

## BIOENGINEERING ASPECTS OF CREATING CATALYTIC ANTIBODIES

I. Lych, Yu. Doroshko, O. Borodina, V. Shulzhenko

*National University of Food Technologies*

---

**Key words:**

*Abzymology  
Bioengineering  
Biocatalysis  
Anti-idiotypic network  
ADEPT concept*

**Article history:**

Received 16.11.2016  
Received in revised form  
01.12.2016  
Accepted 20.12.2016

**Corresponding author:**

I. Lych  
**E-mail:**  
npuht@ukr.net

---

**ABSTRACT**

The research of antibodies with catalytic activity is one of the modern and rapidly emerging trends in the immunology and biotechnology. Catalytic antibodies (also known as “abzymes”) are the new type of biocatalysts which belong to the immunoglobulin superfamily and have the residues of amino acid involved in catalytic reactions in the hypervariable areas responsible for antigen binding. The early scientific studies to obtain such antibodies began in the late 1980's. An impulse for the implementation of the researches was, on the one hand, an accumulation of necessary scientific knowledge about the molecular mechanisms of interactions of antibodies with antigens and the structure of transition states, and on the other — the development of hybrid technology for monoclonal antibodies with catalytic properties. After the creation of such biocatalysts, the scientific progress has not stopped and now the scientists have developed several advanced strategies based on biological and chemical approaches, which are the prerequisites for creating new types of catalytic antibodies.

---

## БІОІНЖЕНЕРНІ АСПЕКТИ СТВОРЕННЯ КАТАЛІТИЧНИХ АНТИТІЛ

І.В. Лич, Ю.М. Дорошко, О.О. Бородіна, В.С. Шульженко

*Національний університет харчових технологій*

*Вивчення антитіл, які володіють каталітичною активністю, є одним із сучасних напрямків у галузі імунології та біотехнології. Каталітичні антитіла (абзими) — це новий тип біокаталізаторів, які належать до суперродини імуноглобулінів і мають у складі своїх гіперваріабельних ділянок, відповідальних за зв'язування антигену, амінокислотні залишки, які беруть участь у каталітичних реакціях. Перші наукові дослідження з отримання таких антитіл були розпочаті в кінці 80-х років ХХ століття. Поштовхом для реалізації наукових досліджень стало накопичення необхідних наукових знань про молекулярні механізми взаємодії антитіл з антигенами та структуру перехідних станів, а також розроблення гібридної технології отримання моноклональних антитіл із каталітичними властивостями. Після створення таких біокаталізаторів вченими розроблено декілька сучасних стратегій, що*

базуються на біологічних і хімічних підходах, які є обов'язковою умовою для створення нових типів каталітичних антитіл.

**Ключові слова:** абзимологія, біоінженерія, біокаталіз, антиідіотипова мережа, ADEPT стратегія.

**Постановка проблеми.** На сьогодні злоякісні новоутворення — це одна із наймасштабніших проблем людства. Окрім цього, існує ще одна проблема, яка залишається невирішеною — це боротьба з інфекційними захворюваннями, що викликані штамми, стійкими до антибіотиків. Дослідження, присвячені вивченню каталітичних антитіл, пов'язані з перспективністю їх використання в медичній практиці. Розробка наукової бази вдосконалення каталітичних антитіл для використання проводиться досить інтенсивно в складі потужних наукових центрів, які об'єднують хіміків, імунологів і біотехнологів.

Каталітичні антитіла (абзими) представляють інтерес з точки зору механізму їх виникнення і ролі у функціонуванні імунної системи організму, а також як потенційні терапевтичні агенти. Відомо, що абзими здатні каталізувати такі хімічні реакції, для яких не існує природних ферментів.

Існує декілька різних підходів до пошуку каталітичних антитіл. Найбільш вивченими абзимами є штучні біокаталізатори, які синтезуються шляхом імунізації стабільними аналогами перехідних станів реакцій [1]. Сфера їх застосування включає різноманітні реакції органічного синтезу й обмежується рівнем енергетичного бар'єру прискореної реакції. Низька імуногенність і висока стабільність антитіл у кровотоці дає змогу використовувати абзими для руйнування психоактивних речовин і активації попередників протипухлинних лікарських засобів *in vivo*.

