

Краткий обобщающий отчет о выполнении этапов ГК № 14.740.11.0112 «СОЗДАНИЕ
НОВЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ МЕТОДАМИ КОМБИНАТОРНОЙ ХИМИИ И
БИОЛОГИИ»

1. Синтез соединений-ингибиторов протеаз, аналогов переходных состояний ферментативных реакции, способных работать в качестве ковалентных эффекторов для широкомасштабного скрининга фаг-дисплейных библиотек генов иммуноглобулинов

Объектом исследования на первом этапе выполнения проекта являлась комбинаторная библиотека соединений, которые потенциально могут служить ингибиторами амидазной и эстеразной активности гидролитических ферментов различных классов.

На отчетном этапе были использованы комбинаторные подходы для синтеза механизм-зависимых активированных соединений, способных как ингибировать ферменты, так и индуцировать каталитическую функцию *de novo*. В качестве основы для получения библиотеки были выбраны те классы соединений, которые, исходя из данных литературного поиска, обладают способностью ингибировать гидролитические ферменты.

Проанализированы литературные данные в области способов индукции каталитической активности *de novo* с использованием низкомолекулярных соединений. Особое внимание обращено на методы синтеза активированных соединений, относящихся к классам фосфорорганических соединений, их конъюгатов с маркерными молекулами и белками-носителями; а также ароматических кислород-содержащих и азотсодержащих гетероциклов, в частности бензофураксанов и бензофуразанов. Опробованы различные методики синтеза активированных соединений, оптимизированы этапы синтеза ингибиторов. Подобраны условия выделения и очистки синтезированных соединений, для достижения степени очистки, достаточной для использования как *in vitro* так и *in vivo*.

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. Показано, что ингибиторы на основе фосфорорганических соединений ингибировали классические сериновые протеазы и эстеразы с эффективностью k_{cat}/K_M от $1\,800 \pm 150$ до $60\,000 \pm 2\,500 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$. Методами иммуноблотинга показана ковалентная модификация сериновых протеаз. В ходе выполнения исследований показано, что для ингибиторов другого класса,

нитробензофураксанов и нитробензофуразанов, IC_{50} составила от $0,4 \pm 0,1$ до 500 ± 100 мкМ. Соединения-ингибиторы различной структуры наработаны в количестве, достаточном для проведения исследований на следующих этапах. Получены все продукты и полупродукты, которые будут в дальнейшем использованы для селекции и анализа биокатализаторов.

Разработаны научно-методические материалы в виде подробных планов для разделов в курсах лекций по теме «Химия белка» и «Химия нуклеиновых кислот».

Проведены патентные исследования по теме «получение новых биокатализаторов на основе антител». В результате проведенного исследования патентной ситуации показано, что на территории Российской Федерации не зарегистрированы заявки, имеющие отношение к данной работе. Технический уровень существующих изобретений указывает на целесообразность поиска новых технологий получения рекомбинантных производных каталитических антител.

2. Конструирование высокорепрезентативных библиотек генов иммуноглобулинов, пригодных для осуществления технологии широкомасштабного скрининга с отбором клонов по интересующим свойствам

Объектом исследования второго этапа проекта являлась высокорепрезентативная библиотека генов иммуноглобулинов, которые потенциально могут проявлять амидазную и эстеразную гидролитическую активность.

Целью работ на втором этапе выполнения проекта было создание фаг-дисплейной библиотеки на основе генов переменных фрагментов иммуноглобулинов человека, рандомизация третьего гиперварибельного участка легкой и тяжелой цепи с помощью ПЦР-мутагенеза, разработка и оптимизация системы скрининга, отбор клонов на способность связывать и/или превращать интересующие соединения, характеристика свойств отобранных иммуноглобулинов с применением платформы современной геномики и протеомики, разработка научно-методических материалов для нового раздела лекций по комбинаторной химии и биологии в рамках курса лекция «Химия белка» и «Химия нуклеиновых кислот» для студентов и аспирантов высших научно-образовательных учреждений, соответствующих современным мировым стандартам, а также подготовка и закрепление в сфере науки и образования научных и научно-педагогических кадров, формирование эффективных и жизнеспособных научных коллективов.

