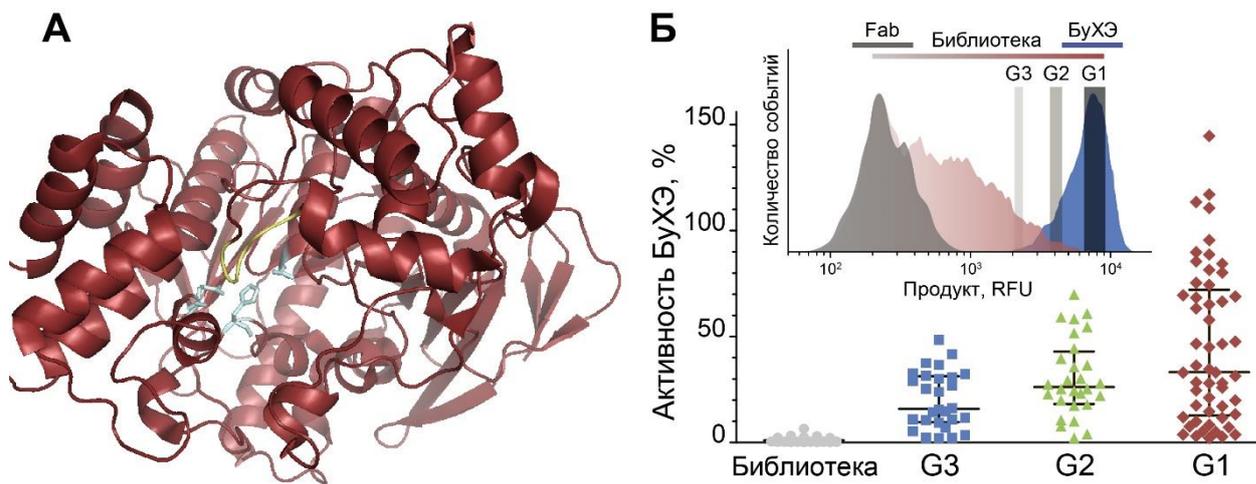


Рис. 58. Анализ селективности и эффективности отбора при различных уровнях активности биокатализаторов, заякоренных на поверхности дрожжевой клетки. (А) Структура БуХЭ (PDB 1P0I). Серым цветом отмечена каталитическая триада S198-H438-E325, желтым цветом отмечена последовательность ацил-связывающей петли 284-TPLSV-288. (Б) 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.

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 cl.3, cl.8 и cl.13 из популяций G1, G2 и G3, и активностями 1.1%, 5.4% и 55% от активности БуХЭ дикого 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, соответствовавших различным уровням накопления продукта: cl.3 – «много», cl.8 – «средне», cl.13 – «мало», на основании этого были выбраны соответствующие гейты (Рис. 59А).

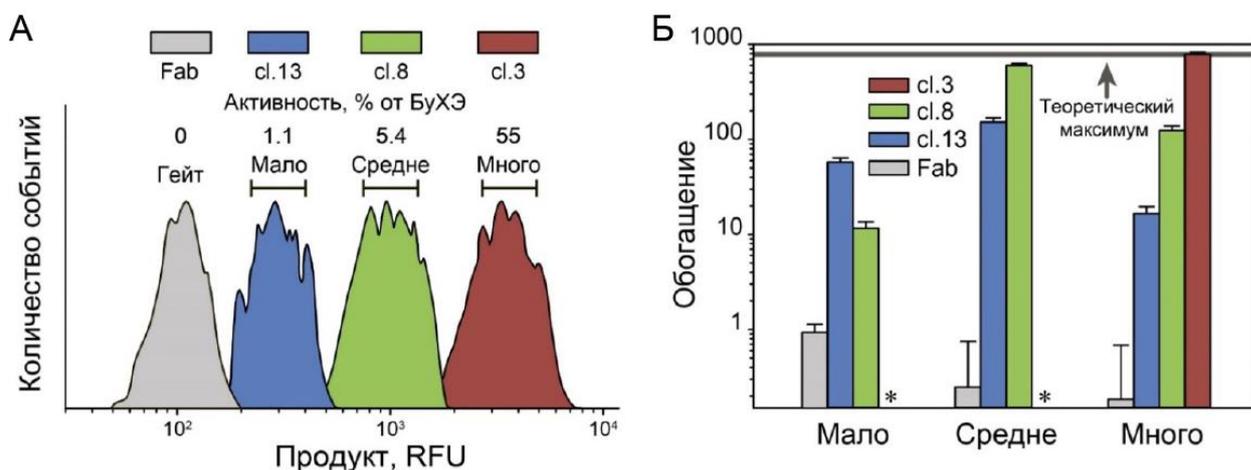


Рис. 59. Мутанты БуХЭ с различным уровнем активности приводят к образованию капель с различным уровнем флуоресценции.

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. 59Б).

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.

## 2.2. ОТБОР МУТАНТОВ БУХЭ, УСТОЙЧИВЫХ К ДЕЙСТВИЮ ФОТ

Работоспособность разработанной технологии для поиска новой биокаталитической активности была доказана на примере скрининга библиотеки мутантов БуХЭ, 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>) (Рис. 60).

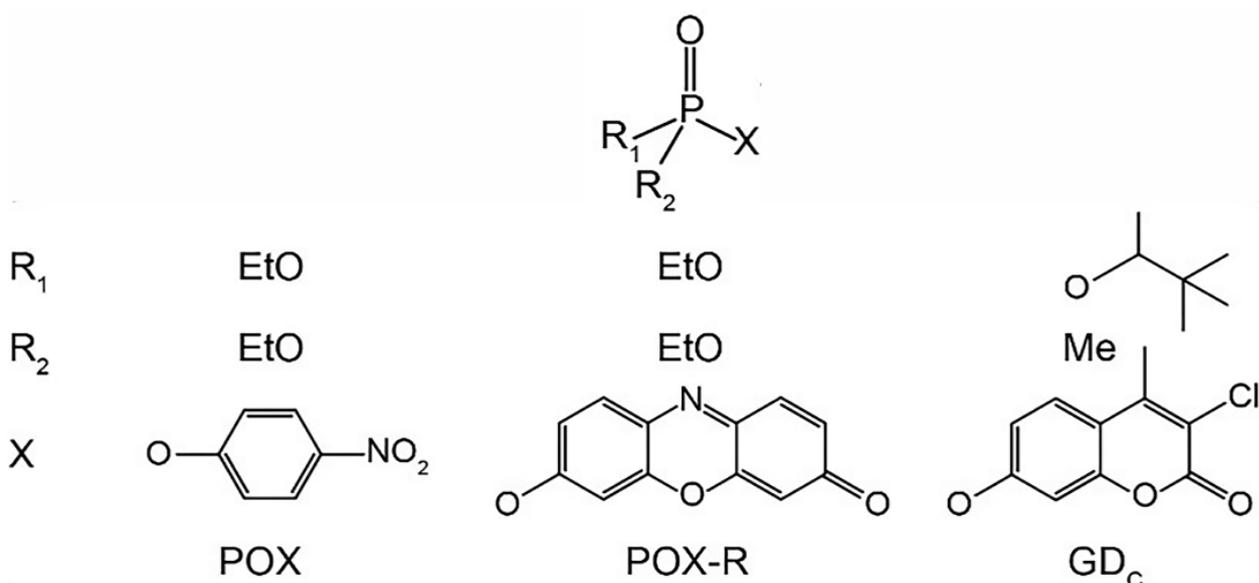


Рис. 60. Химические структуры использованных ФОТ.

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 шесть клонов устойчивых к GD<sub>C</sub>. Для всех отобранных клонов были установлены последовательности генов в петле 284-TPLSV-288 (Таблица 12). Интересно отметить, что среди клонов, отобранных на способность ингибировать GD<sub>C</sub>, один имел идентичную последовательность с клоном cl.14, устойчивого к POX, а пять вариантов имели одинаковую последовательность и были отмечены как клон cl.19. Мутанты cl.14, cl.15 и cl.19 были переклонированы в вектор pFUSE-6xHis для экспрессии в клетках млекопитающих, наработаны в аналитических количествах, очищены и использованы для проведения кинетических исследований.

Таблица 12. Анализ последовательности замен в ацил-связывающей петле 284-TPLSV-288 клонов, отобранных по устойчивости к ингибированию ФОТ.

БуХЭ	Последовательность петли 284-288	Активность, относительно WT, %
WT	TPLSV	100
cl.14	HTIHG	51
cl.15	PSHSG	44
cl.19	NHISG	21

Известно, что взаимодействие БуХЭ с ФОТ приводит к быстрой и необратимой инактивации фермента за счет фосфонилирования остатка S198 в активном центре. Это выражается в высоких значениях бимолекулярной константы скорости реакции ( $k_1/K_i$ ) и равной нулю константе реактивации ( $k_2 \approx 0$ ) (Рис. 61).

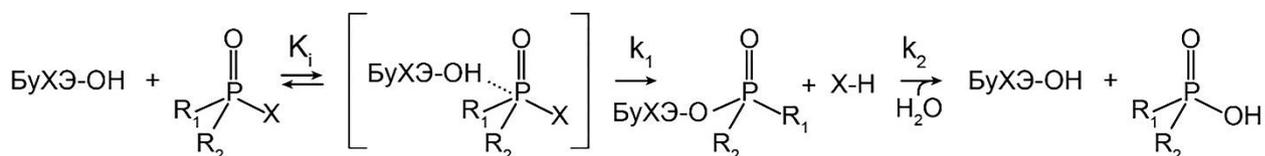


Рис. 61. Схема взаимодействия БуХЭ и ФОТ, а также структурные формулы использованных ФОТ.  $K_i$  – константа ингибирования,  $k_1$  – константа скорости фосфонилирования,  $k_2$  – константа скорости реактивации.

Кинетический анализ отобранных клонов с1.14 и с1.15 показал наличие остаточной активности в случае длительного ингибирования РОХ (Рис. 62А). Использование флуоресцентного аналога параоксона РОХ-Р (Рис. 60) 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 с1.14 и с1.15, соответственно, причем эффективность образования ковалентного комплекса для клона с1.14 была сравнима с ферментом дикого типа (WT) (Таблица 13). На рисунке Рис. 62Б приведены кинетические кривые для с1.14 и WT. Как видно из рисунка, вслед за быстрой стадией ковалентной модификации обоих ферментов, приводящей к выделению стехиометрического количества флуоресцентного продукта – резорурфина, фермент БуХЭ ожидаемо остается полностью модифицированным ( $k_2 \approx 0$ ), в то время как клон с1.14 продолжает реагировать с новыми молекулами субстрата, что в конечном итоге приводит к полному его гидролизу ( $k_2 > 0$ ).

Клон с1.19 устойчивый к  $\text{GD}_C$ , 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) [234]. В то же время наблюдаемая повышенная устойчивость склона с1.19 к  $\text{GD}_C$  может быть объяснена более чем 60-ти кратным снижением эффективности образования ковалентного комплекса с остатком  $\text{GD}_C$ .

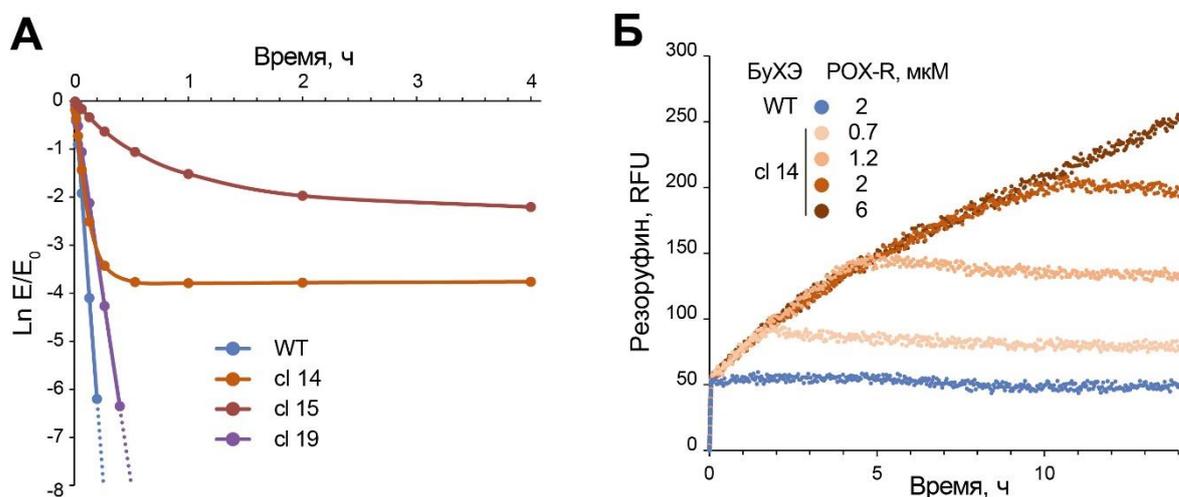


Рис. 62. Анализ клонов, отобранных из клеточной библиотеки БуХЭ, устойчивых к ингибированию ФОТ. (А) Кинетические кривые ингибирования фермента дикого типа WT и клонов cl.14 и cl.15, устойчивых к ингибированию POX, клона cl.19, устойчивого к ингибированию GD<sub>C</sub>. (Б) Кинетика гидролиза флуоресцентного аналога параоксона - POX-R в реакции с клоном cl.14 и WT. Концентрация ферментов составляла 0.45 мкМ.

Таблица 13. 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>				
	БуХЭ	WT	Отобранные		Контроль	БуХЭ	Отобранные		Контроль
			cl 14	cl 15	cl 19		cl 14	cl 19	cl 15
$k_1/K_i \times 10^{-1}, M^{-1}c^{-1}$		290±30	260±40	25±4	140±20	3±1	0.5±0.1	0.05±0.01	2.0±0.5
$k_2 \times 10^4, c^{-1}$		-	1.0±0.1	1.1±0.1	-	-	-	-	-

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.

Известно, что в природная БуХЭ имеет период полувыведения из организма равный 46 часам (для человека) и 28 часам для мыши. Для дегликозилированного препарата и рекомбинантной мономерной БуХЭ время полувыведения составляет несколько минут [66].

Эти данные явились обоснованием необходимости улучшения фармакокинетических свойств рекомбинантного фермента БуХЭ и создания на его основе препарата пролонгированного действия.