Структурно-функціональний аналіз штучних біокаталізаторів на основі антитіл може забезпечити шляхи пізнання «еволюційно досконалого» біокаталізатора. Конструювання на їх основі «каталітичних вакцин», здатних цілеспрямовано руйнувати білки, які відповідальні за розвиток конкретних патологій, могло б стати одним із підходів до отримання «ліків майбутнього». Також розширюється використання абзимного каталізу в біотехнологічних процесах. Каталітичні антитіла вже визначаються як «новий молекулярний інструмент» для вивчення ревматологічних і кардіологічних захворювань, хвороб ендокринної системи, аутоімунних захворювань ЦНС, сепсису, ВІЛ-інфекцій, інших інфекційних патологій [2].

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Пошуком і створенням каталітичних антитіл з абсолютно новими властивостями для боротьби з інфекційними агентами та пухлинами займаються такі вітчизняні та зарубіжні вчені: Ю.Я. Кіт, Р.С. Стойка, Р.С. Генералов, А.Г. Габілов, В.Н. Raouia, А.Е. Warrington, J.B. Treweek, K.D. Janda, R.K. Goswami, Z.Z. Huang, J.S. Forsyth, C.F. Barbas, R.A. Lerner, S.C. Sinha та інші.

**Мета статті:** дослідити сучасні аспекти створення каталітичних антитіл з основами біоінженерії, які б знайшли своє призначення в медичній практиці.

**Викладення основних результатів дослідження.** Наприкінці 40-х років ХХ ст. Л. Полінг досліджував властивості ферментів та антитіл. У процесі

досліджень вчений з'ясував, що антитіла подібні до ензимів, тобто здатні зв'язуватися з лігандами, а також можуть каталізувати різні хімічні сполуки [1]. На основі цієї концепції виникла ідея одержання каталітичних антитіл шляхом імунізації тварин іммобілізованими на носії гаптенами. Одержані антитіла отримали назви абзими, вони здатні були прискорювати в 1000 разів гідроліз складних ефірів. У результаті спільних імунологічних, біохімічних і біотехнологічних досліджень виникла нова галузь — абзимологія.

Протягом тривалого часу молекули імуноглобулінів вважалися нездатними до каталізу. Тільки в середині 80-х років ХХ ст. була достовірно доведена каталітична активність антитіл і вивчені перші абзимні реакції. Однак на те, що антитіла мають здатність до каталізу, вказує сама структура даних молекул. Як відомо, імуноглобуліни мають складну будову з великою кількістю доменів (включаючи варіабельні), які містять значну кількість потенційних каталітичних груп. Надалі вдалося продемонструвати, що механізми ферментативного й абзимного каталізу загалом подібні. Вважається, що найбільш часто ферментативна реакція відбувається за механізмом стабілізації перехідного стану субстрату [1]. Фермент утримує цей нестабільний перехідний стан, збільшуючи таким чином ймовірність перетворення субстрату в продукт реакції. Аналогічний механізм був повністю доведений для каталітичних антитіл.

З моменту відкриття цього явища було проведено великий цикл досліджень, присвячених механізму каталітичної дії абзимів, структурі каталітичних антитіл (АТ), методам їх отримання, оцінці кінетичних параметрів абзимних реакцій тощо.

*Сучасні методи синтезу каталітичних антитіл.* Для індукції антитіл із каталітичною активністю проводять імунізацію антигеном — стабільним аналогом перехідного стану будь-якого субстрату [3]. Отримані каталітичні АТ стабілізують перехідний стан субстрату, прискорюючи таким чином його перетворення. Крім того, абзими, фіксуючи антиген (і його перехідний стан), здатні зменшувати ентропію реакції. На сьогодні виявлено два механізми синтезу антитіл: хімічний і біологічний [3].