На отчетном этапе были использованы комбинаторные подходы для получения библиотеки генов тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов человека.

Получена высокорепрезентативная фаг-дисплейная библиотека иммуноглобулинов человека. Библиотека состоит из нуклеотидной последовательности, кодирующей последовательно переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина человека, гибкий серин-глициновый линкер и переменный домен легкой цепи иммуноглобулина человека, встроенные в ген рIII фаговой частицы. В свою очередь переменные домены представляют собой гены зародышевых линий иммуноглобулинов человека. Третий гиперпеременный участок каждого антитела искусственно рандомизирован методом ПЦР. Представительность полученной библиотеки составила $1,2 \times 10^9$ индивидуальных клонов, что является отличным показателем. Была отработана методика скрининга библиотеки на ковалентные ингибиторы сериновых протеаз, полученных на предыдущем отчетном этапе. Для отбора был выбран биотинилированный арил-фосфонат, который обладает рядом преимуществ, таких как высокая реакционная способность по отношению к сериновым гидролазам, удовлетворительная растворимость и стабильность в водных растворах. За время работы на этапе 2 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 были выделены наиболее реакционно-способные клоны с кинетической эффективностью равной $2119 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ и $1000 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, что сравнимо с аналогичными данными для бутирилхолинэстеразы. Для всех ковалентно-связывающих клонов были установлены нуклеофильные аминокислотные остатки, участвующие в связывании с молекулой фосфоната методом масс-спектрометрии. Для семи клонов таким остатком является тирозин 33 легкой цепи, и только для одного тирозин 37, также расположенный в легкой цепи антитела.

Разработаны научно-методические материалы для разделов в курсах лекций по теме «Химия белка» и «Химия нуклеиновых кислот». Разработанные научно-методические пособия могут быть использованы в высших учебных заведениях РФ при чтении курсов лекций для студентов и аспирантов по направлениям: «биоорганическая химия», «биотехнология», «молекулярная биология», «медицинская химия», «химия природных соединений», «биохимия», «комбинаторная химия».

3. Разработка научно-методических материалов.

Целью работы третьего этапа проекта являлось создание клонов трансфектом, стабильно продуцирующих иммуноглобулины человека; оптимизация условий экспрессии клонов в виде полноразмерных антител в эукариотических системах; оптимизация

технологии выделения антител; проверка антител на наличие эстеразной, амидазной, протеолитической типов активности, а также на взаимодействие с ингибиторами; разработка научно-методических материалов для специального раздела по рекомбинантным антителам в общий лекционный курс «Иммунология и клеточная биология» и «Нанобиотехнологии в медицине»; разработка научно-методических материалов для практических занятий «Способы экспрессии полноразмерных антител в клетках млекопитающих» студентов и аспирантов высших научно-образовательных учреждений, соответствующих современным мировым стандартам; а также подготовка и закрепление в сфере науки и образования научных и научно-педагогических кадров, формирование эффективных и жизнеспособных научных коллективов.

На отчетном этапе отработаны подходы для экспрессии и очистки иммуноглобулинов. Генетическими конструкциями, полученными на предыдущем этапе, была проведена ко-трансфекция клеточных линий CHO-K1 и NSObcl2. В результате селекции получены 5 стабильно продуцирующих клонов трансфектом. Уровень продукции рекомбинантных антител оценивался методом иммуноферментного анализа по схеме сэндвич. Для каждого клона были подобраны оптимальные условия экспрессии. Для лучшего клона 2B5 из трансфектом клеток линии CHO-K1, концентрация антител в культуральной среде достигает максимума на 8 день и составляет 10 мг/мл. Для лучшего клона 2G3 из трансфектом клеток линии NSO-bcl2 концентрация человеческих антител в культуральной среде достигает 18 мг/мл на 8 день. Разработана система экспрессии антитела А.17 в препаративных количествах. Оптимальной по соотношению «выход целевого белка – затраты» и чистоте финального продукта была признана экспрессия в культуральных флаконах площадью 225 см² на бессывороточной среде Pro-CHO4, с уровнем экспрессии 10 мг антитела с литра для клона 2B5 клеточной линии CHO.