Для решения этой задачи использовали две стратегии усиления терапевтического эффекта (Рис. 63):

- За счет химической модификации рекомбинантного фермента полисиаловой кислотой (ПСА);
- За счет модификации экспрессионной системы фермента и создания БуХЭ исключительно в тетрамерной форме (4рчБуХЭ).

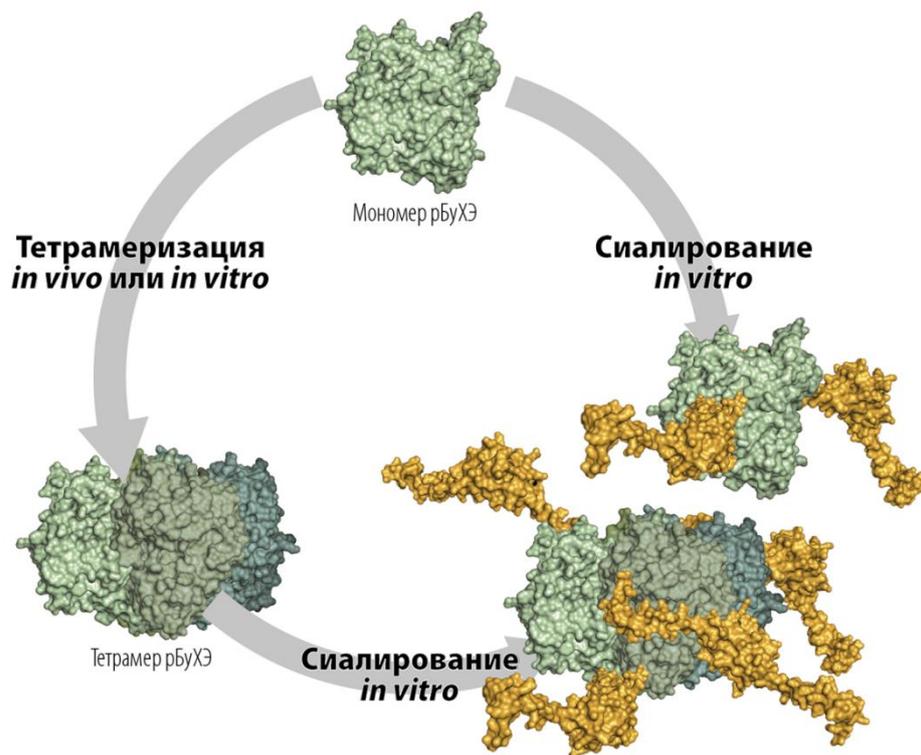


Рис. 63. Стратегии создания препарата пролонгированного действия на основе БуХЭ человека.

**Создание эукариотической системы экспрессии человеческой бутирилхолинэстеразы.**

Для проведения химического полисиалирования рекомбинантной БуХЭ были созданы генетические конструкции для экспрессии гена фермента в клетках линии СНО-К1.

Для получения экспрессионной конструкции рBudCE/EF/VChE поколения G0, несущей ген БуХЭ человека, был выбран вектор рBudCE/EF/Zeo, созданный на основе вектора рBudCE4.1(+) (Invitrogen, США). Полученная экспрессионная конструкция содержала:

- последовательность сильного эукариотического промотора фактора элонгации полипептидной цепи  $\alpha 1$  (EF-промотор),
- нуклеотидную последовательность гена БуХЭ,
- последовательность нативного терминатора и сигнал полиаденилирования гена гормона роста быка (BGH polyA),
- последовательность гена *Sh ble*, продукт которого обеспечивает устойчивость трансформантов к антибиотику зеоцин.

Трансфекция такой конструкцией клеток линии CHO-K1 приводила к получению препарата БуХЭ преимущественно в форме мономера. Для увеличения доли димерных и тетрамерных форм БуХЭ была создана дополнительная генетическая конструкция pcDNA/EF/PRAD, содержащая пептид PRAD, необходимый для тетрамеризации БуХЭ и ген устойчивости к гигромицину. В результате котрансфекции обеими генетическими конструкциями (поколение G1) был получен клон А3, который позволял получать до 30 мг/л активного фермента в олигомерной форме (Рис. 64).

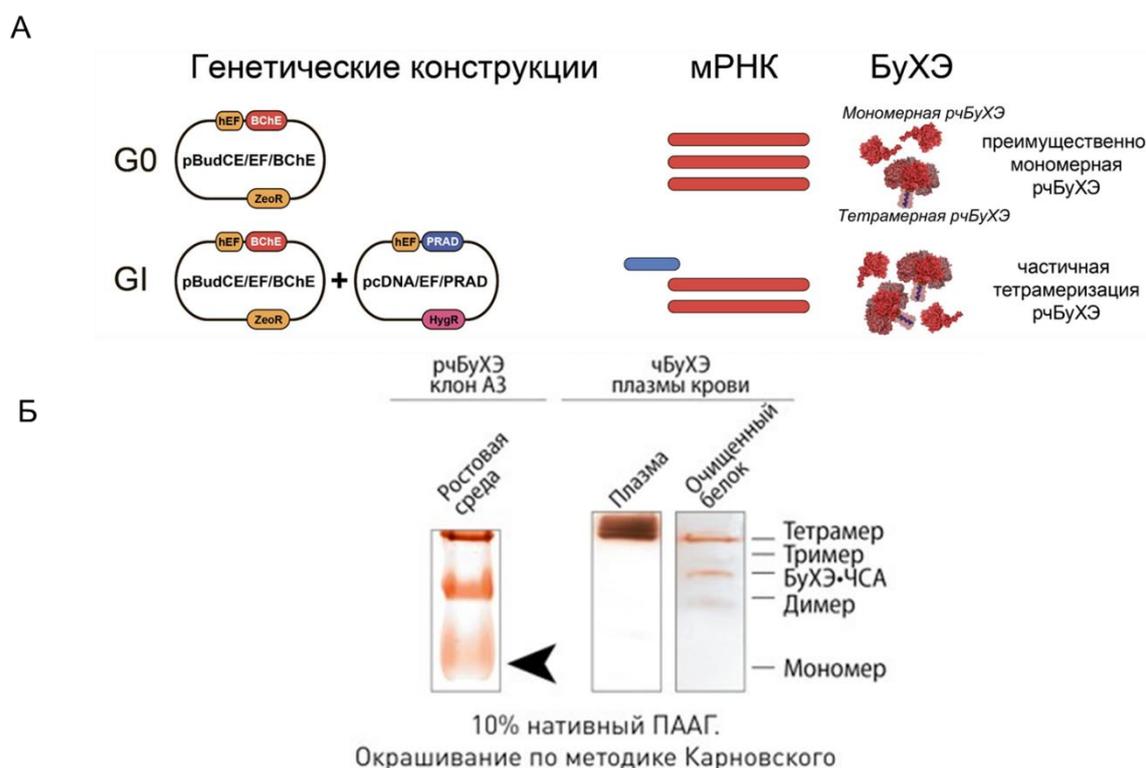


Рис. 64. Экспрессия гена БуХЭ в клетках CHO-K1. (А) Схема генетических конструкций для экспрессии гена БуХЭ поколений G0 и G1. (Б) Анализ олигомерного состава рсБуХЭ методом Карновского. Разделение рсБуХЭ осуществляли в 10% ПААГ в неденатурирующих условиях.

Анализ олигомерного состава рекомбинантной БуХЭ человека (рсБуХЭ), продуцируемой клоном А3, показал, что фермент в основном представлен в форме мономера и димера, в то время как продукция тетрамера не существенна. (Рис. 64Б)

Для изучения функциональной активности рсБуХЭ была очищена из ростовой среды. Разработанный протокол очистки включал стадии ультрафильтрации, концентрирования, аффинной очистки на прокаинамид-сефарозе и гель-фильтрацию на заключительном этапе. Анализ эффективности выделения и очистки препарата функционально активной БуХЭ проводили с использованием метода Элмана, для оценки общего количества белкового препарата БуХЭ использовали метод ИФА (Таблица 14). В

результате удалось получить препарат рчБуХЭ с выходом около 70% и чистотой не менее 95% (Рис. 65).

Таблица 14. Таблица очистки рекомбинантной БуХЭ из ростовой среды.

Стадия выделения и очистки	Общая активность БуХЭ, ед. акт.*	Выход, %	Общее количество БуХЭ, мг**	Удельная активность, ед. акт./мг
1. Ростовой среда	915	100	2.03	451
2. Концентрат ростовой среды	890	97	1.96	454
3. Аффинная хроматография	825	90	1.81	456
4. Гель-фильтрация	650	71.5	1.41	461

Примечания: \* – по данным методики Эллман; \*\* – по данным методики ИФА

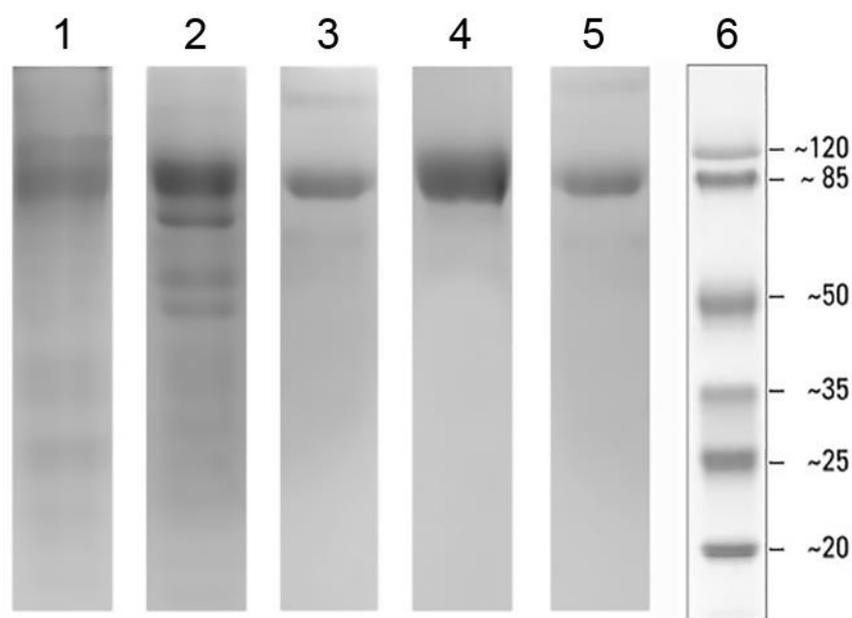


Рис. 65. Электрофоретический анализ выделения и очистки препарата рчБуХЭ в 10% ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях. (1) Экспрессионная ростовая среда; (2) концентрат ростовой среды; (3) элюат со стадии аффинной хроматографии; (4) элюат со стадии гель-фильтрации; (5) бутирилхолинэстераза из плазмы крови человека; (6) маркер молекулярных масс белков.

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 (Таблица 15).

Таблица 15. Анализ кинетических параметров гидролиза бутирилтиохолин йодида препаратами рчБуХЭ и пчБуХЭ.

Биокатализатор	$k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup>	$K_M$ , мкМ	$k_{SS}$ , мМ	$b$
рчБуХЭ	49200±800	25±1	250±30	2.4±0,2
пчБуХЭ [174]	39900±1800	23±2	140±20	2.5±0.1

Было установлено, что как и в случае пчБуХЭ, для рчБуХЭ характерна активация субстратом при реакции с субстратами холинового ряда, что выражается в появлении константы скорости  $k_{SS}$ . Были рассчитаны константы  $k_{SS}$  и  $b$  ( $b = k_{SS}/k_{cat}$ ), значения которых также были близки. Это доказывает, что полученный препарат рчБуХЭ функционально активен, и организация активного центра биокатализатора одинакова с природным ферментом. Идентичность рчБуХЭ была подтверждена масс-спектрометрией триптического гидролизата фермента. Перекрытие реконструированной аминокислотной последовательности рчБуХЭ с теоретической составило 58%.

Согласно литературным данным, рекомбинантная БуХЭ, продуцируемая в клетках линии СНО, обладает недостаточным уровнем сиалирования, что отражается в низких фармакокинетических параметрах. Были определены фармакокинетические параметры выведения препарата рчБуХЭ из кровотока мыши после однократной инъекции в хвостовую вену. Полученные экспериментальные результаты описывались уравнением для двухкамерной фармакокинетической модели. Рассчитанные значения периода полувыведения, периода полураспределения и среднее время удерживания препарата рчБуХЭ в крови (MRT) представлены в таблице 16.

Таблица 16. Фармакокинетические параметры ферментов на основе БуХЭ.

Биокатализатор	$t^{1/2}$ вывед., мин	$t^{1/2}$ распр., мин	MRT, мин
рчБуХЭ (текущее исследование)	180±30	4±1	220±50
рчБуХЭ [172]	140±50	-	210±60
пчБуХЭ [172]	1680	-	2790

Как видно из Таблицы 16 препарат рчБуХЭ быстро выводится из кровотока, что делает нецелесообразным использование его в качестве профилактического антидота против отравлений ФОТ.

### 3.1. ОПТИМИЗАЦИЯ ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ рЧБУХЭ ХИМИЧЕСКИМ ПОЛИСИАЛИРОВАНИЕМ IN VITRO

#### Комбинаторный поиск оптимальных условий химического полисиалирования.

Для решения проблемы быстрого выведения из кровотока был применен комбинаторный метод подбора условий химического полисиалирования. Общая схема реакции представлена на рис. 66. Была использована окисленная полисиаловая кислота со средней молекулярной массой 27 кДа (ПСА27), которая реагировала с аминокруппами фермента через образование основания Шиффа, и последующим восстановлением цианборгидридом натрия.