Для прискорення реакції каталізу абзими використовують енергію зв'язування антигену — це так званий хімічний механізм. Встановлено, що АТ, як і ензими, є конформаційно-активними, а їх взаємодія з антигеном (АГ) може супроводжуватися конформаційними перебудовами, які змінюються залежно від незначних зміщень поліпептидних ланцюгів у варіабельній ділянці Fab-фрагмента до глобальних перебудов у третинній та четв'ятинній структурі всієї молекули імуноглобуліну [1; 3]. При цьому структурна комплементарність АТ—АГ досягається внаслідок конформаційних змін як АТ, так і АГ. Механізм утворення абзимів таким шляхом представлений на рис. 1.

У разі взаємодії АТ з АГ можлива структурна деформація останнього, як і в разі деформації субстрату в ензим-субстратному комплексі, тобто конформаційні перебудови АТ можуть зумовити конформаційні перебудови субстрату і подальше його перетворення на продукти реакції.

Згідно з гіпотезою індукованої відповідності, характерною відмінністю каталітично активних АТ від АТ, нездатних до каталізу, є вища конфор-

маційна лабільність перших, що свідчить про їх поліреактивність [1]. Поліреактивністю АТ називають здатність останніх афінно зв'язуватися більш ніж з одним АГ. Такі АГ істотно відрізняються за будовою, а їхня спорідненість з поліреактивними АТ (поліАТ) визначається певним просторовим розміщенням нуклеофільних та електрофільних груп молекули АГ. Серед поліАТ найдетальніше вивчені АТ, що здатні перехресно взаємодіяти з ДНК, фосфоліпідами та нуклеотидами. Спільною ознакою цих сполук є наявність у структурі молекул фосфодієфірних зв'язків. Імовірно, що просторова будова таких АГ може визначати рівень їхньої спорідненості до поліАТ. Якщо фосфодієфірні зв'язки деяких із цих сполук належать до макроергічних, то можна уявити, що під час взаємодії поліАТ з такими АГ утворюються проміжні макроергічні інтермедіати, здатні в подальшому фосфорилувати (переносити фосфатні групи) АГ із нижчою до них спорідненістю [1].

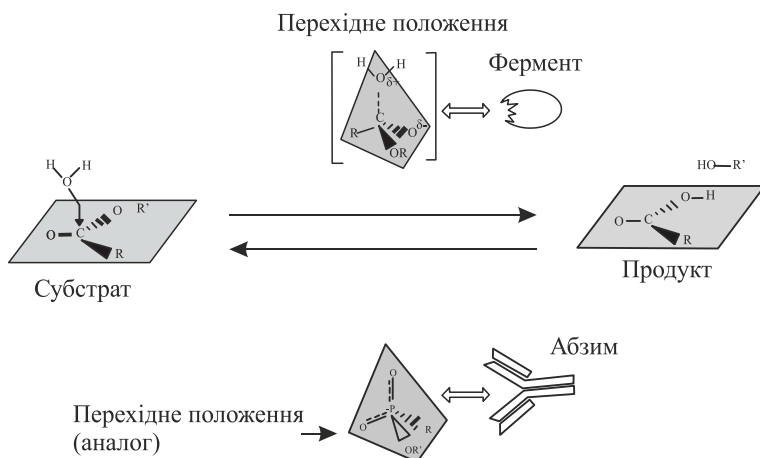


Рис. 1. Хімічний механізм утворення абзимів

Згідно з біологічним методом синтезу антитіл, існує два варіанти утворення абзимів: перший шлях пов'язаний з використанням антидіотипових мереж, інший заснований на використанні білкового інгібітора [3].

Метод з використанням антидіотипових мереж (рис. 2) ґрунтується на концепції «функціональної мімікрії» антигену (рис. 3), яка на сьогодні є найбільш визнаною [1; 3].