Отработан метод выделения и очистки антител из культуральной среды. Выход целевого белка оценивался иммуноферментным анализом и составил 70%. Чистоту полученного продукта оценивали с использованием денатурирующего электрофореза в ПААГ, чистота достигает 95%. Анализ реакционной способности показал, что переменные фрагменты легких и тяжелых цепей А.17, экспрессированные в составе полноразмерного антитела человека, сохранили способность взаимодействовать с фосфонатом X. При этом эффективность модификации полноразмерного антитела увеличилась более чем в 10 раз по сравнению с одноцепочечным антителом А.17. Методом MALDI масс-спектрометрии установлено, что ковалентная модификация полноразмерного антитела А.17 фосфонатом X происходит по тому же пептидному участку легкой цепи иммуноглобулина, что и в случае одноцепочечного антитела.

Показано, что полноразмерное антитело сохранило способность взаимодействовать с биотинилированным производным фосфоната X и субстратную специфичность по отношению к аналогам ФОТ. В обоих случаях модификация фосфонатом Vt-X ингибируется ДФФ, АЭБСФ и параоксоном, тогда как ингибирование отсутствует в случае экотиофата. Модификация антитела А.17 фосфонатом X ингибируется в присутствии параоксона. Изучено взаимодействие антитела А.17 с параоксоном и показано, что скорость реакции значительно ниже, чем в случае фосфоната X, линейно зависит от количества добавленного абзима и линейно возрастает с увеличением концентрации добавленного гидроксилamina. Это свидетельствует о том, что реакция А.17 с параоксоном является каталитической и проходит через образование ковалентного интермедиата, причем стадия дефосфорилирования является скоростью-лимитирующей для всего процесса. Присутствие ковалентного интермедиата, доказывающее, что гидролиз параоксона антителом проходит по механизму ковалентного катализа, подтверждено методом масс-спектрометрии.

Разработаны научно-методические материалы для специального раздела по рекомбинантным антителам в общий лекционный курс «Иммунология и клеточная биология» и «Нанобиотехнологии в медицине»; и научно-методические материалы для практических занятий «Способы экспрессии полноразмерных антител в клетках млекопитающих».

Полученные данные, а именно трансфектомы, стабильно продуцирующие иммуноглобулины человека, условия экспрессии антител в эукариотических системах, и технология выделения иммуноглобулинов человека, 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, наработка и внедрение препаратов иммуноглобулинов. Разработанные научно-методические пособия могут быть использованы в высших учебных заведениях РФ при чтении курсов лекций для студентов и аспирантов по направлениям: «биоорганическая химия», «биотехнология», «молекулярная биология», «медицинская химия», «химия природных соединений», «биохимия», «иммунология».

4. Исследование физико-химических свойств полученных новых биокатализаторов

Целью работы четвертого этапа выполнения проекта являлось структурно-функциональное исследование иммуноглобулинов человека, обладающих эстеразной, амидазной, и протеолитической типами активности; разработка программы внедрения в образовательный процесс нового раздела лекций в рамках курса «Физико-химические методы исследования белков и нуклеиновых кислот», базирующихся на результатах, полученных на данном этапе для студентов и аспирантов высших научно-образовательных учреждений, соответствующих современным мировым стандартам; а также подготовка и закрепление в сфере науки и образования научных и научно-педагогических кадров, формирование эффективных и жизнеспособных научных коллективов.

На отчетном этапе изучены физико-химические свойства полученных новых иммуноглобулинов-биокатализаторов методами рентгено-структурного анализа, поверхностного плазмонного резонанса и микрокалориметрии.

