

## CATALYTIC ANTIBODIES

N. K. NAGRADOVA

*Theoretical grounds of the preparation of catalytically active antibodies (abzymes) are considered. Similarities and differences between enzyme and antibody molecules in their interaction with specific ligands are presented. Principles of preparation of the abzymes capable of catalyzing different types of reactions are delineated. The perspectives for the use of abzymes in biotechnology and medicine are discussed.*

**Рассмотрены теоретические основы получения антител, обладающих каталитической активностью (абзимов). Охарактеризованы черты сходства и различия между молекулами фермента и антитела в их взаимодействии со специфическими лигандами. Изложены принципы получения абзимов, способных катализировать реакции разных типов. Обсуждаются перспективы использования абзимов в биотехнологии и медицине.**

## КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА

Н. К. НАГРАДОВА

Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова

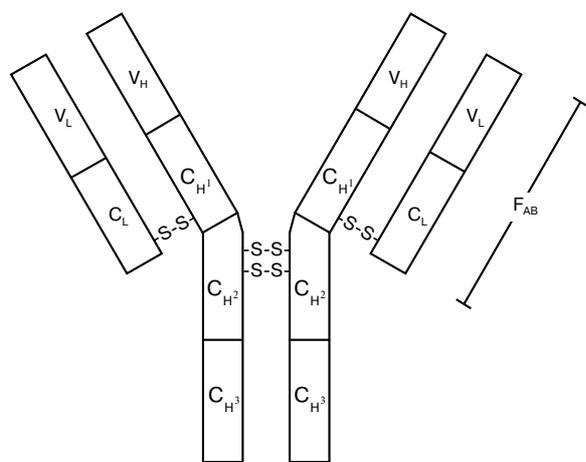
## ВВЕДЕНИЕ

Область физико-химической биологии, связанная с исследованием каталитических антител, то есть антител, способных функционировать как биологические катализаторы, возникла недавно — менее десяти лет назад. И вместе с тем она развивается чрезвычайно бурно, так как представляет собой одно из наиболее перспективных направлений, сочетающее в себе элементы иммунологии, энзимологии, молекулярной биологии, органической химии и генетической инженерии. Оно связано с созданием и изучением катализаторов нового типа, использование которых открывает принципиально новые возможности для работ фундаментального и прикладного характера. Интересно, что теоретические основы этого научного направления были заложены почти полвека назад на основании чисто умозрительных соображений, возникающих при сравнении свойств ферментов и антител. Лайнус Полинг в 1948 году постулировал, что важным различием между этими группами белков является то, что фермент не так строго комплементарен своему специфическому субстрату, как антитело гомологичному антигену. Наиболее прочное связывание реализуется между активным центром фермента и переходным состоянием реакции. Последующее развитие энзимологии подтвердило справедливость этих положений и позволило расшифровать структурные основы функционирования многих ферментов; не менее значительный прогресс был достигнут и в понимании молекулярных механизмов действия антител. С учетом этой информации рассмотрим, что объединяет антитела и ферменты, с одной стороны, и каковы принципиальные различия между ними, с другой.

**ЧЕРТЫ СХОДСТВА И ОТЛИЧИЯ В СТРУКТУРЕ ФЕРМЕНТОВ И АНТИТЕЛ И В ХАРАКТЕРЕ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ЛИГАНДАМИ**

Общим свойством ферментов и антител является то, что это — белки, обладающие характерной пространственной структурой и способностью связывать специфические молекулы (лиганды) — субстрат или антиген. Большая часть ферментов построена из сочетания  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -складок и гибких петель, образующих уникальную трехмерную структуру, строго постоянную для данного белка. Напомним, что  $\alpha$ -спиральная структура полипептидной цепи стабилизируется внутрицепочечными

водородными связями между витками спирали, в каждой из которых содержится 3 аминокислотных остатка. Участки полипептидной цепи, не способные “скручиваться” в  $\alpha$ -спираль, могут приобретать вытянутую зигзагообразную конформацию, получившую название  $\beta$ -структуры. Параллельные отрезки цепи, находящиеся в  $\beta$ -конформации, связываются между собой межцепочечными водородными связями, образуя  $\beta$ -складки. Даже незначительные изменения аминокислотной последовательности (иногда единичные мутации) могут привести к нарушению нативной (то есть функционально активной) конформации молекулы и к изменению (или потере) ее каталитических свойств. Активный центр фермента формируется из аминокислотных остатков, часто удаленных в первичной структуре, но сближенных в пространстве при сворачивании белка в нативную конформацию. Окончательное формирование активного центра происходит в процессе его взаимодействия с участниками реакции (субстратом, кофактором); можно сказать, что активный центр фермента не предсуществует, а образуется в результате специфических конформационных изменений, индуцируемых субстратом. Таким образом, взаимодействие фермента со своим субстратом не может быть уподоблено “замку и ключу”, так как эта модель, предложенная в 1890 году



