

АННОТАЦИЯ ПО ПРОЕКТУ

Государственный контракт № 14.740.11.0112 от 08 сентября 2010 г.

Тема: «Создание новых биокатализаторов методами комбинаторной химии и биологии»

Исполнитель: Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

Ключевые слова: каталитические антитела, ингибиторы, фосфорорганические соединения, ферментативные субстраты.

1. Цель проекта

1. В мире по сей день нерешенной остается проблема создания антител к отравляющим веществам, способных действовать эффективно в организме млекопитающих. Весьма привлекательной целью является создание антитела, способного нейтрализовать отравляющие вещества непосредственно в кровотоке. В связи с этим разработка новых технологий получения иммуноглобулинов с каталитическими свойствами, как антител к отравляющим веществам, носит принципиальный характер.

2. Целью данного проекта является разработка принципов создания биокатализаторов *de novo* и направленное изменение их специфичности в приложении к медицине и сельскому хозяйству. Разработка методов получения искусственных каталитических антител (абзимов) с заданной субстратной специфичностью, в том числе способных осуществлять биокаталитические превращения, для которых нет соответствующих природных аналогов, имеет важное фундаментальное и прикладное значение. Низкая иммуногенность и высокая стабильность антител в кровотоке открывает широкие перспективы использования абзимов в качестве лекарственных средств. Поиск эффективного антитела, способного нейтрализовать фосфорорганические токсины (ФОТ), остается актуальной проблемой биохимии и биотехнологии. В настоящее время рекомбинантные антитела широко применяются как терапевтические агенты и имеют ряд преимуществ перед ферментами в качестве лекарственных средств. Потенциальный антитело-антитоксин на основе каталитического антитела (абзима) может сочетать в себе свойство фермента, способность эффективно осуществлять катализ с низкой иммуногенностью, продолжительным периодом циркуляции в кровотоке и действенными механизмами выведения из организма в составе комплекса антиген-антитело, характерными для молекул иммуноглобулинов. В связи с этим создание «каталитической» вакцины – каталитического антитела, способного нейтрализовать ФОТ, весьма актуально.

Выполнение НИР должно обеспечивать достижение научных результатов мирового уровня, подготовку и закрепление в сфере науки и образования научных и научно-педагогических кадров, формирование эффективных и жизнеспособных научных коллективов.

2. Основные результаты проекта (этапа проекта)

1. В ходе выполнения проекта была синтезирована представительная библиотека соединений, представляющих собой прототипы аналогов переходных состояний реакций гидролиза сложноэфирных и пептидных связей. Представлено около двухсот соединений и их функционально активных конъюгатов. Проверена их способность действовать в качестве механизм-зависимых ингибиторов эстераз и протеаз. Затем была получена высокорепрезентативная фаг-дисплейная библиотека иммуноглобулинов человека с представительностью $1,2 \times 10^9$ индивидуальных клонов, что является отличным показателем. Была отработана методика скрининга библиотеки антител с помощью синтезированных в лаборатории соединений методом фагового дисплея. Было отобрано антитело-антитоксин, способное взаимодействовать с рядом фосфорорганических токсинов и нейтрализовать их. Была разработана система экспрессии в виде клонов трансфектом, стабильно продуцирующих иммуноглобулины человека, была проведена оптимизация условий экспрессии клонов в виде полноразмерных антител в эукариотических системах.