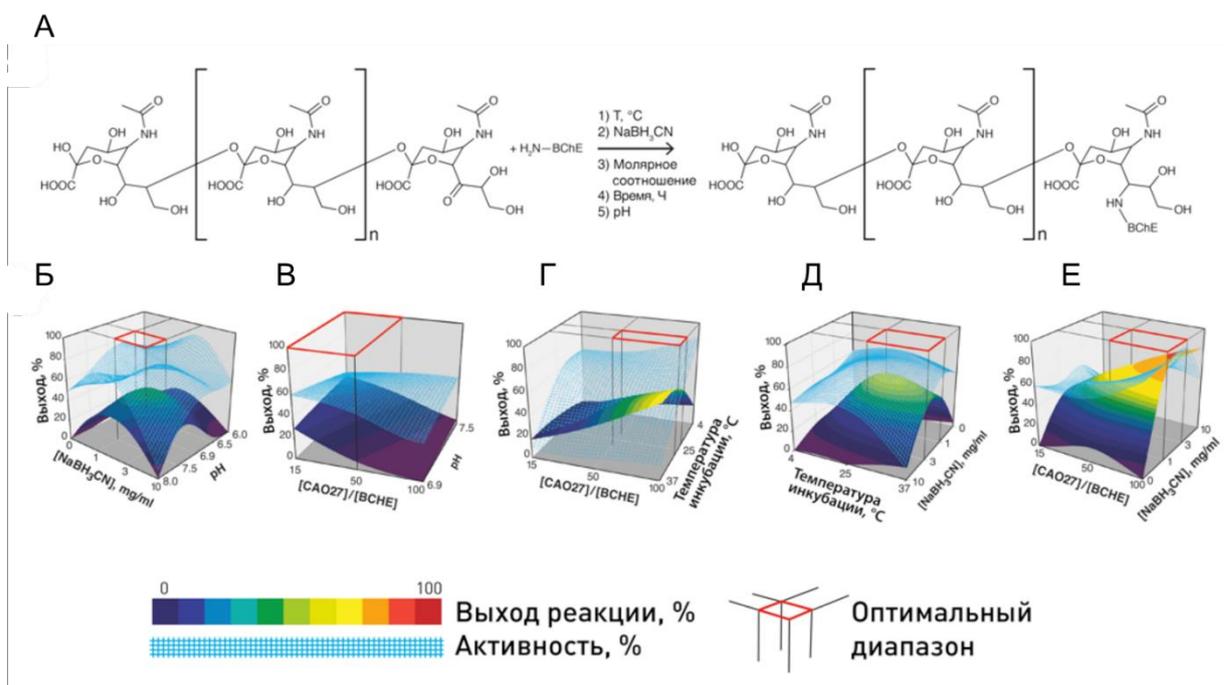


Рис. 66. Схема реакции химического полисиалирования рЧБУХЭ (А) и поэтапный подбор оптимальных условий реакции химического полисиалирования. Остаточная активность и выход реакции изображены сетчатой и цветной плоскостями соответственно (Б-Е)

Для определения оптимальных условий реакции последовательно варьировались основные параметры реакции:

- рН в диапазоне от 6.0 до 8.0 единиц,
- концентрация восстановителя  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  в диапазоне от 0 до 10 мг/мл.
- молекулярное соотношение рЧБУХЭ:ПСА в диапазоне от 1:15 до 1:100,
- температура реакции в диапазоне от 4 до 37°C,
- время реакции

На основании результатов проведенных исследований (Рис. 68, 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.

Было установлено, что в выбранных условиях образуется конъюгат, содержащий в среднем шесть молекул ПСА на одну молекулу рекомбинантного фермента. Масс-спектрометрическое исследование позволило определить все шесть фрагментов рчБуХЭ, подвергнувшихся модификации: 45-51, 453-499, 454-476, 514-544, 545-568 и 550-576 (Рис. 67).

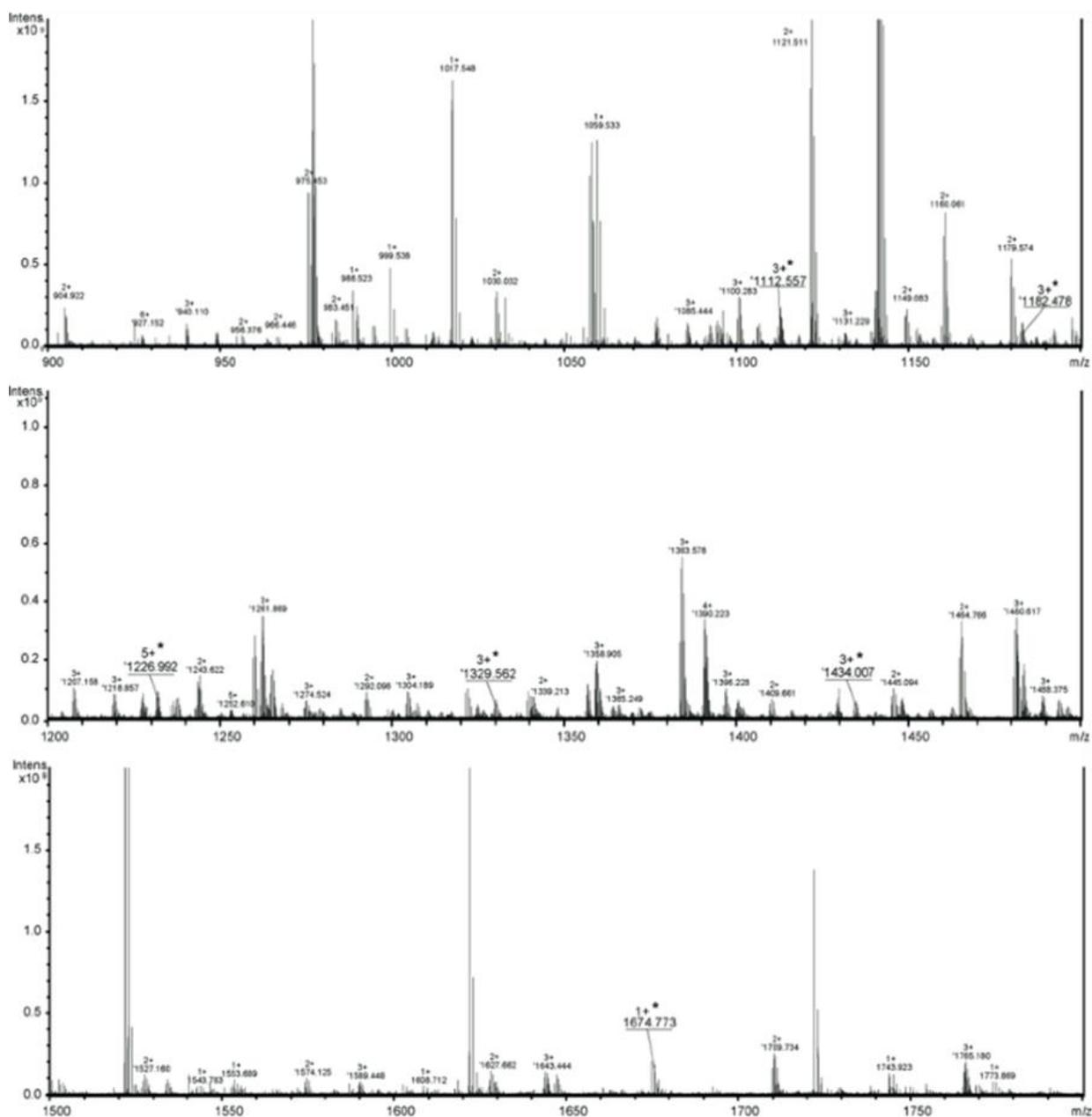
#### **Функциональный анализ полисиалированных препаратов.**

Для оценки влияния химической модификации на функциональную активность фермента рчБуХЭ были определены кинетические параметры реакции гидролиза бутирилтиохолин йодида препаратами рчБуХЭ-ПСА27, рчБуХЭ, и пчБуХЭ (Таблица 17).

Таблица 17. Анализ кинетических параметров реакции гидролиза бутирилтиохолин йодида препаратами рчБуХЭ, рчБуХЭ-ПСА27 и пчБуХЭ.

Биокатализатор	$k_{cat}$ , мин <sup>-1</sup>	$K_M$ , мкМ	$K_{SS}$ , мМ	$b$
рчБуХЭ	49200±800	25±1	250±30	2,4±0,2
рчБуХЭ-ПСА27	49800±800	28±2	230±20	2,2±0,2
пчБуХЭ [174]	39900±1800	23±2	140±20	2,5±0.1

Как видно из результатов кинетического исследования химическое полисиалирование не оказывает существенного влияния на ферментативную активность препарата рчБуХЭ-ПСА27. Принимая во внимание результаты масс-спектрометрического анализа паттерна модификации (Рис. 67), можно утверждать, что химическому полисиалированию подвергались аминокислотные группы, удаленные от активного центра фермента и, по всей видимости, влияние на его структурную организацию отсутствует.



m/z	z	Mol. Mass	$\Delta$ mass, ppm	Peptide	Position	Modification
1674.773	1+	1674.773	-2.5	KPQSLTK	45-51	3xCA
1226.992	5+	6130.929	3.0	RDNYTKAEIILSRISIVKRWANFAKYGNPNETQNNSTSWPVFKSTEQK	453-499	2xCA; Oxidation
1112.557	3+	3335.655	3.0	DNYTKAEIILSRISIVKRWANFAK	454-476	2xCA; Methylation
1434.007	3+	4300.007	-1.6	LRAQQCRFWTSFFPKVLEMTGNIDEAEWEWK	514-544	CA; 2xMethylation
1329.562	3+	3986.671	-1.7	AGFHRWNNYMMDWKNQFNDYTSKK	545-568	3xCA
1182.478	3+	3545.421	4.5	WNNYMMDWKNQFNDYTSKKESCVGL	550-574	CA; Phosphorylation

Рис. 67. Масс-спектрометрический анализ фрагментов рчБуХЭ после химической модификации полисиаловыми кислотами. Ферменты были обработаны йодацетамидом и  $\alpha(2 \rightarrow 3,6,8,9)$ . Полученные смеси были очищены методом белкового электрофореза в ПААГ. Полосы белка, соответствующие десиализованному ферменту элюировали из геля, подвергали трипсинолизу и анализировали с использованием масс-спектрометре с ионизацией электроспреем. Исследование выполнено на базе Института биохимической медицины РАМН.

Было изучено влияние химической модификации на фармакокинетические характеристики препарата рчБуХЭ-ПСА27. Результаты исследования показали, что выведение препарата из кровотока мыши также описывалось двухкамерной фармакокинетической моделью, на основании которой были рассчитаны фармакокинетические параметры (Таблица 18).

Таблица 18. Фармакокинетические параметры препаратов рчБуХЭ, рчБуХЭ-ПСА27 и пчБуХЭ.

Биокатализатор	$t^{1/2}$ вывед., мин	$t^{1/2}$ распр., мин	MRT, мин
рчБуХЭ	180±30	4±1	220±50
рчБуХЭ-ПСА27	1000±140	21±13	1400±200
пчБуХЭ [172]	1680	-	2790

Результаты исследования показали, что использование химического полисиалирования позволило увеличить время полувыведения препарата рчБуХЭ-ПСА27 в шесть раз по сравнению с препаратом немодифицированной рчБуХЭ. На основании всех полученных в данной части работы исследованиях можно сделать следующие выводы:

1. оптимальные условия химической модификации позволяют получить препарат полисиалированной рчБуХЭ-ПСА27 с выходом не менее 80% и сохранением более чем 90% активности.
2. химическое полисиалирование не влияет на организацию активного центра фермента и не изменяет кинетические параметры эстеролитической активности рчБуХЭ;
3. химическое полисиалирование увеличивает время полувыведения препарата рчБуХЭ в шесть раз по сравнению с немодифицированным рекомбинантным ферментом.

#### ***Исследование защитной эффективности, модифицированной рчБуХЭ in vivo***

Полученные данные по улучшению фармакокинетических параметров препарата рчБуХЭ-ПСА27, стали обоснованием для оценки его защитной эффективности при отравлении фосфорорганическими токсинами. В качестве фосфорорганического токсина было использовано боевое отравляющее вещество VR. Эксперименты проводили в лаборатории проф. Аникиенко К.А. в ФГУП «ГосНИИОХТ» при соблюдении всех правил безопасности. Необходимо отметить, что для сравнительной оценки также был использован

препарат БуХЭ из плазмы крови человека, для которого доказана терапевтическая эффективность при отравлениях ФОТ.

Для препаратов потенциальных биологических антидотов основной физико-химической характеристикой является величина бимолекулярной константы ингибирования по отношению к ФОТ. Поэтому на первом этапе эксперимента были изучены кинетические параметры взаимодействия препаратов БуХЭ с VR (Таблица 19).

Таблица 19. Анализ бимолекулярной константы ингибирования препаратов рчБуХЭ, рчБуХЭ-ПСА27 и пчБуХЭ фосфорорганическим токсином VR.

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

Как видно из таблицы 19 высокая реакционная способность VR практически не зависит от типа используемого биокатализатора. Этот факт стал основанием для изучения защитных свойств полученных препаратов БуХЭ при отравлении мышей ФОТ VR. Однако из этических соображений препарат рчБуХЭ был исключен из эксперимента, на основании данных о его высокой скорости элиминации из организма (Таблица 18). 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 и оценивали их смертность. Для выживших животных определяли возможные побочные эффекты в тесте «Открытое поле», изучали физическую выносливость в тесте на «тредбане». Полученные экспериментальные данные обрабатывали по методике Дэвида Финни (David Finney) методом пробит-анализа. Рассчитанные величины защитных индексов приведены в Таблице 20. Результаты оценки побочных эффектов при терапии отравления агентом VR представлены на рисунке 68.

Таблица 20. Защитная эффективность препаратов рчБуХЭ-ПСА27 и пчБуХЭ по отношению к ФОТ VR.

	ЛД <sub>50</sub> ×10 <sup>3</sup> , мг/кг)			Защитный индекс, ЛД <sub>50</sub> <sup>(Защищенные)</sup> /ЛД <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	-

Значение защитного индекса препарата рчБуХЭ-ПСА27 составляет 4.2, что незначительно ниже аналогичного показателя для пчБуХЭ. Это может быть связано с большей скоростью элиминации из организма полисиалированного препарата по сравнению с пчБуХЭ (Таблица 18). 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 получивший дозу антидота независимо от ее типа (рчБуХЭ-ПСА27 или пчБуХЭ) восстанавливали свои показатели поведения.

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 антидоту. Для разработанного препарата полисиалированной БуХЭ был проведен комплекс доклинических исследований в рамках Государственного контракта № 13411.1008799.13.128 от 27.06.2013 г.