**Рис. 1.** Схематическое изображение структуры антитела.

Молекула антитела состоит из двух полипептидных цепей (тяжелой и легкой), связанных между собой через остатки цистеина, образующие дисульфидные мостики. N-концевые области обеих цепей ( $V_L$  – легкой цепи,  $V_H$  – тяжелой цепи) сильно различаются по аминокислотной последовательности у антител, синтезируемых разными клетками иммунной системы. Остальные части молекулы ( $C_L$  легкой цепи и  $C_{H^1}$ ,  $C_{H^2}$  и  $C_{H^3}$  тяжелой цепи) имеют аминокислотные последовательности, не различающиеся у антител, синтезируемых разными клетками, и поэтому называются “константными”, или постоянными.  $F_{AB}$  – фрагмент молекулы антитела, способный связывать антиген.

Эмилем Фишером, не учитывает конформационных изменений, сопровождающих катализ и играющих важнейшую роль в его реализации.

В отличие от ферментов антитела (главным образом иммуноглобулина G) построены по единому плану (рис. 1). Молекула антитела состоит из двух тяжелых (55 кДа) и двух легких (25 кДа) полипептидных цепей, связанных дисульфидными мостиками. Пространственная структура иммуноглобулина G представлена  $\beta$ -складками и петлями;  $\alpha$ -спиральные участки отсутствуют. Громадное разнообразие антител, вырабатываемых иммунной системой, объясняется тем, что N-концевые участки обеих цепей (первые 108 аминокислот), так называемые вариабельные области ( $V_H$  и  $V_L$ ), кодируются множеством разных генов. В процессе дифференцировки клетки, продуцирующей антитело, один из множества генов, кодирующих вариабельную область, соединяется с геном, кодирующим “константную” часть молекулы (постоянной структуры). Благодаря бесчисленному количеству возможных комбинаций возникает громадное разнообразие антител, продуцируемых разными клетками. Антиген-связывающий центр формируется при сочетании элементов структуры, принадлежащих вариабельным участкам обеих цепей ( $V_L$  и  $V_H$ ). При этом основной вклад в специфичность взаимодействия антиген–антитело вносят три участка L-цепи и три участка H-цепи, называемые гипервариабельными. В пространственной структуре молекулы они представлены в виде петель, обладающих большой гибкостью и подвижностью.

Принципиально важным является то обстоятельство, что специфическое узнавание антителом своего антигена есть не что иное, как выбор из громадного разнообразия предсуществующих структур той из них, которая способна наиболее прочно связать антиген. Этим и объясняется способность иммунной системы обеспечить связывание чужеродного соединения любой природы. В отличие от активного центра фермента активный центр антитела предсуществует, а не формируется в результате взаимодействия со специфическим лигандом; он, таким образом, комплементарен, то есть оптимально структурно соответствует основному состоянию лиганда и может быть уподоблен “замку” с “ключом”–антигеном. В качестве антигена может выступать как высокомолекулярное соединение, так и молекула малого размера (гаптен), если она присоединяется к носителю – макромолекуле.

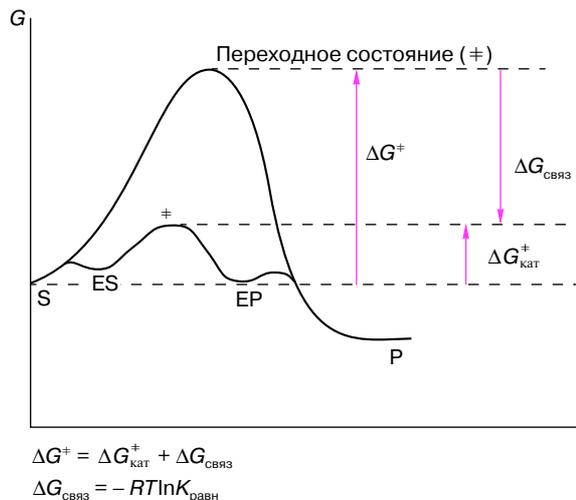
Специфическое взаимодействие антитела со своим лигандом напоминает аналогичное взаимодействие фермента со своим субстратом. Однако, как уже указывалось, отличие функций этих белков (назначение антитела – как можно прочнее связать антиген, чтобы удалить его; назначение фермента – связать субстрат, чтобы обеспечить его дальнейшее превращение в продукт) обуславливает

то обстоятельство, что очень прочное связывание субстрата невыгодно для эффективного катализа. Действительно, главной движущей силой ферментативного катализа является увеличение энергии связывания по мере приближения к переходному состоянию реакции — именно это усиление связывания субстрата и является причиной снижения энергии активации химической реакции, обеспечиваемого ферментом.