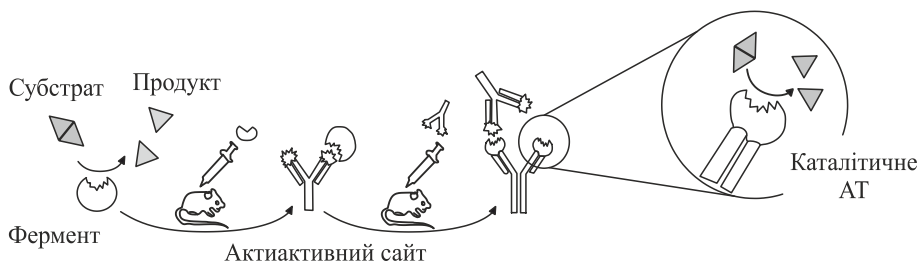


Рис. 2. Схема синтезу абзимів методом використання антидіотипових мереж

Утворення абзимів саме цим методом є альтернативою хімічному механізму.

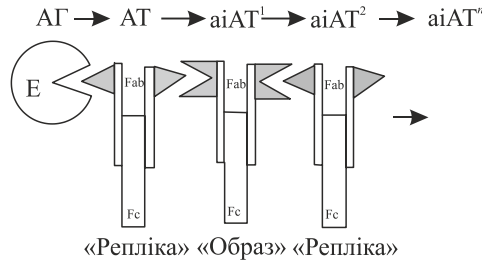


Рис. 3. Схема механізму індукції абзимів шляхом молекулярної мімікрії антигену

**Примітка.** E — ензим, Ab — антитіла до амінокислотних залишків каталітичного центру ензиму; aiAb¹, aiAb² та aiAbⁿ — антиідіотипові антитіла першого, другого і наступних порядків.

Концепція індукції абзимів шляхом функціональної мімікрії антигену є частковим випадком теорії формування антиідіотипових мереж Н. Ерне. Метод ґрунтується на тому, що гіперваріабельна ділянка молекули Ab (паратоп), яка відповідає за зв'язування з комплементарною ділянкою Ag (епітопом), сприймається імунною системою власного організму як чужорідна (є ідіотипом) і на неї виробляються відповідні антиідіотипові Ab (aiAb), які також є антигенними і продукують aiAb до свого ідіотипу (ai-Ab другого порядку). Останні, у свою чергу, є джерелом утворення aiAb наступного порядку [1]. Взаємодії типу Ag—Ab (aiAb)<sup>n</sup> утворюють систему (антиідіотипову мережу Н. Ерне), що регулює гуморальний імунітет у ссавців. За такого принципу формування імунної відповіді, очевидно, первинні Ab є до певної міри «відбитком інформації» (структурною реплікою) будови антигенної детермінанти, тоді як ai-Ab першого порядку (а також 3-го, 5-го тощо) можуть відображати її структуру (копіюють «внутрішній образ» антигенної детермінанти). Якщо антигенною детермінантою виявляється каталітичний центр молекули ензиму, то легко уявити, що антигензв'язувальна ділянка ai-Ab другого порядку може функціонувати подібно до каталітичного центру ензиму. Це означає, що абзими можуть бути антиідіотиповими антитілами, де Ag є ензимом [1].

*Варіант використання білкового інгібітора* базується на використанні білка, який інгібує фермент на конкурентній основі (рис. 4).

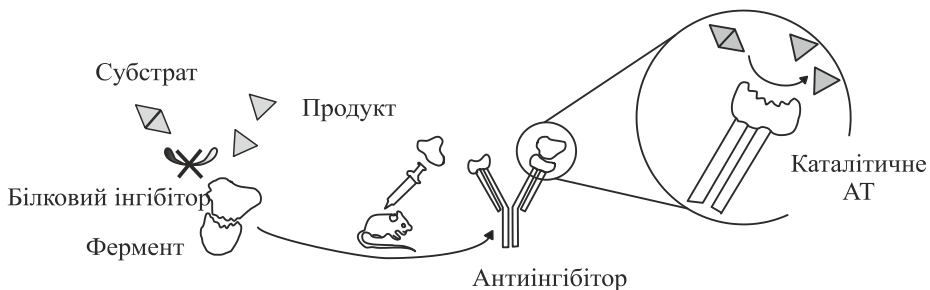


Рис. 4. Схема індукції каталітичних антитіл з використанням білкового інгібітора

Цей білок використовують як імуноген (наприклад, білок *Tendamistat* — інгібітор  $\alpha$ -амілази підшлункової залози свиней) [3; 4]. Дослідниками було встановлено, що створені за цим методом абзими володіють  $\alpha$ -амілазною активністю, а це, у свою чергу, підтверджує можливість імунної системи генерувати природні абзими, і може пояснити виникнення абзимів при різних патологічних захворюваннях, включаючи імунні, метаболічні, інфекційні тощо [4].