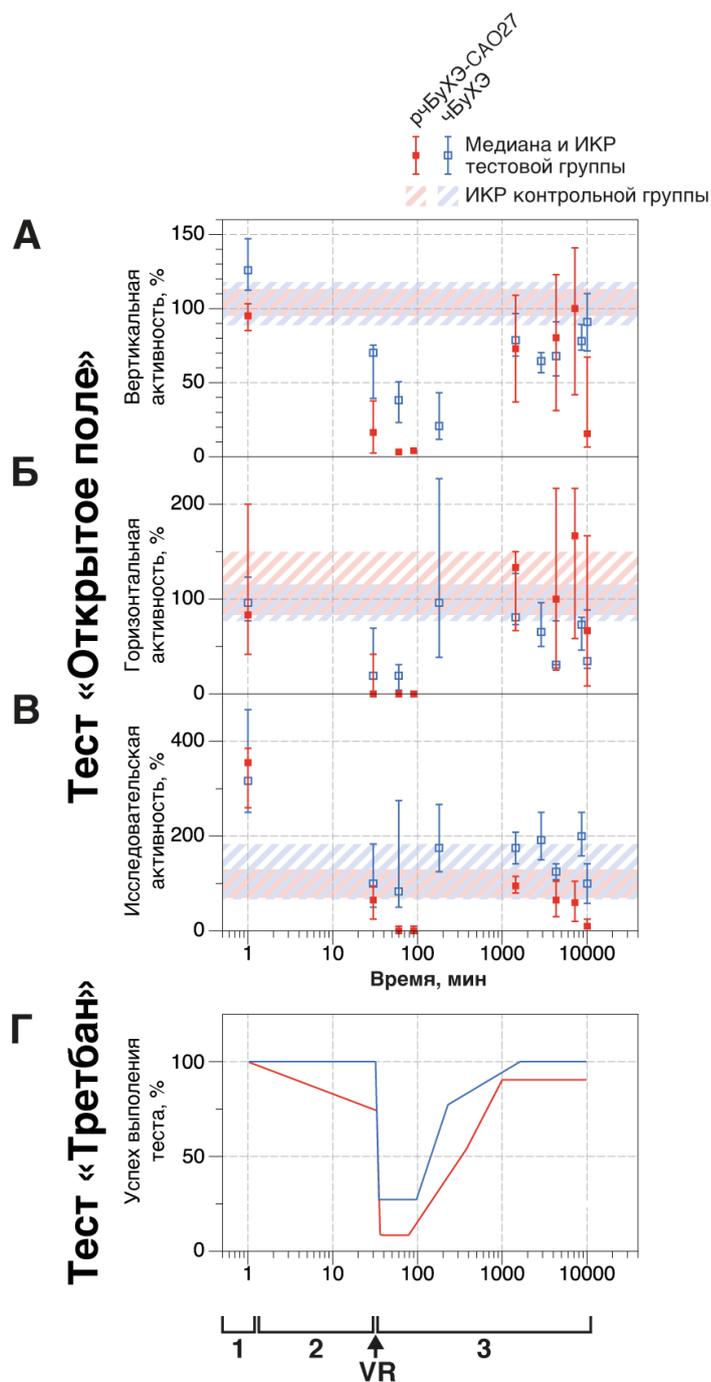


Рис. 68. Анализ побочных эффектов при терапии отравления агентом VR препаратами рчБуХЭ-ПСА27 и пчБуХЭ. (А-В) Тест «Открытое поле». (Г) Испытание на физическую выносливость на «третбане». Наблюдение за испытуемыми животными проводили за 24 часа до введения препаратов рчБуХЭ-ПСА27 и пчБуХЭ (точка 1), непосредственно 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.

### 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. Ранее научными коллективами под руководством Патрика Массона и Оксаны Локкридж были предприняты попытки получения тетрамерной БуХЭ в клетках линии СНО, однако уровень продукции составлял единицы миллиграмм с литра культуральной среды, что является абсолютно не эффективным с точки зрения прикладной биотехнологии. 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. 69).

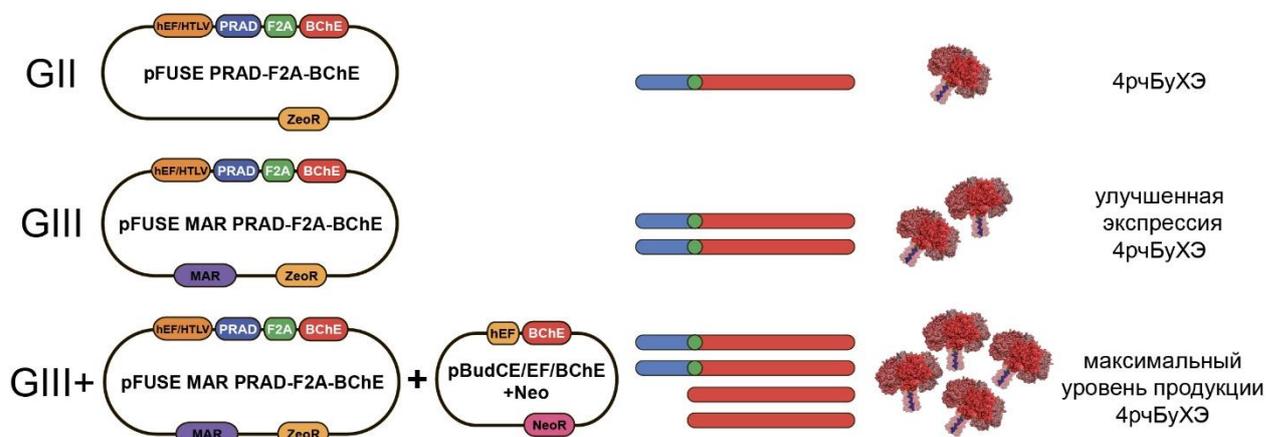


Рис. 69. Схема, иллюстрирующая основные принципы, заложенные в основу создания генетических конструкций нового поколения (GII, GIII и GIII+), обеспечивающих продукцию рчБУХЭ исключительно в естественной тетрамерной форме.

**Создание новых генетических конструкций для эффективной экспрессии гена БуХЭ в исключительно тетрамерной форме.**

Для эффективной количественной тетрамеризации была создана генетическая конструкция второго поколения GII - pFUSE-PRAD-F2A-BChE, в которой последовательности генов БуХЭ и пептида тетрамеризации PRAD находились в одной рамке считывания под управлением сильного синтетического промотора hEF/HTLV и были разделены последовательностью «самопроцессирующегося» F2A-пептида. В результате трансляции единого мРНК транскрипта происходила наработка избытка PRAD-пептида по отношению к БуХЭ, данный эффект, возникающий при использовании пептида F2A описан в литературе [235]. Трансфекция полученной генетической конструкцией клеток линии СНО-К1, позволила получить клоны, продуцирующие БуХЭ исключительно в тетрамерной форме (Рис. 70А), однако уровень продукции фермента был невысок и составлял около 4 мг/л (Рис. 70В).

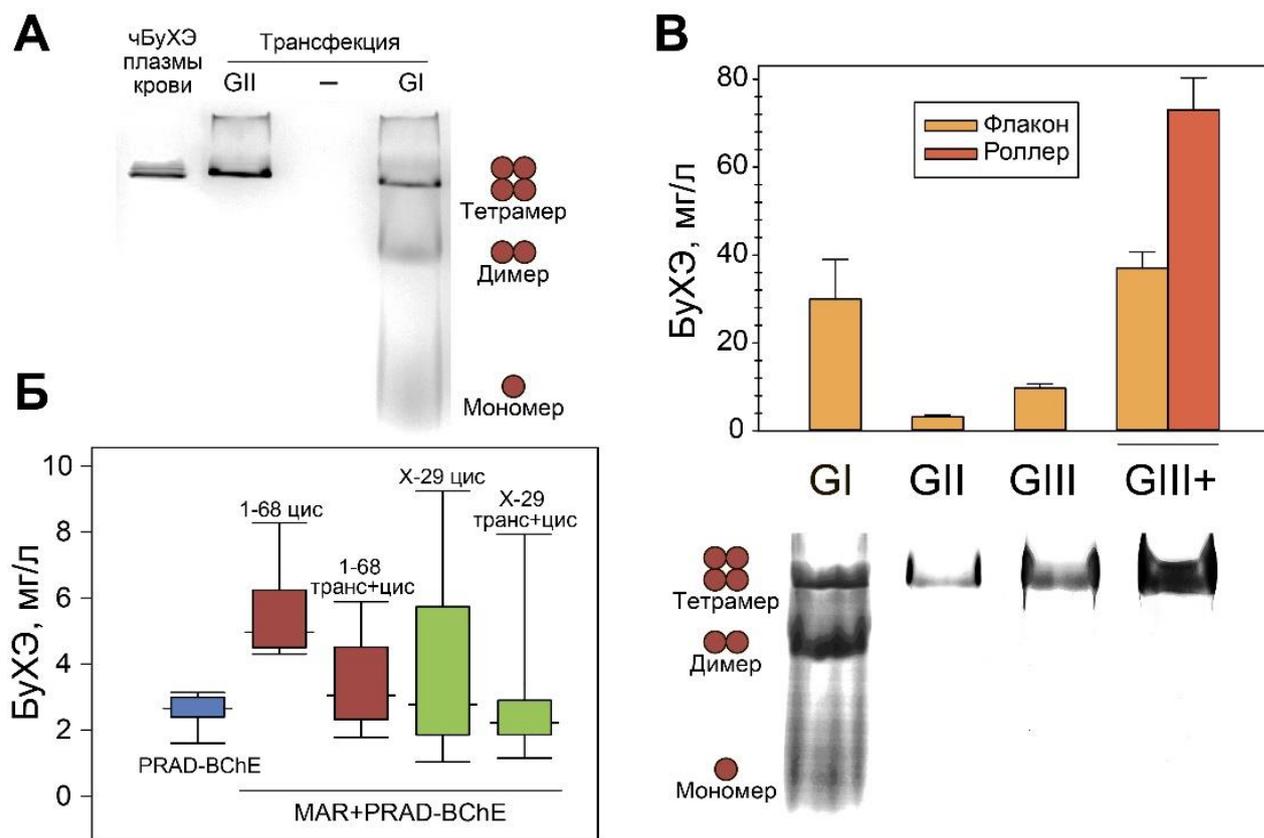


Рис. 70. (А) Трансфекция генетической конструкцией GII приводит к продукции исключительно 4рчБуХЭ. (Б) Анализ уровня продукции 4рчБуХЭ индивидуальными клонами-продуцентами, полученными в результате трансфекции и селекции с использованием векторов GII (PRAD-BChE), а также GIII с MAR 1-68 и X-29 в двух вариантах: цис и цис+транс. (В) Уровень продукции клонов-продуцентов рчБуХЭ поколений GI, GII, GIII и GIII+, а также олигомерный состав рчБуХЭ, полученной с их помощью.

Для увеличения уровня экспрессии в генетические конструкции второго поколения GII были дополнительно введены последовательности связывания с ядерным матриксом (MAR). Такие последовательности позволяют повысить продукцию целевого белка за счет увеличения уровня транскрипции, расположенного в непосредственной близости гена и большей стабильности комплекса рибосома-транскрипт [236]. При создании экспрессионных конструкций GIII были использованы последовательности связывания с ядерным матриксом MAR 1-68 и X-29, предсказанные ранее [236]. В ходе выбора оптимального клона-продуцента были протестированы различные варианты трансфекции:

- 1) «цис»-вариант - трансфекция только экспрессионным вектором GIII, содержащим одну из последовательностей MAR
- 2) «цис+транс»-вариант – котрансфекция экспрессионным вектором GIII, содержащим одну из последовательностей MAR и линейной двуцепочечной нуклеотидной последовательностью MAR того же типа.

Из анализа результатов, представленных на рисунке 70Б можно сделать следующие выводы:

- Трансфекция экспрессионными конструкциями GIII приводит к увеличению среднего уровня продукции 4рчБуХЭ;
- Трансфекция в «цис»-варианте позволяет получить клоны с большей продукцией целевого белка в сравнении с «цис+транс»-вариантом, что отличается от выводов, сделанных в работе [232];
- Трансфекция экспрессионными конструкциями, содержащими последовательность MAR 1-68 позволяет существенно повысить средний уровень продукции целевого фермента индивидуальными клонами-продуцентами (Рис. 81Б, медианы значений);
- При использовании последовательности MAR X-29 средний уровень продукции несколько ниже, однако обнаруживаются клоны-суперпродуценты 4рчБуХЭ (Рис. 81Б, «усы»).

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

- последовательность сильного синтетического промотора hEF/HTLV;

- нуклеотидная 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), позволяющая повысить продукцию целевого белка как за счет увеличения уровня транскрипции расположенного в непосредственной близости гена, так и за счет большей стабильности комплекса рибосома-транскрипт;
- последовательность гена *Sh ble*, продукт которого обеспечивает устойчивость трансформантов 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 pBudCE/EF/BChE+Neo клона-продуцента 11E11, имеющего максимальный уровень продукции БуХЭ. В результате селекции с использованием двух антибиотиков зеоцина и генетицина был получен клон-суперпродуцент – «клон б», с уровнем продукции БуХЭ более 70 мг/л в исключительно тетрамерной форме (Рис. 70В). В дальнейшем «клон б» был использован для препаративной наработки, выделения и очистки препарата 4рчБуХЭ для изучения его функциональных характеристик.

### ***Изучение фармакокинетических характеристик и профиля биораспределения 4рчБуХЭ, а также влияния химического полисиалирования***

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 был проведена оценка влияния химического полисиалирования на характеристики конъюгата 4рчБуХЭ-ПСА27 [237].

Химическую модификацию 4рчБуХЭ проводили по методике, использованной для препарата рчБуХЭ. Было установлено, что полисиалирование протекает с эффективностью более 95% и приводит к образованию конъюгата 4рчБуХЭ со степенью модификации порядка шести молекул полисиаловой кислоты в расчете на мономер БуХЭ (Рис. 71А). Как видно из рисунка 71 препарат рчБуХЭ присутствует в димерной и тетрамерной форме; препарат 4рчБуХЭ – исключительно в форме тетрамера. Препараты полисиалированной бутирилхолинэстеразы имеют очевидно более высокую молекулярную массу, однако не фокусируются, этот эффект описан для химически полисиалированных препаратов [177].