Исследование физико-химических свойств новых биокатализаторов методами рентгеноструктурного анализа, позволили определить главные структурные особенности антигенсвязывающего центра антитела A.17, среди них нетипичный для каталитических антител глубокий активный центр (15 Å), карман антигенсвязывающего центра пространственно разделен на две камеры, на дне нижней из которых расположен реакционный аминокислотный остаток Туг-L37. Его повышенная нуклеофильность согласуется с изолированным от растворителя положением, петля CDR3 тяжелой цепи, образующая стенку антигенсвязывающего кармана, представляет собой разупорядоченную, подвижную структуру, положение которой фиксируется после фосфорилирования, архитектура активного центра обеспечивает стереоспецифичность Fab A.17 по отношению P(R) энантиомеру фосфоната X, ковалентная модификация фосфонатом X сопровождается значительными структурными перестановками.

Согласно данным микрокалориметрии реакция модификации антитела A.17 фосфонатом X является термодинамически выгодной. Полученные значения термодинамических параметров сопоставимы с соответствующими значениями, полученными методом ИТС для связывания других антител с гаптенами. Кроме того, порядок величин совпадает с кинетически рассчитанными значениями. Снижение температуры измерения от 37 до 10°C приводит к уменьшению величины ΔH реакции модификации A.17 фосфонатом X в три раза. По изменению теплоемкости удалось рассчитать изменение площади белковой поверхности, полученное значение находится в

пределах (175 – 260) Å² и совпадает с величиной, рассчитанной по кристаллической структуре (240 Å²). В отличие от абзима дикого типа, изменение энтальпии при взаимодействии полностью неактивного мутанта A.17Y-L37F с фосфонатом X не зависит от температуры. Близкое к нулю значение ΔC_p для реакции модификации мутантного абзима свидетельствует о несущественных изменениях площади поверхности антитела, доступной растворителю, что полностью согласуется с данными об отсутствии ковалентного взаимодействия A.17Y-L37F с фосфонатом X.

Анализ результатов компьютерной симуляции показал, что замена остатка Ser35 в легкой цепи антитела HabA17 на положительно заряженную аминокислоту (Lys или Arg) может привести к лучшей стабилизации переходного комплекса. Полученное мутантное антитело HabA17 S35R показало существенно более высокое значение эффективности при взаимодействии с параоксоном, что свидетельствует о том, что продемонстрированный подход может быть использован для определения субстратной специфичности антител-антидотов, а также дает возможность рационального дизайна с целью улучшения нейтрализующих свойств антител-антидотов.

Анализ предстационарной кинетики взаимодействия A.17 с фосфонатом X наряду с данными структурного анализа и изучением термодинамики процесса указывает на реализацию антителом механизма индуцированного соответствия. Тем не менее, полученные результаты не исключают возможности осуществления модификации абзима по альтернативному пути взаимодействия.

Пример каталитического антитела A.17 раскрывает альтернативный способ решения проблемы реорганизации белковой структуры для выполнения каталитической функции. Уникальные свойства примитивного активного центра антитела A.17, способного к катализу, являются моделью сочетания белковой динамики и реактивности. Сама по себе иммуноглобулиновая структура абзима накладывает строгие границы подвижности его структуры. Однако принцип получения искусственного фермента может быть приложен сходным образом к любой другой белковой матрице. Хотя, проведение прямых экспериментов на животных *in vivo* с данным абзимом в условиях острого отравления нецелесообразно, положительные данные по доклиническим испытаниям и литературные данные по фармакодинамике предполагают использование препарата для терапии хронических отравлений ФОТ.

Базируясь на результатах, полученных на данном этапе, разработана программа внедрения в образовательный процесс нового раздела лекций в рамках курса «Физико-химические методы исследования белков и нуклеиновых кислот».

Полученные данные, а именно принципы получения искусственного фермента на базе иммуноглобулиновой матрицы, 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, наработка и внедрение препаратов иммуноглобулинов. Разработанные научно-методические пособия могут быть использованы в высших учебных заведениях РФ при чтении курсов лекций для студентов и аспирантов по направлениям: «биоорганическая химия», «биотехнология», «молекулярная биология», «медицинская химия», «химия природных соединений», «биохимия», «иммунология».