*Перспективність використання абзимів у медичній практиці.* Абзімологія як наука, що стрімко розвивається, зайняла провідну нішу в клінічній практиці і стала основою для розроблення нових медичних або хіміотерапевтичних препаратів. На сьогодні особливий інтерес у дослідників, лікарів-експертів і клініцистів викликають перспективи створення на основі абзимів біоінженерних конструкцій з подальшим використанням їх у фундаментальній і практичній медицині.

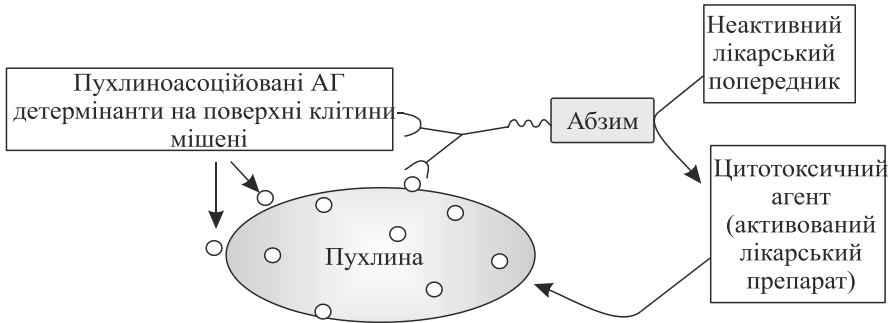
Один із перспективних напрямків пов'язаний зі створенням каталітичних АТ, які здатні зв'язувати і руйнувати наркотичні засоби, циркулюючи в периферичній крові до моменту ініціалізації ними токсичних ефектів на нервову та інші системи й тканини [5].

Групою американських вчених були отримані моноклональні АТ та проведені клінічні випробування препаратів АТ, здатних гідролізувати кокаїн та його ефіри, що запобігає гострому отруєнню кокаїном та дає змогу позбутися залежності від даного препарату [6]. Лікувальний ефект таких АТ був беззаперечно доведений на різних експериментальних і клінічних моделях, тоді як у АТ, позбавлених каталітичних властивостей, подібний ефект був відсутній. Моноклональні АТ, що володіють антикокаїновим каталітичним потенціалом, можуть бути використані як «периферичні блокатори» кокаїну для створення лікарських засобів у терапії за різних форм наркотичної (кокаїнової) залежності [7]. Це пов'язано з тим, що абзімам властива здатність здійснювати фотоокиснення амфітамінів, що дає змогу зменшити гостру інтоксикацію, викликану цими сполуками. Для лікування наркозалежності від марихуани пропонується використовувати АТ, здатні руйнувати психоактивні компоненти цього наркотичного засобу, зокрема тетрагідроканнабінол [8]. Вивчаються можливості використання каталітичних АТ, які здатні руйнувати нікотин. Ці результати підтверджують можливість лікування нікотинової залежності з використанням абзимів *in vivo*.

Перспективним напрямком у медичній практиці є розробка лікарських засобів нового покоління для сайт-спрямованої протипухлинної хіміотерапії в програмах, в яких замість традиційних бактеріальних ферментів-активаторів (ADEPT, *antibody-directed enzyme prodrug therapy*), використовуються абзими, що здійснюють активацію лікарського попередника (ADEPT) у момент його доставки до тканини й органу-мішені (рис. 5)