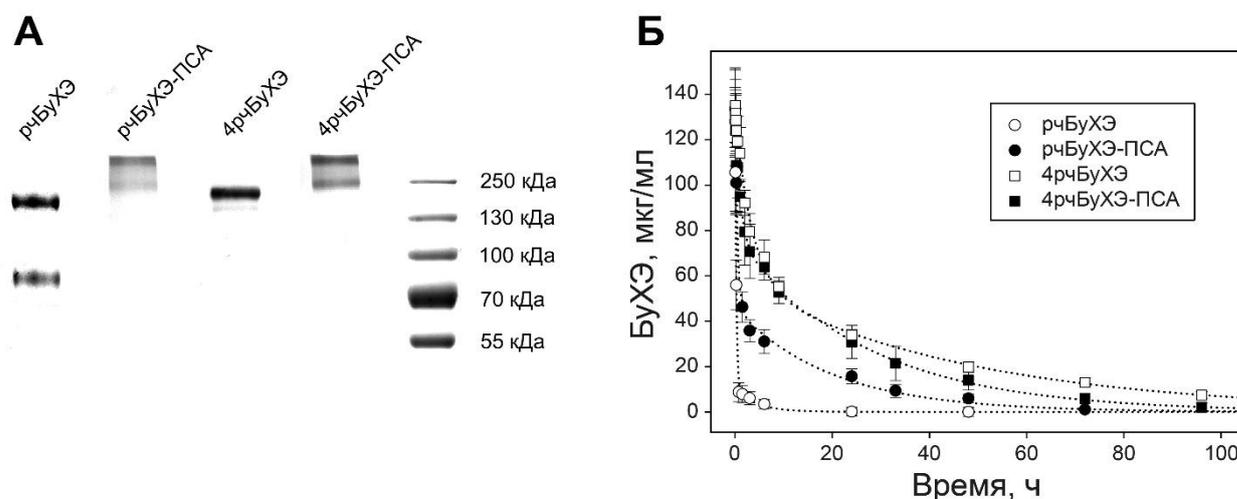


Рис. 71. (А) Электрофоретический анализ препаратов БуХЭ и их конъюгатов с полисиаловыми кислотами. Разделение проводили в 8% ПААГ в не восстанавливающих условиях с последующей окраской Кумасси R-250. (Б) Фармакокинетика выведения препаратов БуХЭ из крови после внутривенного введения. Фармакокинетические параметры препаратов получены исходя из аппроксимации кривой выведения фермента в рамках двухкамерной модели. Адаптировано из [[АктаНатура2015].

Для оценки фармакокинетических характеристик полученных вариантов БуХЭ использовали мышиную модель внутривенного введения препаратов и определение остаточной специфической активности в сыворотке крови. Уровень эндогенной активности БуХЭ в сыворотке крови мыши составлял  $2.0 \pm 0.5$  мкг/мл, что позволило с высокой точностью оценивать концентрацию введенных препаратов. На рисунке 82Б представлены кривые выведения исследуемых препаратов.

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 21). 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. Неожиданно было установлено, что полисиалирование 4рчБуХЭ не привело к еще большему увеличению фармакокинетических характеристик. Фармакокинетические кривые 4рчБуХЭ-ПСА и 4рчБуХЭ в первые сутки практически идентичны, однако в дальнейшем 4рчБуХЭ-ПСА выводилась быстрее, чем препарат немодифицированной 4рчБуХЭ.

Таблица 21. Фармакокинетические характеристики препаратов рчБуХЭ, рчБуХЭ-ПСА, 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА.

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-ПСА	0.3±0.1	14±2	19±3
4рчБуХЭ	2.4±0.3	33±2	43±4
4рчБуХЭ-ПСА	0.8±0.2	19±2	27±3

Таким образом, химическое полисиалирование позволяет многократно повысить фармакокинетические характеристики мономерной и димерной рчБуХЭ, но не улучшает фармакокинетику 4рчБуХЭ. Так как БуХЭ присутствует в плазме крови человека исключительно в тетрамерной форме и циркулирует в организме в течение продолжительного времени, а химическое полисиалирование 4рчБуХЭ не приводит к улучшению ее фармакокинетических характеристик, мы можем предположить, что увеличение продолжительности циркуляции препарата 4рчБуХЭ связано, в первую очередь, не с увеличением гидродинамического радиуса 4рчБуХЭ. По-видимому, образование комплекса 4рчБуХЭ приводит к маскировке доменов белка, ответственных за быструю элиминацию рчБуХЭ.

Для изучения влияния химического полисиалирования на профиль биораспределения и накопления препарата 4рчБуХЭ были проведены эксперименты с использованием препаратов, меченных радиоизотопом <sup>125</sup>I. Препараты 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА вводили внутривенно и анализировали их накопление в различных

компартаментах через 0.5, 3 и 48 ч относительно соответствующей радиоактивности образцов крови (Рис. 72).

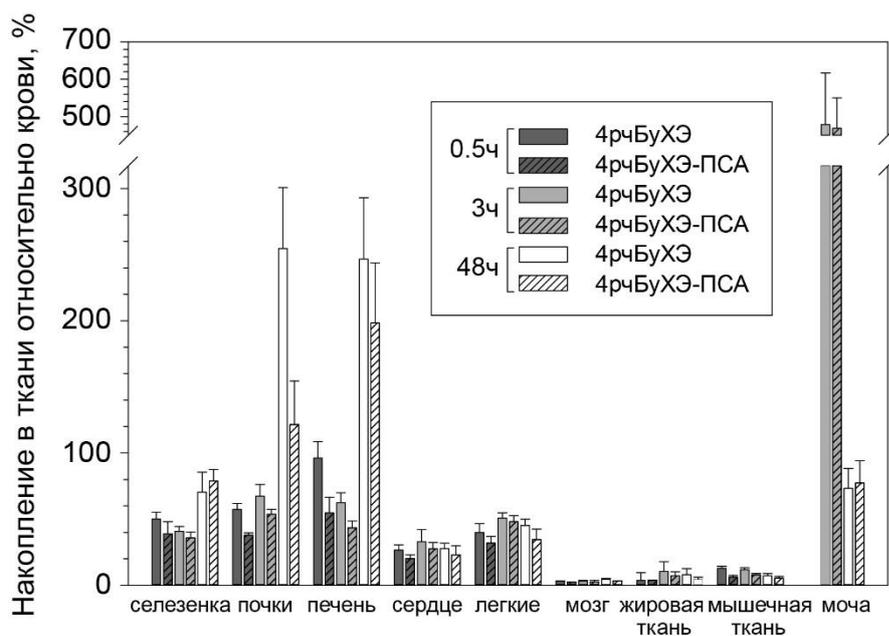


Рис. 72. Профили распределения препаратов 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА, меченных  $^{125}\text{I}$ , по органам, полученные через 0.5, 3 и 48 ч после внутривенного введения. Специфическую радиоактивность определяли как отношение общей радиоактивности органа (в срм/вес органа в граммах) к общей радиоактивности крови (срм/мл крови для каждого интервала времени).

Было показано, что в течение первых 3 ч не наблюдается специфического накопления препаратов 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА 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 ч и значительно более выражено у 4рчБуХЭ. Как уже отмечено ранее, фармакокинетика выведения 4рчБуХЭ и 4рчБуХЭ-ПСА крайне сходна в течение первых 24 ч, что проявляется также сходством профилей биораспределения. В то же время, спустя 48 ч фармакокинетические свойства 4рчБуХЭ лучше по сравнению с 4рчБуХЭ-ПСА. 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 компартаментах, по-видимому, связана с наличием кровеносных сосудов, что говорит об ограниченной способности к проникновению, характерной для препаратов БуХЭ.

### Анализ протективного действия препарата 4рчБуХЭ

Для демонстрации защитного действия 4рчБуХЭ использовали мышиную модель отравления ФОТ параоксоном. Грызуны, в отличие от людей, обладают собственным дополнительным механизмом защиты от отравления ФОТ, определяемым наличием фермента карбоксилэстеразы 1 (ES1) [238]. Для приближения мышинной модели отравления ФОТ к человеческой, был использован высокоспецифический ингибитор карбоксилэстеразы 1 – 2-(о-крезил)-4Н-1,3,2-бензодиоксафосфорин-2-оксид (CBDP). CBDP обладает низкой токсичностью и не вызывает признаков отравления при подкожном введении в дозе вплоть до 500 мг/кг [239]. Был проведен анализ влияния введения CBDP на чувствительность мышей к отравлению параоксоном (Рис. 73). Результаты показали, что введение ингибитора карбоксилэстеразы в дозе 1.5 мг/кг повышает токсичность параоксона, уменьшая LD50 с  $590 \pm 20$  до  $520 \pm 15$  мкг/кг для мышей линии BALB/с (Рис. 73).

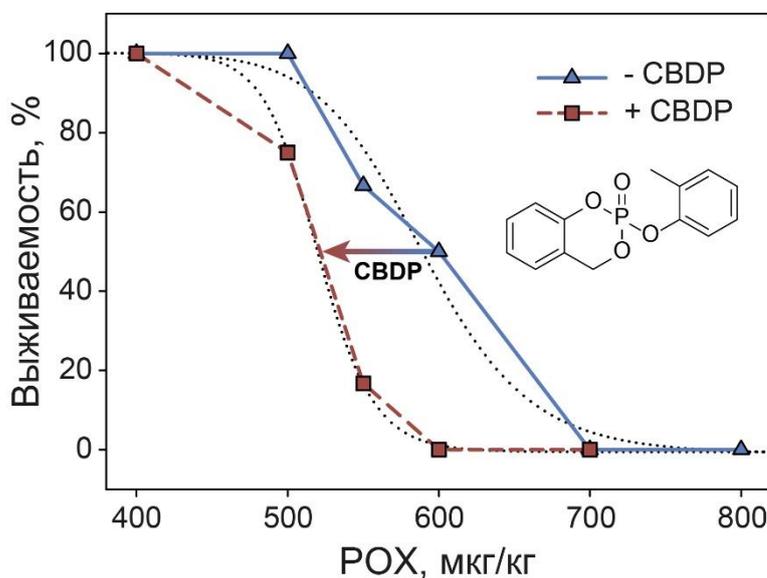


Рис. 73. Анализ влияния ингибитора карбоксилэстеразы CBDP на токсичность параоксона для мышей линии BALB/с.

Несмотря на то, что уровень эндогенной БуХЭ невысок, тем не менее фермент может влиять на тяжесть отравления параоксоном, поэтому для дальнейших исследований защитных свойств 4рчБуХЭ были использованы мыши BALB/с (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. 74А) и более тяжелых симптомах отравления (Рис. 74Б). 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. 74А). Также было отмечено

значительное снижение тяжести симптомов отравления нокаутных мышей и мышей дикого типа (Рис. 74Б). 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.

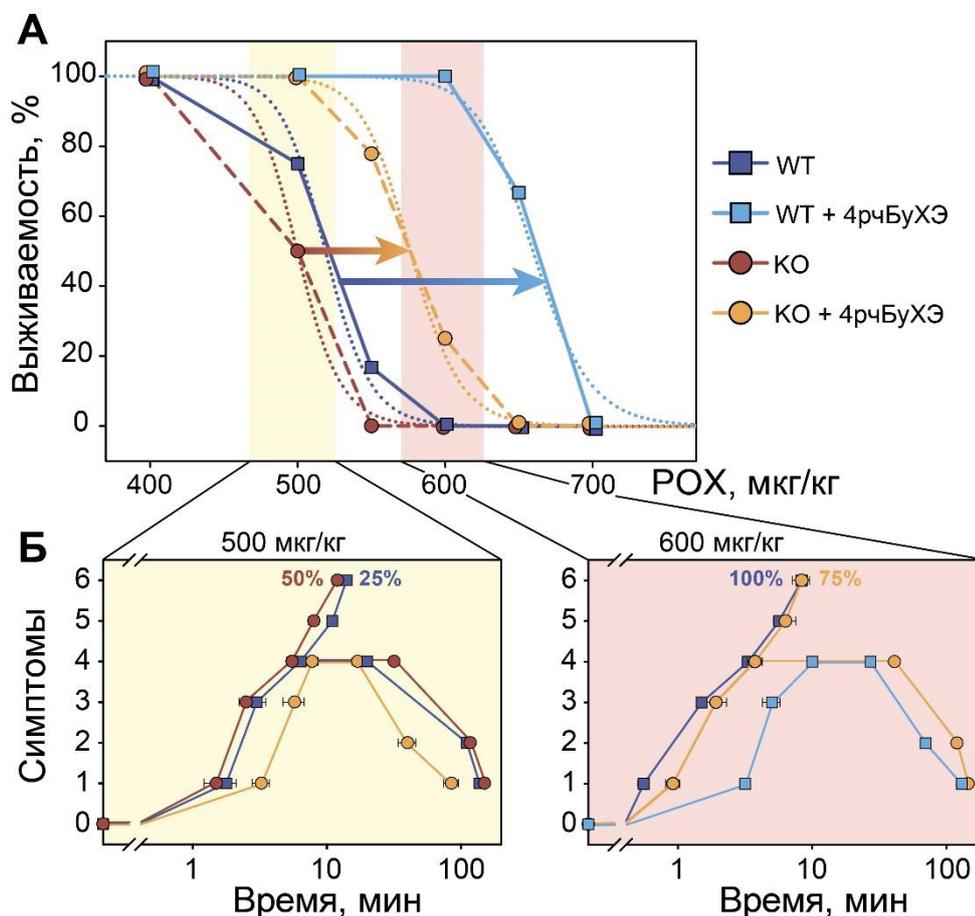


Рис. 74. (А) Выживаемость мышей дикого типа (WT), а также мышей, нокаутных по гену БуХЭ (КО), без терапии и с терапией 4рчБуХЭ. (Б) Тяжесть проявления симптомов отравления мышей, получивших РОХ в дозе 500 и 600 мкг/кг, во времени. 0 – отсутствие признаков; 1 – остановка двигательной активности и начало подъема в стойку после отравления; 3 – начало тремора; 2 – окончание тремора; 4 – проявление максимальных признаков отравления; 5 – кома; 6 – смерть.

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 LD<sub>50</sub> у мышей дикого типа (27% увеличение) в сравнении со значением LD<sub>50</sub> у нокаутных мышей (16% увеличение) в результате терапии 4рчБуХЭ.

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-ПСА, что может свидетельствовать о существовании дополнительных естественных механизмов стабилизации 4рчБуХЭ.