5. Рациональный дизайн иммуноглобулинов для улучшения каталитических свойств с характеристикой полученных мутантов

На данном этапе был осуществлен дизайн наработаны мутантные антитела в количествах, достаточных для кристаллизации и проведения физико-химических исследований.

Сравнение кристаллических структур интактного и модифицированного антител HabA.17 показало, что основные изменения происходят в пространственном расположении петли третьего гипервариабельного участка тяжелой цепи. Мутантные формы антитела HabA.17 с заменами в районе петли третьего гипервариабельного участка тяжелой цепи были созданы методом достройки двух перекрывающихся последовательностей ДНК, полученных методом ПЦР с использованием последовательности HabA17 дикого типа в качестве матрицы. Выход целевого белка варьировался в пределах 60-70%, чистота препаратов мутантных полноразмерных антител составляла 95%. Основываясь на данных, полученных в результате структурного анализа, был проведен рациональный дизайн вариантов мутагенеза абзима с целью детализации особенностей его каталитического механизма. Была проведена замена на аланин аминокислотных остатков петли CDR3 тяжелой цепи His-H104 и Asn-H105, участвующих в формировании H-связи с азотом тропинольного кольца. Также был осуществлен мутагенез 33 и 37 тирозинов легкой цепи антитела с заменой на фенилаланин. Позиции для замены были определены аминокислотными остатками, модифицирующимися фосфонатом X в реакционных клонах (Y-L33 – во всех клонах, кроме A.17, Y-L37 в клоне

A.17), отобранных из библиотеки scFv. Мутантные варианты легких цепей **A.17** были переклонированы в виде полноразмерных легких и тяжелых цепей для экспрессии в эукариотической системе. Показано, что параоксон связывается с активным центром антитела намного лучше, чем продукт его гидролиза, что может являться объяснением каталитической активности антитела HabA17 по отношению к параоксону. Таким образом, использование молекулярно-динамических методов расчета позволило создать рабочую систему определения эффективности нейтрализации тех или иных ФОТ выбранным антителом. В итоге, используя такой алгоритм действия, можно добиться направленного улучшения антитела-антидота к выбранному фосфорорганическому токсину. За время работы по проекту было получено антитело-антидот HabA17, способное взаимодействовать с рядом фосфорорганических токсинов и, более того, гидролизовать один из них – параоксон. Для данного антитела был получен кристалл и разрешена его трехмерная структура. Для определения того, какие факторы влияют на ковалентное присоединения субстрата ФОТ и какие определяют его гидролитическое расщепление, а также основываясь на данных рентгеноструктурного анализа, была проведена компьютерная симуляция присоединения субстрата ФОТ к антителу и предполагаемого продукта гидролиза ФОТ. Расчет общей энергии взаимодействия является критерием стабильности ковалентного интермедиата. В качестве субстратов были выбраны полностью охарактеризованные ФОТ – арил-фосфонат (OPX) и параоксон (PRX). Анализ результатов компьютерной симуляции показал, что замена остатка Ser35 в легкой цепи антитела HabA17 на положительно заряженную аминокислоту (Lys или Arg) может привести к стабилизации переходного комплекса. Полученное мутантное антитело HabA17 S35R показало существенно более высокое значение эффективности при взаимодействии с параоксином. Были охарактеризованы физико-химические и каталитические свойства всех полученных мутантных форм. 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.

Разработаны программа внедрения в образовательный процесс следующих лекционных разделов: «Комбинаторная химия пептидов» (4 часа), «Применение приемов комбинаторной химии в области химии нуклеиновых кислот» (6 часов), «Рекомбинантные антитела» (4 часа), «Нанотехнологии в медицине» (10 часов), «Современные методы

исследования белков» (2 часа); а также практические занятия «Способы экспрессии полноразмерных антител в клетках млекопитающих» (12 часов).