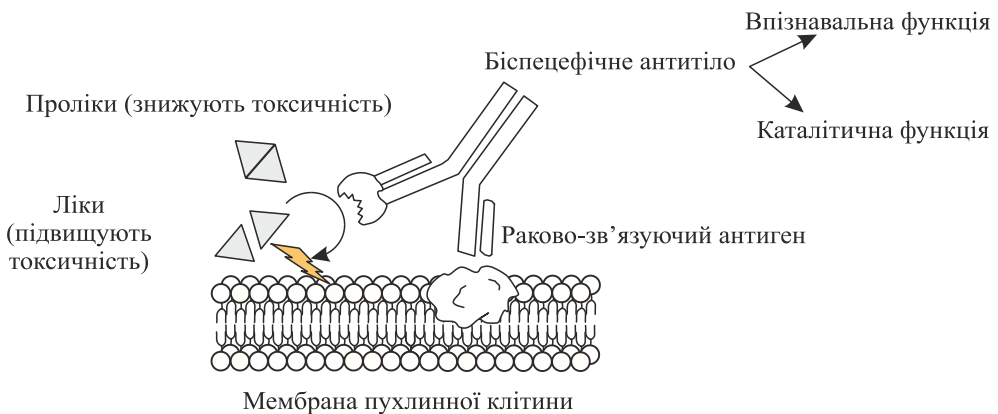
Дана терапія заснована на використанні антитіл, які кон'юговані з ферментами. Це дає змогу поєднати дві важливі функції антитіл — впізнання клітини та функції каталізатора. Даний принцип (ADEPT) заснований на специфічній взаємодії раково-зв'язуючого антигена з антитілом та активації проліків ферментом. Це дає змогу уникнути системної токсичності препарату

та зберігати реакцію в безпосередній близькості до ракових клітин. Використання нелюдських ферментів у терапії людини підвищує ризик імуногенності, що, у свою чергу, обмежує шанси повторного використання терапевтичного білка. У цьому випадку ферменти можуть замінюватися абзимами.



**Рис. 5. Антитілоопосередкована prodrug ензимотерапія**

Гуманізація антитіл шляхом генної інженерії також надає можливість вирішити питання імуногенності. На даний момент у терапії проліків використовуються такі абзими, як 38С2, 33F12, 84G3 та 93F3, але найбільш вивченим є 38С2. Дане антитіло виявляє альдолазну активність і генерується за рахунок реактивної імунізації. Абзим 38С2 активує пролікарську форму протиракових препаратів доксорубіцину і камптотецину. 38С2 має здатність інгібувати ріст первинних і метастатичних пухлин, включаючи саркому Капоші, меланому та рак молочної залози [9]. Антитіла, які використовуються в абзимній терапії проліків, є варіантом ADEPT стратегії, а абзими, які замінюють ферменти у цій терапії, називаються біспецифічними (рис. 6). Але використання біспецифічних абзимів ще не знайшло широкого використання у клінічних випробуваннях [10].



**Рис. 6. Механізм ADEPT стратегії**

Нові фармакоконструкції, що використовують у своєму складі адаптовані для організму людини абзими, забезпечують більш ефективне і раціональне

застосування методів prodrug-терапії у комплексному лікуванні ряду злужківних новоутворень.

### **Висновки**

Отже, перспективним методом для створення штучних абзимів з цілеспрямованою каталітичною активністю слід вважати біоінженерні конструкції. На сьогодні існує дві концепції синтезу каталітичних антитіл — це хімічний метод, заснований на принципі імунізації антигеном стабільним аналогом перехідного стану будь-якого субстрату, та біологічний метод, який, у свою чергу, розгалужується на два напрямки, один з яких пов'язаний з використанням антиідіотипових мереж (ґрунтується на концепції «функціональної мімікрії»), основою іншого є використання білкового інгібітора. Всі вищезазначені підходи слугують основою для створення синтетичних каталітичних антитіл з певною каталітичною активністю та специфічністю, яка цікавить дослідника.

Завдяки своїм унікальним властивостям абзими знайшли широке застосування в клінічній практиці, адже вони можуть бути вироблені для каталізу майже всіх реакцій, які відбуваються у живих системах, а також для створення принципово нових біокаталізаторів, що не мають аналогів. Слід зазначити, що більшість досліджень присвячена синтезу модифікованих каталітичних антитіл із протипухлинними властивостями, які здатні впізнавати опосередковану пухлинну тканину-мішень і вибірково її руйнувати, не пошкоджуючи при цьому здорові клітини організму. На основі таких антитіл створюються препарати терапевтичного або хімотерапевтичного призначення нового покоління з подальшим їх використанням у фундаментальній і практичній медицині.