Низкая токсичность препаратов на основе 4рчБуХЭ позволяет расширить возможности применения биологических антидотов в терапии отравлений ФОТ. Однако, стоит отметить, что использование препаратов 4рчБуХЭ ограничено необходимостью введения стехиометрических количеств фермента по отношению к ФОТ. Этот факт, в свою очередь, приводит к тому, что защитный индекс терапии 4рчБуХЭ (отношение LD<sub>50</sub> животных после терапии к LD<sub>50</sub> без терапии) может быть высоким лишь в случае высокотоксичных боевых отравляющих веществ. Поэтому комбинация, разработанных в ходе выполнения диссертационной работы подходов к созданию биокаталитических антидотов с использованием технологии высокопроизводительного скрининга биокаталитической активности, совместно с оптимизированными технологиями улучшения фармакокинетических характеристик биокатализаторов, может позволить получить каталитический антидот пролонгированного действия на основе фермента бутирилхолинэстеразы.

## 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 параоксон 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, 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 двойной микрофлюидной эмульсии. Высокая селективность и чувствительность платформы позволили детектировать различные типы активности, а также дискриминировать уровни одинаковой активности. С использованием разработанной платформы были найдены новые каталитические антитела 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–CAO27 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 антитела. 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 БуХЭ 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 KO, получивших абсолютно летальную дозу POX 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. Разработанный в ходе выполнения диссертационной работы метод *in silico* созревания антител является универсальным. Он основан только на знании механизма каталитической реакции, который и определяет дальнейший вектор отбора. Таким образом, он может быть применим 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).

## 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 антитоксанта. Защитный индекс по веществу VR составил 4.2 ЛД<sub>50</sub>, 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 БуХЭ 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 KO, получивших абсолютно летальную дозу POX 600 мкг/кг ( $\approx 1,2$  LD<sub>50</sub>) и 550 мкг/кг ( $\approx 1,1$  LD<sub>50</sub>), соответственно.

## Список литературы.

1. Breslow R., O.L.E., *An 'Artificial Enzyme' Combining a Metal Catalytic Group and a Hydrophobic Binding Cavity*. J. Am. Chem. Soc., 1970. **92**(4): p. 1075-1077.
2. Gouverneur, V.E., et al., *Control of the exo and endo pathways of the Diels-Alder reaction by antibody catalysis*. Science, 1993. **262**(5131): p. 204-8.
3. Ulrich, H.D., E.M. Driggers, and P.G. Schultz, *Antibody catalysis of pericyclic reactions*. Acta Chem Scand, 1996. **50**(4): p. 328-32.
4. Socolich, M., et al., *Evolutionary information for specifying a protein fold*. Nature, 2005. **437**(7058): p. 512-8.
5. Russ, W.P. and R. Ranganathan, *Knowledge-based potential functions in protein design*. Curr Opin Struct Biol, 2002. **12**(4): p. 447-52.
6. Minshull, J., et al., *Predicting enzyme function from protein sequence*. Curr Opin Chem Biol, 2005. **9**(2): p. 202-9.
7. Russ, W.P., et al., *Natural-like function in artificial WW domains*. Nature, 2005. **437**(7058): p. 579-83.
8. Altamirano, M.M., et al., *Directed evolution of new catalytic activity using the alpha/beta-barrel scaffold*. Nature, 2000. **403**(6770): p. 617-22.
9. Quemeneur, E., et al., *Engineering cyclophilin into a proline-specific endopeptidase*. Nature, 1998. **391**(6664): p. 301-4.
10. Bolon, D.N. and S.L. Mayo, *Enzyme-like proteins by computational design*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14274-9.
11. Dwyer, M.A., L.L. Looger, and H.W. Hellinga, *Computational design of a biologically active enzyme*. Science, 2004. **304**(5679): p. 1967-71.
12. Looger, L.L., et al., *Computational design of receptor and sensor proteins with novel functions*. Nature, 2003. **423**(6936): p. 185-90.
13. Dwyer, M.A., L.L. Looger, and H.W. Hellinga, *Computational design of a Zn<sup>2+</sup> receptor that controls bacterial gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11255-60.
14. Pan, Y., et al., *Computational redesign of human butyrylcholinesterase for anticocaine medication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(46): p. 16656-61.
15. Zheng, F., et al., *A highly efficient cocaine-detoxifying enzyme obtained by computational design*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3457.
16. Lu, Y., et al., *Design of functional metalloproteins*. Nature, 2009. **460**(7257): p. 855-62.
17. Khare, S.D., et al., *Computational redesign of a mononuclear zinc metalloenzyme for organophosphate hydrolysis*. Nat Chem Biol, 2012. **8**(3): p. 294-300.

18. Aharoni, A., A.D. Griffiths, and D.S. Tawfik, *High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes*. *Curr Opin Chem Biol*, 2005. **9**(2): p. 210-6.
19. Fernandez-Gacio, A., M. Uguen, and J. Fastrez, *Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes*. *Trends Biotechnol*, 2003. **21**(9): p. 408-14.
20. Kaur, J. and R. Sharma, *Directed evolution: an approach to engineer enzymes*. *Crit Rev Biotechnol*, 2006. **26**(3): p. 165-99.
21. Reetz, M.T. and J.D. Carballeira, *Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(4): p. 891-903.
22. Wong, T.S., D. Zhurina, and U. Schwaneberg, *The diversity challenge in directed protein evolution*. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2006. **9**(4): p. 271-88.
23. Smirnov I., B.A., Gabibov A., *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, ed. G.H. Drauz K., May O. 2012, Weinheim: Wiley-VCH.
24. Jenks, W.P., *Catalysis in Chemistry and Enzymology*. New York: McGraw-Hill., 1969.
25. Raso, V. and B.D. Stollar, *The antibody-enzyme analogy. Comparison of enzymes and antibodies specific for phosphopyridoxyltyrosine*. *Biochemistry*, 1975. **14**(3): p. 591-9.
26. Kohen, F., et al., *Antibody-enhanced hydrolysis of steroid esters*. *Biochim Biophys Acta*, 1980. **629**(2): p. 328-37.
27. Kohen, F., et al., *Monoclonal immunoglobulin G augments hydrolysis of an ester of the homologous hapten: an esterase-like activity of the antibody-containing site?* *FEBS Lett*, 1980. **111**(2): p. 427-31.
28. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. *Nature*, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
29. Pollack, S.J., J.W. Jacobs, and P.G. Schultz, *Selective chemical catalysis by an antibody*. *Science*, 1986. **234**(4783): p. 1570-3.
30. Tramontano, A., K.D. Janda, and R.A. Lerner, *Catalytic antibodies*. *Science*, 1986. **234**(4783): p. 1566-70.
31. Shokat, K.M. and P.G. Schultz, *Catalytic antibodies*. *Annu Rev Immunol*, 1990. **8**: p. 335-63.
32. Schultz, P.G., *The interplay between chemistry and biology in the design of enzymatic catalysts*. *Science*, 1988. **240**(4851): p. 426-33.
33. Napper, A.D., et al., *A stereospecific cyclization catalyzed by an antibody*. *Science*, 1987. **237**(4818): p. 1041-3.
34. Hilvert, D., et al., *Catalysis of concerted reactions by antibodies: the Claisen rearrangement*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(14): p. 4953-5.

35. Jackson D. Y., J.H.W., Sugawara R., Reich S. H., Bartlett P. A., Schultz P.G., *An Antibody-catalyzed Claisen Rearrangement*. J. Am. Chem. Soc., 1988. **110**: p. 4941-42.
36. Bencovic S. J., N.A.D., Lerner R. A., *Catalysis of a Stereospecific Bimolecular Amide Synthesis by an Antibody*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1988. **85**(5355-8).
37. Braisted A. C., S.P.G., *An Antibody-catalyzed Bimolecular Diels-Alder Reaction*. J. Am. Chem. Soc., 1990. **112**: p. 7430-1.
38. Hilvert D., H.K.W., Nared K. D., Auditor M. T. M., *Antibody Catalysis of a Diels-Alder Reaction*. J. Am. Chem. Soc., 1989. **111**: p. 9261-9262.
39. Reshetnyak, A.V., et al., *Routes to covalent catalysis by reactive selection for nascent protein nucleophiles*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(51): p. 16175-82.
40. Tawfik, D.S., et al., *Efficient and selective p-nitrophenyl-ester-hydrolyzing antibodies elicited by a p-nitrobenzyl phosphonate hapten*. Eur J Biochem, 1997. **244**(2): p. 619-26.
41. Suzuki, H., et al., *A catalytic antibody that accelerates the hydrolysis of carbonate esters. Prediction of the binding-site structure of the substrate*. J Protein Chem, 1998. **17**(3): p. 273-8.
42. Janda, K.D., et al., *Induction of an antibody that catalyzes the hydrolysis of an amide bond*. Science, 1988. **241**(4870): p. 1188-91.
43. Miyashita, H., et al., *Prodrug activation via catalytic antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5337-40.
44. Landry, D.W., et al., *Antibody-catalyzed degradation of cocaine*. Science, 1993. **259**(5103): p. 1899-901.
45. Landry, D.W., *Immunotherapy for cocaine addiction*. Sci Am, 1997. **276**(2): p. 42-5.
46. Mets, B., et al., *A catalytic antibody against cocaine prevents cocaine's reinforcing and toxic effects in rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(17): p. 10176-81.
47. McKenzie, K.M., et al., *Identification and characterization of single chain anti-cocaine catalytic antibodies*. J Mol Biol, 2007. **365**(3): p. 722-31.
48. Benkovic, S.J., et al., *The enzymic nature of antibody catalysis: development of multistep kinetic processing*. Science, 1990. **250**(4984): p. 1135-9.
49. Pollack, S.J., G.R. Nakayama, and P.G. Schultz, *Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites*. Science, 1988. **242**(4881): p. 1038-40.
50. Baldwin, E. and P.G. Schultz, *Generation of a catalytic antibody by site-directed mutagenesis*. Science, 1989. **245**(4922): p. 1104-7.
51. Luo, G.M., et al., *Generation of selenium-containing abzyme by using chemical mutation*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **198**(3): p. 1240-7.
52. Qi, D.H., et al., *Protection of myocardial mitochondria against oxidative damage by selenium-containing abzyme m4G3*. Appl Biochem Biotechnol, 1999. **82**(3): p. 167-73.

53. Janda, K.D., C.G. Shevlin, and R.A. Lerner, *Antibody catalysis of a disfavored chemical transformation*. Science, 1993. **259**(5094): p. 490-3.
54. Gruber, K., et al., *Structural basis for antibody catalysis of a disfavored ring closure reaction*. Biochemistry, 1999. **38**(22): p. 7062-74.
55. Shabat, D., et al., *Antibody catalysis of a reaction otherwise strongly disfavoured in water*. Nature, 1995. **374**(6518): p. 143-6.
56. Oudin, J. and M. Michel, *[A new allotype form of rabbit serum gamma-globulins, apparently associated with antibody function and specificity.]*. C R Hebd Seances Acad Sci, 1963. **257**: p. 805-8.
57. Jerne, N.K., *Towards a network theory of the immune system*. Ann Immunol (Paris), 1974. **125C**(1-2): p. 373-89.
58. Gabibov, A.G., et al., *DNA-hydrolyzing autoantibodies*. Appl Biochem Biotechnol, 1994. **47**(2-3): p. 293-302; discussion 303.
59. Bronshtein, I.B., et al., *DNA-specific antiidiotypic antibodies in the sera of patients with autoimmune diseases*. FEBS Lett, 1992. **314**(3): p. 259-63.
60. Avalle, B., D. Thomas, and A. Friboulet, *Functional mimicry: elicitation of a monoclonal anti-idiotypic antibody hydrolyzing beta-lactams*. FASEB J, 1998. **12**(11): p. 1055-60.
61. Izadyar, L., et al., *Monoclonal anti-idiotypic antibodies as functional internal images of enzyme active sites: production of a catalytic antibody with a cholinesterase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 8876-80.
62. Lerner, R.A. and C.F. Barbas, 3rd, *Using the process of reactive immunization to induce catalytic antibodies with complex mechanisms: aldolases*. Acta Chem Scand, 1996. **50**(8): p. 672-8.
63. Wirsching, P., et al., *Reactive immunization*. Science, 1995. **270**(5243): p. 1775-82.
64. Barbas, C.F., 3rd, et al., *Immune versus natural selection: antibody aldolases with enzymic rates but broader scope*. Science, 1997. **278**(5346): p. 2085-92.
65. Sinha, S.C., C.F. Barbas, 3rd, and R.A. Lerner, *The antibody catalysis route to the total synthesis of epothilones*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 14603-8.
66. Shabat, D., et al., *Multiple event activation of a generic prodrug trigger by antibody catalysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6925-30.
67. Shamis, M., H.N. Lode, and D. Shabat, *Bioactivation of self-immolative dendritic prodrugs by catalytic antibody 38C2*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(6): p. 1726-31.
68. Sinha, S.C., et al., *Prodrugs of dynemicin analogs for selective chemotherapy mediated by an aldolase catalytic Ab*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(9): p. 3095-9.

69. Shabat, D., et al., *In vivo activity in a catalytic antibody-prodrug system: Antibody catalyzed etoposide prodrug activation for selective chemotherapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7528-33.
70. Rader, C., et al., *A humanized aldolase antibody for selective chemotherapy and adaptor immunotherapy*. J Mol Biol, 2003. **332**(4): p. 889-99.
71. Wentworth, P., Jr., et al., *A bait and switch hapten strategy generates catalytic antibodies for phosphodiester hydrolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 5971-5.
72. Iverson, B.L. and R.A. Lerner, *Sequence-specific peptide cleavage catalyzed by an antibody*. Science, 1989. **243**(4895): p. 1184-8.
73. Savitsky, A.P., et al., *Kinetics of oxidation of o-dianisidine by hydrogen peroxide in the presence of antibody complexes of iron(III) coproporphyrin*. Appl Biochem Biotechnol, 1994. **47**(2-3): p. 317-27.
74. Mahy, J.P., et al., *Hemoabzymes. Different strategies for obtaining artificial hemoproteins based on antibodies*. Appl Biochem Biotechnol, 1998. **75**(1): p. 103-27.
75. Hilvert, D., *Critical analysis of antibody catalysis*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 751-93.
76. Stewart, J.D. and S.J. Benkovic, *Transition-state stabilization as a measure of the efficiency of antibody catalysis*. Nature, 1995. **375**(6530): p. 388-91.
77. Chen, W. and G. Georgiou, *Cell-Surface display of heterologous proteins: From high-throughput screening to environmental applications*. Biotechnol Bioeng, 2002. **79**(5): p. 496-503.
78. Lee, S.Y., J.H. Choi, and Z. Xu, *Microbial cell-surface display*. Trends Biotechnol, 2003. **21**(1): p. 45-52.
79. Kawarasaki, Y., et al., *Enhanced crossover SCRATCHY: construction and high-throughput screening of a combinatorial library containing multiple non-homologous crossovers*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(21): p. e126.
80. Freeman, A., et al., *Screening of large protein libraries by the cell immobilized on adsorbed bead approach*. Biotechnol Bioeng, 2004. **86**(2): p. 196-200.
81. Cesaro-Tadic, S., et al., *Turnover-based in vitro selection and evolution of biocatalysts from a fully synthetic antibody library*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(6): p. 679-85.
82. Yin, J., J.H. Mills, and P.G. Schultz, *A catalysis-based selection for peroxidase antibodies with increased activity*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(10): p. 3006-7.
83. Strobel, H., D. Ladant, and J.L. Jestin, *In vitro selection for enzymatic activity: a model study using adenylate cyclase*. J Mol Biol, 2003. **332**(1): p. 1-7.
84. Yim, S.S., et al., *Rapid isolation of antibody from a synthetic human antibody library by repeated fluorescence-activated cell sorting (FACS)*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e108225.