Затем была оптимизирована технология выделения антител и проведена проверка антител на наличие эстеразной, амидазной, протеолитической типов активности, а также на взаимодействие с ингибиторами. Был проведен скрининг фаг-дисплейной библиотеки и отобрано 8 ковалентно-связывающих фосфонат и 7 нековалентно связывающих клонов. Для всех ковалентно-связывающих клонов были проведены кинетические исследования. На основе анализа данных кинетики был выделены наиболее реакционно-способные клоны с кинетической эффективностью, сравнимой с аналогичными данными для бутирилхолинэстеразы. Для дальнейшего улучшения констант взаимодействия антитела и токсинов были получены структурные и термодинамические, кинетические и другие физико-химические данные о каталитическом антителе. На основе этих данных было сделано компьютерное предсказание замен, способных улучшить константы взаимодействия и получены мутантные антитела. Физико-химические и каталитические свойства всех полученных мутантных форм были охарактеризованы. На основании сравнения констант связывания выбраны клоны с лучшими характеристиками для дальнейшего направленного улучшения их свойств. Был осуществлен отбор наилучших клонов в качестве новых биокатализаторов, способных превращать ядовитые фосфорорганические соединения в безопасные вещества. Разработанный подход может быть использован для определения субстратной специфичности антител-антидотов, а также дает возможность рационального дизайна с целью улучшения нейтрализующих свойств антител-антидотов.

2. Созданная научная продукция является конкурентной и публикабельной в ведущих научных изданиях.

3. Научные решения являются новыми и представляют собой сочетание методологий, применяемых в ведущих научных группах. Результат основан на известных принципах и положениях, при этом имеет уровень, сопоставимый с передовыми научными школами, и соответствует современным тенденциям развития науки в данной области.

4. В результате проделанной работы было получено антитело-антидот с высокой эффективностью, не имеющее аналогов в мире, а также оригинальная технологическая платформа для рационального дизайна антител, обладающей заданной каталитической активностью

3. Назначение и область применения результатов проекта (этапа проекта)

1. Разработка белковых препаратов для дезинтоксикации ФОТ является перспективным направлением современной токсикологии. На сегодняшний день наиболее многообещающим считается использование бутирилхолинэстеразы человека, параксоназы и сывороточного альбумина человека, а также фосфотриэстераз и оксидаз из различных бактериальных и эукариотических источников. При этом рекомбинантные антитела широко применяются как терапевтические агенты и имеют ряд преимуществ перед ферментами в качестве лекарственных средств. Потенциальный антидот на основе каталитического антитела (абзима) может сочетать в себе свойство фермента способность осуществлять катализ с низкой иммуногенностью, продолжительным периодом циркуляции в кровотоке и действенными механизмами выведения из организма в составе комплекса антиген-антитело, характерными для молекул иммуноглобулинов.

2. Кроме медицинского применения, полученные данные могут быть использованы в университетах, институтах, исследовательских центрах и других научно-исследовательских организациях химико-биологического профиля, занимающихся проблемами получения новых биокатализаторов; а также в биотехнологических подразделениях фармацевтических компаний и фирмах-производителях наукоемкой продукции, основным направлением исследований которых является создание, разработка и внедрение препаратов иммуноглобулинов.

3. Несмотря на то, что каталитическая эффективность абзимов несравнима с аналогичной для эволюционно совершенных биокатализаторов – ферментов, создание

«каталитической» вакцины – каталитического антитела, способного нейтрализовать ФОТ, актуально. Таким образом, ожидается улучшение технико-экономических характеристик и потребительских свойств существующей продукции и услуг.

4. В перспективе, при внедрении полученных результатов, ожидается снижение риска смертности в странах, использующих ФОТ-пестициды в сельском хозяйстве.

5. Коммерциализация результатов проектом не предусмотрена.

6. На основе полученных результатов интеллектуальной деятельности могут быть созданы новые каталитические вакцины против фосфорорганических отравляющих веществ, в частности пестицидов, применяемых в сельском хозяйстве.

4. Достижения молодых исследователей – участников Проекта (этапа проекта)

В проекте принимал участие молодой исследователь Смирнов И.В., к.х.н., ст.н.с.