### **Література**

1. *Kim Ю.Я.* Каталітично активні антитіла (абзими) молока людини / Ю.Я. Кіт, Р.С. Стойка // Укр. біохім. журнал. — 2007. — Т. 79, № 2. — С. 5—16.
2. *Генералов Р.С.* Каталітично активні антитіла (абзими) / Р.С. Генералов // Укр.біохім. журнал. — 2009. — Т. 9, № 12. — С. 16—26.
3. *Severine P.L.* Catalytic antibodies and their applications in biotechnology: state of the art / P.L. Severine, B.N. Raouia // *Biotechnol. Lett.* — 2014. — V. 37, # 20. — P. 69—81.
4. *Warrington A.E.* Autoantibodies with enzymatic properties in human autoimmune diseases / B. Wootla, S. Lacroix-Desmazes, A.E.Warrington, A.J. Bieber, S. Kaveri, M. Rodriguez // *J Autoimmun.* — 2011. — V. 37, # 2. — P. 144—150.
5. *Gabibov A.G.* Recombinant antibodies and recombinant proteins: Prolonged-action drugs / A.G. Gabibov // *Herald of the Russian Academy of Sciences.* — 2016. — Т. 86, # 3. — P. 169—173.
6. *Treweek J.B.* An antidote for acute cocaine toxicity / J.B. Treweek, K.D. Janda // *Mol. Pharm.* — 2012. — V. 9, # 4. — P. 969—978.
7. *Cai X.* Probing active cocaine vaccination performance through catalytic and noncatalytic hapten design / X. Cai, T. Whitfield, M.S. Hixon, Y. Grant, G.F. Koob, K.D. Janda // *J Med Chem* — 2012. — V. 56, # 9. — P. 3701—3709.
8. *Brogan A.P.* Antibody-catalyzed oxidation of delta(9)-tetrahydrocannabinol / A.P. Brogan, L.M. Eubanks, G.F. Koob, T.J. Dickerson, K.D. Janda // *J. Am. Chem. Soc.* — 2007. — V. 129, # 15. — P. 3698—3702.

9. Goswami R.K. Multiple catalytic aldolase antibodies suitable for chemical programming. / R.K. Goswami, Z.Z. Huang, J.S. Forsyth, B. Felding-Habermann, S.C. Sinha // Bioorg Med Chem Lett. — 2009. — V. 19, # 14. — P. 3821—3824/

10. Abraham S. Synthesis of the next-generation therapeutic antibodies that combine cell targeting and antibody-catalyzed activation / S. Abraham, F. Guo, L.S. Li, C. Rader, C. Liu, C.F. Barbas, R.A. Lerner, S.C. Sinha // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2007. — V. 104, # 13 — P. 5584—5589.

## **БИОИНЖЕНЕРНЫЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ**

**И.В. Лыч, Ю.Н. Дорошко, О.О. Бородина, В.С. Шульженко**

*Национальный университет пищевых технологий*

*Изучение антител, которые обладают каталитической активностью, является одним из современных и стремительно развивающихся направлений в области иммунологии и биотехнологии. Каталитические антитела (абзимы) — это новый тип биокатализаторов, которые относятся к классу иммуноглобулинов и имеют в своем составе гипервариабельные участки, ответственные за связывание антигена, а аминокислотные остатки принимают участие в каталитических реакциях. Первые научные исследования по получению таких антител начались в конце 80-х годов XX столетия. Толчком к реализации научных исследований послужило, с одной стороны, накопление необходимых научных знаний о молекулярных механизмах взаимодействия антител с антигенами и структуре переходного состояния, а с другой — разработка гибридомной технологии получения моноклональных антител с каталитическими свойствами. После создания таких биокатализаторов учеными разработано несколько современных стратегий, основанных на биологических и химических подходах, которые являются обязательным условием для создания новых типов каталитических антител.*

**Ключевые слова:** абзимология, биоинженерия, биокатализ, антидиотипическая сеть, ADEPT-стратегия.