85. Zhang, J., et al., *Mammalian cell display for rapid screening scFv antibody therapy*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2014. **46**(10): p. 859-66.
86. Daugherty, P.S., *Protein engineering with bacterial display*. Curr Opin Struct Biol, 2007. **17**(4): p. 474-80.
87. Gera, N., M. Hussain, and B.M. Rao, *Protein selection using yeast surface display*. Methods, 2013. **60**(1): p. 15-26.
88. Zhou, C., et al., *Development of a novel mammalian cell surface antibody display platform*. MAbs, 2010. **2**(5): p. 508-18.
89. Rajpal, A., et al., *A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(24): p. 8466-71.
90. Tawfik, D.S. and A.D. Griffiths, *Man-made cell-like compartments for molecular evolution*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(7): p. 652-6.
91. Griffiths, A.D. and D.S. Tawfik, *Directed evolution of an extremely fast phosphotriesterase by in vitro compartmentalization*. EMBO J, 2003. **22**(1): p. 24-35.
92. Sepp, A., D.S. Tawfik, and A.D. Griffiths, *Microbead display by in vitro compartmentalisation: selection for binding using flow cytometry*. FEBS Lett, 2002. **532**(3): p. 455-8.
93. Mastrobattista, E., et al., *High-throughput screening of enzyme libraries: in vitro evolution of a beta-galactosidase by fluorescence-activated sorting of double emulsions*. Chem Biol, 2005. **12**(12): p. 1291-300.
94. Gupta, R.D., et al., *Directed evolution of hydrolases for prevention of G-type nerve agent intoxication*. Nat Chem Biol, 2011. **7**(2): p. 120-5.
95. Goldsmith, M., et al., *Evolved stereoselective hydrolases for broad-spectrum G-type nerve agent detoxification*. Chem Biol, 2012. **19**(4): p. 456-66.
96. Tu, R., et al., *A flow cytometry-based screening system for directed evolution of proteases*. J Biomol Screen, 2011. **16**(3): p. 285-94.
97. Guo, M.T., et al., *Droplet microfluidics for high-throughput biological assays*. Lab Chip, 2012. **12**(12): p. 2146-55.
98. Clausell-Tormos, J., et al., *Droplet-based microfluidic platforms for the encapsulation and screening of Mammalian cells and multicellular organisms*. Chem Biol, 2008. **15**(5): p. 427-37.
99. Mazutis, L., et al., *Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics*. Nat Protoc, 2013. **8**(5): p. 870-91.
100. Schaerli, Y. and F. Hollfelder, *The potential of microfluidic water-in-oil droplets in experimental biology*. Mol Biosyst, 2009. **5**(12): p. 1392-404.

101. Granieri, L., et al., *High-throughput screening of enzymes by retroviral display using droplet-based microfluidics*. Chem Biol, 2010. **17**(3): p. 229-35.
102. Agresti, J.J., et al., *Ultra-high-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(9): p. 4004-9.
103. Stewart, J.D., et al., *Site-directed mutagenesis of a catalytic antibody: an arginine and a histidine residue play key roles*. Biochemistry, 1994. **33**(8): p. 1994-2003.
104. Hifumi, E., et al., *Highly efficient method of preparing human catalytic antibody light chains and their biological characteristics*. FASEB J, 2012. **26**(4): p. 1607-15.
105. Zheng, L., et al., *Expression improvement and mechanistic study of the retro-Diels-Alderase catalytic antibody 10F11 by site-directed mutagenesis*. J Mol Biol, 2004. **341**(3): p. 807-14.
106. Millard, C.B., O. Lockridge, and C.A. Broomfield, *Organophosphorus acid anhydride hydrolase activity in human butyrylcholinesterase: synergy results in a somanase*. Biochemistry, 1998. **37**(1): p. 237-47.
107. Järv, J., *Stereochemical aspects of cholinesterase catalysis*. Bioorganic Chemistry, 1984. **12**(4): p. 259-78.
108. Lockridge, O., et al., *A single amino acid substitution, Gly117His, confers phosphotriesterase (organophosphorus acid anhydride hydrolase) activity on human butyrylcholinesterase*. Biochemistry, 1997. **36**(4): p. 786-95.
109. Millard, C.B., O. Lockridge, and C.A. Broomfield, *Design and expression of organophosphorus acid anhydride hydrolase activity in human butyrylcholinesterase*. Biochemistry, 1995. **34**(49): p. 15925-33.
110. Warshel, A. and M. Levitt, *Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme*. J Mol Biol, 1976. **103**(2): p. 227-49.
111. Warshel, A. and M. Karplus, *Calculation of pi-pi excited state conformations and vibronic structure of retinal and related molecules*. J Am Chem Soc, 1974. **96**(18): p. 5677-89.
112. van der Kamp, M.W. and A.J. Mulholland, *Computational enzymology: insight into biological catalysts from modelling*. Nat Prod Rep, 2008. **25**(6): p. 1001-14.
113. Dahiyat, B.I. and S.L. Mayo, *De novo protein design: fully automated sequence selection*. Science, 1997. **278**(5335): p. 82-7.
114. Kuhlman, B., et al., *Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy*. Science, 2003. **302**(5649): p. 1364-8.
115. Koga, N., et al., *Principles for designing ideal protein structures*. Nature, 2012. **491**(7423): p. 222-7.

116. Chen, C.Y., et al., *Computational structure-based redesign of enzyme activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 3764-9.
117. Zanghellini, A., et al., *New algorithms and an in silico benchmark for computational enzyme design*. Protein Sci, 2006. **15**(12): p. 2785-94.
118. Siegel, J.B., et al., *Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction*. Science, 2010. **329**(5989): p. 309-13.
119. Lippow, S.M., K.D. Wittrup, and B. Tidor, *Computational design of antibody-affinity improvement beyond in vivo maturation*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(10): p. 1171-6.
120. Tinberg, C.E., et al., *Computational design of ligand-binding proteins with high affinity and selectivity*. Nature, 2013. **501**(7466): p. 212-6.
121. Grigoryan, G., A.W. Reinke, and A.E. Keating, *Design of protein-interaction specificity gives selective bZIP-binding peptides*. Nature, 2009. **458**(7240): p. 859-64.
122. Korkegian, A., et al., *Computational thermostabilization of an enzyme*. Science, 2005. **308**(5723): p. 857-60.
123. Osipovitch, D.C., et al., *Design and analysis of immune-evading enzymes for ADEPT therapy*. Protein Eng Des Sel, 2012. **25**(10): p. 613-23.
124. Salvat, R.S., et al., *Computationally driven deletion of broadly distributed T cell epitopes in a biotherapeutic candidate*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(24): p. 4869-80.
125. Rothlisberger, D., et al., *Kemp elimination catalysts by computational enzyme design*. Nature, 2008. **453**(7192): p. 190-5.
126. Jiang, L., et al., *De novo computational design of retro-aldol enzymes*. Science, 2008. **319**(5868): p. 1387-91.
127. Tantillo, D.J., J. Chen, and K.N. Houk, *Theozymes and compuzymes: theoretical models for biological catalysis*. Curr Opin Chem Biol, 1998. **2**(6): p. 743-50.
128. Malisi, C., O. Kohlbacher, and B. Hocker, *Automated scaffold selection for enzyme design*. Proteins, 2009. **77**(1): p. 74-83.
129. Thorn, S.N., et al., *Large rate accelerations in antibody catalysis by strategic use of haptenic charge*. Nature, 1995. **373**(6511): p. 228-30.
130. Khersonsky, O., et al., *Evolutionary optimization of computationally designed enzymes: Kemp eliminases of the KE07 series*. J Mol Biol, 2010. **396**(4): p. 1025-42.
131. Khersonsky, O., et al., *Optimization of the in-silico-designed kemp eliminase KE70 by computational design and directed evolution*. J Mol Biol, 2011. **407**(3): p. 391-412.
132. Khersonsky, O., et al., *Bridging the gaps in design methodologies by evolutionary optimization of the stability and proficiency of designed Kemp eliminase KE59*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(26): p. 10358-63.

133. Alexandrova, A.N. and W.L. Jorgensen, *Origin of the activity drop with the E50D variant of catalytic antibody 34E4 for Kemp elimination*. J Phys Chem B, 2009. **113**(2): p. 497-504.
134. Romesberg, F.E. and P.G. Schultz, *A mutational study of a Diels-Alderase catalytic antibody*. Bioorg Med Chem Lett, 1999. **9**(13): p. 1741-4.
135. Romesberg, F.E., et al., *Immunological origins of binding and catalysis in a Diels-Alderase antibody*. Science, 1998. **279**(5358): p. 1929-33.
136. Clark, L.A., et al., *Affinity enhancement of an in vivo matured therapeutic antibody using structure-based computational design*. Protein Sci, 2006. **15**(5): p. 949-60.
137. Barderas, R., et al., *Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(26): p. 9029-34.
138. Farady, C.J., et al., *Improving the species cross-reactivity of an antibody using computational design*. Bioorg Med Chem Lett, 2009. **19**(14): p. 3744-7.
139. Eyer, P., et al., *Are we using the right dose? - a tale of mole and gram*. Br J Clin Pharmacol, 2008. **66**(4): p. 451-2.
140. Wolfe, A.D., et al., *Acetylcholinesterase prophylaxis against organophosphate toxicity*. Fundam Appl Toxicol, 1987. **9**(2): p. 266-70.
141. Masson, P., et al., *A collaborative endeavor to design cholinesterase-based catalytic scavengers against toxic organophosphorus esters*. Chem Biol Interact, 2008. **175**(1-3): p. 273-80.
142. Sweeney, R.E. and D.M. Maxwell, *A theoretical expression for the protection associated with stoichiometric and catalytic scavengers in a single compartment model of organophosphorus poisoning*. Math Biosci, 2003. **181**(2): p. 133-43.
143. Millard, C.B., et al., *Crystal structures of aged phosphonylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level*. Biochemistry, 1999. **38**(22): p. 7032-9.
144. Kaplan, D., et al., *Does "butyrylization" of acetylcholinesterase through substitution of the six divergent aromatic amino acids in the active center gorge generate an enzyme mimic of butyrylcholinesterase?* Biochemistry, 2001. **40**(25): p. 7433-45.
145. Sklan, E.H., et al., *Acetylcholinesterase/paraoxonase genotype and expression predict anxiety scores in Health, Risk Factors, Exercise Training, and Genetics study*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5512-7.
146. Saxena, A., et al., *Mutant acetylcholinesterases as potential detoxification agents for organophosphate poisoning*. Biochem Pharmacol, 1997. **54**(2): p. 269-74.
147. Rochu, D., E. Chabriere, and P. Masson, *Human paraoxonase: a promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning*. Toxicology, 2007. **233**(1-3): p. 47-59.

148. Sirivarasai, J., et al., *Paraoxonase (PON1) polymorphism and activity as the determinants of sensitivity to organophosphates in human subjects*. Chem Biol Interact, 2007. **168**(3): p. 184-92.
149. Khersonsky, O. and D.S. Tawfik, *Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase*. Biochemistry, 2005. **44**(16): p. 6371-82.
150. Shih, D.M., et al., *Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice*. Circ Res, 2007. **100**(8): p. 1200-7.
151. Masson, P. and D. Rochu, *Catalytic bioscavengers against toxic esters, an alternative approach for prophylaxis and treatments of poisonings*. Acta Naturae, 2009. **1**(1): p. 68-79.
152. Aharoni, A., et al., *Directed evolution of mammalian paraoxonases PON1 and PON3 for bacterial expression and catalytic specialization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(2): p. 482-7.
153. Valiyaveetil, M., et al., *Protective efficacy of catalytic bioscavenger, paraoxonase 1 against sarin and soman exposure in guinea pigs*. Biochem Pharmacol, 2011. **81**(6): p. 800-9.
154. Jbilo, O., et al., *Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase expression in adult rabbit tissues and during development*. Eur J Biochem, 1994. **225**(1): p. 115-24.
155. Mesulam, M.M., et al., *Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine*. Neuroscience, 2002. **110**(4): p. 627-39.
156. George, S.T. and A.S. Balasubramanian, *The aryl acylamidases and their relationship to cholinesterases in human serum, erythrocyte and liver*. Eur J Biochem, 1981. **121**(1): p. 177-86.
157. Saxena, A., et al., *Prophylaxis with human serum butyrylcholinesterase protects guinea pigs exposed to multiple lethal doses of soman or VX*. Biochemical Pharmacology, 2011. **81**(1): p. 164-169.
158. Lockridge, O., et al., *Large Scale Purification of Butyrylcholinesterase from Human Plasma Suitable for Injection into Monkeys; a Potential New Therapeutic for Protection against Cocaine and Nerve Agent Toxicity*. J Med Chem Biol Radiol Def, 2005. **3**: p. nihms5095.
159. Raveh, L., et al., *The Stoichiometry of Protection against Soman and VX Toxicity in Monkeys Pretreated with Human Butyrylcholinesterase*. Toxicology and Applied Pharmacology, 1997. **145**(1): p. 43-53.
160. Lockridge, O. and P. Masson, *Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk*. Neurotoxicology, 2000. **21**(1-2): p. 113-26.
161. Evron, T., et al., *Plant-derived human acetylcholinesterase-R provides protection from lethal organophosphate poisoning and its chronic aftermath*. FASEB J, 2007. **21**(11): p. 2961-9.