При его непосредственном участии удалось получить следующие результаты:

получена высокорепрезентативная фаг-дисплейная библиотека иммуноглобулинов человека с представительностью $1,2 \times 10^9$ индивидуальных клонов. Была отработана методика скрининга библиотеки антител с помощью синтезированных в лаборатории соединений методом фагового дисплея. Было отобрано антитело-антидот, способное взаимодействовать с рядом фосфорорганических токсинов и нейтрализовать их. Проведена проверка антител на наличие эстеразной, амидазной, протеолитической типов активности, а также на взаимодействие с ингибиторами. Был проведен скрининг фаг-дисплейной библиотеки и отобрано 8 ковалентно-связывающих фосфонат и 7 нековалентно связывающих клонов. Для всех ковалентно-связывающих клонов были проведены кинетические исследования. Физико-химические и каталитические свойства всех полученных мутантных форм были охарактеризованы. Был осуществлен отбор наилучших клонов в качестве новых биокатализаторов, способных превращать ядовитые фосфорорганические соединения в безопасные вещества,

соответствующие мировому уровню в области биохимии и молекулярной биологии, что позволит использовать полученные результаты в работе лаборатории и продолжить исследования в разработке каталитических вакцин.

В проекте принимала участие молодой исследователь Куркова И.Н., к.б.н., стажер-исследователь. При ее непосредственном участии удалось получить следующие результаты:

разработана система экспрессии в виде клонов трансфектом, стабильно продуцирующих иммуноглобулины человека, была проведена оптимизация условий экспрессии клонов в виде полноразмерных антител в эукариотических системах. Затем была оптимизирована технология выделения антител. Для дальнейшего улучшения констант взаимодействия антитела и токсинов были получены структурные и термодинамические, кинетические и другие физико-химические данные о каталитическом антителе. На основе этих данных было сделано компьютерное предсказание замен, способных улучшить константы взаимодействия и получены мутантные антитела,

соответствующие мировому уровню в области биохимии и молекулярной биологии, что позволит использовать полученные результаты в работе лаборатории и продолжить исследования в разработке каталитических вакцин.

5. Опыт закрепления молодых исследователей – участников Проекта (этапа проекта) в области науки, образования и высоких технологий

За время выполнения проекта в аспирантуру МГУ имени М.В. Ломоносова поступили О.В. Кондрашина, Е.С. Кузина, Е.А. Воротникова, В.Ф. Шарикова, С.С. Терехов и были приняты на работу на постоянную ставку на химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова после окончания аспирантуры Е.М. Смекалова, С.П. Королев и Е.С. Княжанская.

6. Перспективы развития исследований

1) Участие в ФЦП способствовало формированию более тесного партнерства между лабораторией биокатализа ИБХ РАН и кафедрой химии природных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. НОЦ не участвует в 7-й рамочной программе Евросоюза.

2) У участников НОЦ нет информации о проектах НОЦ по аналогичной тематике.

3) У участников НОЦ нет информации о том, сотрудничество с какими странами и исследовательскими центрами может способствовать наибольшей отдаче для развития в России технологий в области исследования, а также для выхода российской продукции на региональные и глобальные рынки.

7. Сведения в табличном формате:

Сведения о результатах интеллектуальной деятельности, полученных в ходе исполнения Государственного контракта (этапа проекта)	Приложение 1 к аннотации
Сведения о публикациях, выпущенных в ходе исполнения Государственного контракта (этапа проекта)	Приложение 2 к аннотации
Сведения о диссертациях, подготовленных в ходе исполнения Государственного контракта (этапа проекта)	Приложение 3 к аннотации
Сведения о выступлениях на конференциях, проведенных в ходе исполнения Государственного контракта (этапа проекта)	Приложение 4 к аннотации
Сведения о внедрении результатов проекта в образовательный процесс, полученных в ходе исполнения Государственного контракта (этапа проекта)	Приложение 5 к аннотации
Сведения об исполнителях Государственного контракта (этапа проекта)	Приложение 6 к аннотации

Руководитель работ по проекту

Чл.-корр. РАН, д.х.н., профессор

_____ А.Г. Габибов

Руководитель организации-исполнителя:

Академик РАН, д.х.н., профессор
декан химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова

_____ В.В.Лунин

_____ 2012 г.

М.П.