162. Saxena, A., et al., *Pretreatment with human serum butyrylcholinesterase alone prevents cardiac abnormalities, seizures, and death in Göttingen minipigs exposed to sarin vapor*. *Biochemical Pharmacology*, 2011. **82**(12): p. 1984-1993.
163. Myers, T.M., et al., *Characterization of human serum butyrylcholinesterase in rhesus monkeys: behavioral and physiological effects*. *Neurotoxicol Teratol*, 2012. **34**(3): p. 323-30.
164. Bershtein, S. and D.S. Tawfik, *Advances in laboratory evolution of enzymes*. *Curr Opin Chem Biol*, 2008. **12**(2): p. 151-8.
165. Nachon, F., et al., *Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystallization*. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(2): p. 630-7.
166. Kris, M., et al., *Endogenous butyrylcholinesterase in SV40 transformed cell lines: COS-1, COS-7, MRC-5 SV40, and WI-38 VA13*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1994. **30A**(10): p. 680-9.
167. Huang, Y.J., et al., *Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2007. **104**(34): p. 13603-8.
168. Yang, X. and M.G. Carter, *Transgenic animal bioreactors: a new line of defense against chemical weapons?* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(35): p. 13859-60.
169. Geyer, B.C., et al., *Plant-derived human butyrylcholinesterase, but not an organophosphorous-compound hydrolyzing variant thereof, protects rodents against nerve agents*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2010. **107**(47): p. 20251-20256.
170. Rosenberg, Y.J., et al., *Protection against paraoxon toxicity by an intravenous pretreatment with polyethylene-glycol-conjugated recombinant butyrylcholinesterase in macaques*. *Chem Biol Interact*, 2014. **210**: p. 20-5.
171. Sun, W., et al., *Effect of polyethylene glycol conjugation on the circulatory stability of plasma-derived human butyrylcholinesterase in mice*. *Chem Biol Interact*, 2013. **203**(1): p. 172-6.
172. Rosenberg, Y.J., et al., *Demonstration of in vivo stability and lack of immunogenicity of a polyethyleneglycol-conjugated recombinant CHO-derived butyrylcholinesterase bioscavenger using a homologous macaque model*. *Chemico-Biological Interactions*, 2010. **187**(1-3): p. 279-286.
173. Mumford, H. and J.K. Troyer, *Post-exposure therapy with recombinant human BuChE following percutaneous VX challenge in guinea-pigs*. *Toxicology Letters*, 2011. **206**(1): p. 29-34.
174. Huang, Y.J., et al., *Substantially improved pharmacokinetics of recombinant human butyrylcholinesterase by fusion to human serum albumin*. *BMC Biotechnol*, 2008. **8**: p. 50.
175. Li, H., et al., *Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers*. *Biochemical Journal*, 2008. **411**(2): p. 425-432.

176. Larson, M.A., O. Lockridge, and S.H. Hinrichs, *Polyproline promotes tetramerization of recombinant human butyrylcholinesterase*. *Biochem. J.*, 2014. **462**(2): p. 329-35.
177. Ilyushin, D.G., et al., *Chemical polysialylation of human recombinant butyrylcholinesterase delivers a long-acting bioscavenger for nerve agents in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2013. **110**(4): p. 1243-1248.
178. Radic, Z., et al., *Catalytic detoxification of nerve agent and pesticide organophosphates by butyrylcholinesterase assisted with non-pyridinium oximes*. *Biochem. J.*, 2013. **450**(1): p. 231-42.
179. Sit, R.K., et al., *Imidazole Aldoximes Effective in Assisting Butyrylcholinesterase Catalysis of Organophosphate Detoxification*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2014. **57**(4): p. 1378-1389.
180. Broomfield, C.A., et al., *Reaction of Human Butyrylcholinesterase (BChE) H117 Enzymes with Carbamates*, in *Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins*, B.P. Doctor, et al., Editors. 1998, Springer US: Boston, MA. p. 223-226.
181. Amitay, M. and A. Shurki, *The structure of G117H mutant of butyrylcholinesterase: Nerve agents scavenger*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2009. **77**(2): p. 370-377.
182. Worek, F., et al., *Efficacy of the rePON1 mutant IIG1 to prevent cyclosarin toxicity in vivo and to detoxify structurally different nerve agents in vitro*. *Arch Toxicol*, 2014. **88**(6): p. 1257-66.
183. Worek, F., et al., *Post-exposure treatment of VX poisoned guinea pigs with the engineered phosphotriesterase mutant C23: A proof-of-concept study*. *Toxicol. Lett.*, 2014. **231**(1): p. 45-54.
184. Zheng, F., et al., *Most Efficient Cocaine Hydrolase Designed by Virtual Screening of Transition States*. *Journal of the American Chemical Society*, 2008. **130**(36): p. 12148-12155.
185. Zheng, F., et al., *A highly efficient cocaine-detoxifying enzyme obtained by computational design*. *Nat Commun*, 2014. **5**.
186. Gao, Y., et al., *An albumin-butylcholinesterase for cocaine toxicity and addiction: Catalytic and pharmacokinetic properties*. *Chemico-Biological Interactions*, 2008. **175**(1-3): p. 83-87.
187. Zlebnik, N.E., et al., *Long-Term Reduction of Cocaine Self-Administration in Rats Treated with Adenoviral Vector-Delivered Cocaine Hydrolase: Evidence for Enzymatic Activity*. *Neuropsychopharmacology*, 2014. **39**(6): p. 1538-1546.
188. Parikh, K., et al., *Gene-delivered butyrylcholinesterase is prophylactic against the toxicity of chemical warfare nerve agents and organophosphorus compounds*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2011. **337**(1): p. 92-101.
189. Mata, D.G., et al., *Investigation of Evolved Paraoxonase-1 Variants for Prevention of Organophosphorous Pesticide Compound Intoxication*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2014. **349**(3): p. 549-558.

190. Gasparian, M.E., et al., *Heterogeneous catalysis on the phage surface: Display of active human enteropeptidase*. *Biochimie*, 2013. **95**(11): p. 2076-2081.
191. Ralph, E.C., et al., *His-tag truncated butyrylcholinesterase as a useful construct for in vitro characterization of wild-type and variant butyrylcholinesterases*. *Protein Expression and Purification*, 2011. **80**(1): p. 22-27.
192. Kitz, R. and I.B. Wilson, *Esters of Methanesulfonic Acid as Irreversible Inhibitors of Acetylcholinesterase*. *Journal of Biological Chemistry*, 1962. **237**(10): p. 3245-3249.
193. Kitz, R. and I.B. Wilson, *Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase*. *J Biol Chem*, 1962. **237**: p. 3245-9.
194. Hixson, C.S. and E.G. Krebs, *Affinity labeling of catalytic subunit of bovine heart muscle cyclic AMP-dependent protein kinase by 5'-p-fluorosulfonylbenzoyladenosine*. *J Biol Chem*, 1979. **254**(16): p. 7509-14.
195. Pocker, Y. and N. Janjic, *Enzyme kinetics in solvents of increased viscosity. Dynamic aspects of carbonic anhydrase catalysis*. *Biochemistry*, 1987. **26**(9): p. 2597-606.
196. Smirnov, I., et al., *Reactibodies generated by kinetic selection couple chemical reactivity with favorable protein dynamics*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(38): p. 15954-9.
197. Kabsch, W., *Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2010. **66**(Pt 2): p. 133-44.
198. Evans, P., *Scaling and assessment of data quality*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2006. **62**(Pt 1): p. 72-82.
199. Karplus, P.A. and K. Diederichs, *Linking crystallographic model and data quality*. *Science*, 2012. **336**(6084): p. 1030-3.
200. Tawfik, D.S., et al., *Unexpectedly high occurrence of catalytic antibodies in MRL/lpr and SJL mice immunized with a transition-state analog: is there a linkage to autoimmunity?* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(6): p. 2145-9.
201. Mazutis, L., et al., *Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics*. *Nat. Protocols*, 2013. **8**(5): p. 870-891.
202. Duan, Y., et al., *A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations*. *J Comput Chem*, 2003. **24**(16): p. 1999-2012.
203. Rezac, J. and P. Hobza, *Advanced Corrections of Hydrogen Bonding and Dispersion for Semi-empirical Quantum Mechanical Methods*. *J. Chem. Theory Comput.*, 2011. **8**(1): p. 141-51.
204. Jorgensen, W.L., et al., *Comparison of simple potential functions for simulating liquid water*. *J. Chem. Phys.*, 1983. **79**(2): p. 926-35.

205. Bekker, H., et al., *Gromacs: A parallel computer for molecular dynamics simulations*. Physics Computing' 92, 1993.
206. Stewart, J.J.P., *MOPAC2012*. Stewart Computational Chemistry, 2008.
207. Laio, A. and M. Parrinello, *Escaping free-energy minima*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 12562-6.
208. Bonomia, M., et al., *PLUMED: A portable plugin for free-energy calculations with molecular dynamics*. Computer Physics Communications, 2009. **180**(10): p. 1961-72.
209. Tribello, G.A., et al., *PLUMED 2: New feathers for an old bird*. Computer Physics Communications, 2014. **185**(2): p. 604-613.
210. Dupradeau, F.Y., et al., *The R.E.D. tools: advances in RESP and ESP charge derivation and force field library building*. Phys Chem Chem Phys, 2010. **12**(28): p. 7821-39.
211. Sousa da Silva, A.W. and W.F. Vranken, *ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface*. BMC Research Notes 2012. **5**.
212. Lindorff-Larsen, K., et al., *Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field*. Proteins, 2010. **78**(8): p. 1950-8.
213. Bussi, G., D. Donadio, and M. Parrinello, *Canonical sampling through velocity rescaling*. J Chem Phys, 2007. **126**(1): p. 014101.
214. Poignard, P., et al., *gp120: Biologic aspects of structural features*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 253-74.
215. Burton, D.R., *A vaccine for HIV type 1: the antibody perspective*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(19): p. 10018-23.
216. Burton, D.R. and P.W. Parren, *Vaccines and the induction of functional antibodies: time to look beyond the molecules of natural infection?* Nat Med, 2000. **6**(2): p. 123-5.
217. Tang, H., K.L. Kuhen, and F. Wong-Staal, *Lentivirus replication and regulation*. Annu Rev Genet, 1999. **33**: p. 133-70.
218. Blankson, J.N., D. Persaud, and R.F. Siliciano, *The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection*. Annu Rev Med, 2002. **53**: p. 557-93.
219. Pollard, S.R., et al., *CD4-binding regions of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 defined by proteolytic digestion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11320-4.
220. Moore, J.P. and D.D. Ho, *Antibodies to discontinuous or conformationally sensitive epitopes on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 are highly prevalent in sera of infected humans*. J Virol, 1993. **67**(2): p. 863-75.
221. Trkola, A., et al., *Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies*. Nat Med, 2005. **11**(6): p. 615-22.

222. Sakai, K., et al., *Characterization of a major encephalitogenic T cell epitope in SJL/J mice with synthetic oligopeptides of myelin basic protein*. J Neuroimmunol, 1988. **19**(1-2): p. 21-32.
223. Tan, L.J., M.K. Kennedy, and S.D. Miller, *Regulation of the effector stages of experimental autoimmune encephalomyelitis via neuroantigen-specific tolerance induction. II. Fine specificity of effector T cell inhibition*. J Immunol, 1992. **148**(9): p. 2748-55.
224. Durova, O.M., et al., *Strategies for induction of catalytic antibodies toward HIV-1 glycoprotein gp120 in autoimmune prone mice*. Mol Immunol, 2009. **47**(1): p. 87-95.
225. Qiao, C., et al., *Enhanced non-inflammasome mediated immune responses by mannoseylated zwitterionic-based cationic liposomes for HIV DNA vaccines*. Biomaterials, 2016. **85**: p. 1-17.
226. Tramontano, A., et al., *Inhibition and labeling of enzymes and abzymes by phosphonate diesters*. Appl Biochem Biotechnol, 2000. **83**(1-3): p. 233-42; discussion 242-3, 297-313.
227. Veenhuis, M., J.P. Van Dijken, and W. Harder, *The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts*. Adv Microb Physiol, 1983. **24**: p. 1-82.
228. Cregg, J.M., T.S. Vedvick, and W.C. Raschke, *Recent advances in the expression of foreign genes in Pichia pastoris*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(8): p. 905-10.
229. Zakharov, A.V., et al., *[Expression of the catalytic antibodies in eukaryotic systems]*. Mol Biol (Mosk), 2011. **45**(1): p. 86-95.
230. Weikl, T.R. and C. von Deuster, *Selected-fit versus induced-fit protein binding: kinetic differences and mutational analysis*. Proteins, 2009. **75**(1): p. 104-10.
231. Foote, J. and C. Milstein, *Conformational isomerism and the diversity of antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10370-4.
232. Hammes, G.G., Y.C. Chang, and T.G. Oas, *Conformational selection or induced fit: a flux description of reaction mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(33): p. 13737-41.
233. Laio, A. and F.L. Gervasio, *Metadynamics: A method to simulate rare events and reconstruct the free energy in biophysics, chemistry and material science*. Reports on Progress in Physics, 2008. **71**(12).
234. Worek, F., et al., *Diagnostic aspects of organophosphate poisoning*. Toxicology, 2005. **214**(3): p. 182-189.
235. Chan, H.Y., et al., *Comparison of IRES and F2A-Based Locus-Specific Multicistronic Expression in Stable Mouse Lines*. PLoS One., 2011. **6**(12): p. e28885.
236. Girod, P.A., et al., *Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells*. Nat. Methods., 2007. **4**(9): p. 747-53.

237. Terekhov, S.S., et al., *Chemical Polysialylation and In Vivo Tetramerization Improve Pharmacokinetic Characteristics of Recombinant Human Butyrylcholinesterase-Based Bioscavengers*. *Acta Naturae*, 2015. **7**(4): p. 136-41.
238. Li, B., et al., *Butyrylcholinesterase, paraoxonase, and albumin esterase, but not carboxylesterase, are present in human plasma*. *Biochem. Pharmacol.*, 2005. **70**(11): p. 1673-84.
239. Garrett, T.L., et al., *A murine model for sarin exposure using the carboxylesterase inhibitor CBDP*. *Neurotoxicology*, 2010. **31**(5): p. 502-8.