Связывание фермента с лигандом, складывающееся из слабых нековалентных взаимодействий (водородные связи, электростатические взаимодействия, вандерваальсовы взаимодействия, гидрофобные связи), сопровождается уменьшением свободной энергии системы, что выражается отрицательной величиной ( $\Delta G_{\text{связ}} = -RT \ln K_{\text{равн}}$ ). Для того чтобы обеспечить превращение субстрата в продукт, требуется затратить энергию, необходимую для ориентации реагирующих групп, образования нестабильных зарядов, перегруппировки связей и др. Это иллюстрируется “холмом” на энергетическом профиле реакции (рис. 2). Участники реакции должны преодолеть этот барьер и оказаться поднятыми на более высокий энергетический уровень, то есть оказаться в переходном состоянии. Энергия, необходимая для достижения переходного состояния, называется энергией активации ( $\Delta G^{\ddagger}$ ). Переходное состояние — это геометрическая и электронная структура, отражающая комбинированное состояние фермента и субстрата, в котором реализуется оптимальная ориентация реагирующих групп и происходит постоянное образование и разрыв связей. Концентрация переходного состояния и его время жизни очень малы; переходное состояние трудно зафиксировать и невозможно выделить.

Скорость реакции зависит от величины энергии активации: чем выше  $\Delta G^{\ddagger}$ , тем ниже скорость. Это понятно, так как скорость реакции пропорциональна концентрации активированного комплекса, которая тем выше, чем ниже энергия активации. Удивительная эффективность ферментов как катализаторов объясняется их способностью снижать энергию активации и смещать равновесие в сторону образования переходного состояния. Достигается это путем очень прочного связывания структуры переходного состояния. Поскольку энергия связывания переходного состояния ( $\Delta G_{\text{связ}} = -RT \ln K_{\text{равн}}$ ) — величина отрицательная, ее возрастание будет снижать энергию активации:  $\Delta G^{\ddagger} = \Delta G_{\text{кат}}^{\ddagger} + (-RT \ln K_{\text{равн}})$ , (см. рис. 2). Увеличение энергии связывания лиганда по мере перехода от субстрата к переходному состоянию — это движущая сила ферментативного катализа.

Иными словами, активный центр фермента комплементарен не исходному субстрату (как предполагает концепция “ключ-замок”), а переходному состоянию. Эта идея, впервые выдвинутая Л. Полингом, была затем развита У. Дженксом, ко-



**Рис. 2.** Энергетический профиль односубстратной реакции.

S — субстрат, ES — фермент-субстратный комплекс, EP — комплекс фермент-продукт, P — продукт. Энергия активации ( $\Delta G^{\ddagger}$ ) складывается из двух составляющих: положительного члена  $\Delta G_{\text{кат}}^{\ddagger}$ , отвечающего энергии активации химических стадий, в ходе которых происходит образование и разрыв связей, и отрицательного члена  $-\Delta G_{\text{связ}}$ , отвечающего энергии связывания переходного состояния.

торый постулировал в 1969 году, что если бы удалось выработать антитело, комплементарное структуре переходного состояния реакции, то оно должно было бы катализировать эту реакцию, ускоряя достижение переходного состояния. Так были заложены теоретические основы получения каталитических антител. Однако потребовалось еще 17 лет, чтобы оказалась возможной экспериментальная проверка справедливости этих представлений.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ВЫРАБОТКИ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ

К 1986 году возникли реальные условия для получения каталитических антител. Это, во-первых, накопление информации, необходимой для понимания молекулярного механизма химических реакций и синтеза аналогов переходного состояния, то есть стабильных соединений, структура которых близка к предполагаемой структуре переходного состояния. Во-вторых, это возможность получать антитела, гомогенные по структуре, то есть являющиеся продуктом одной клетки. В результате ее деления возникает клон клеток, обладающих всеми генетическими особенностями исходной клетки и синтезирующих антитела одинаковой специфичности (моноклональные антитела). Чтобы обеспечить постоянный рост клеток в культуре, используют специальную технику, основанную на слиянии клеток,

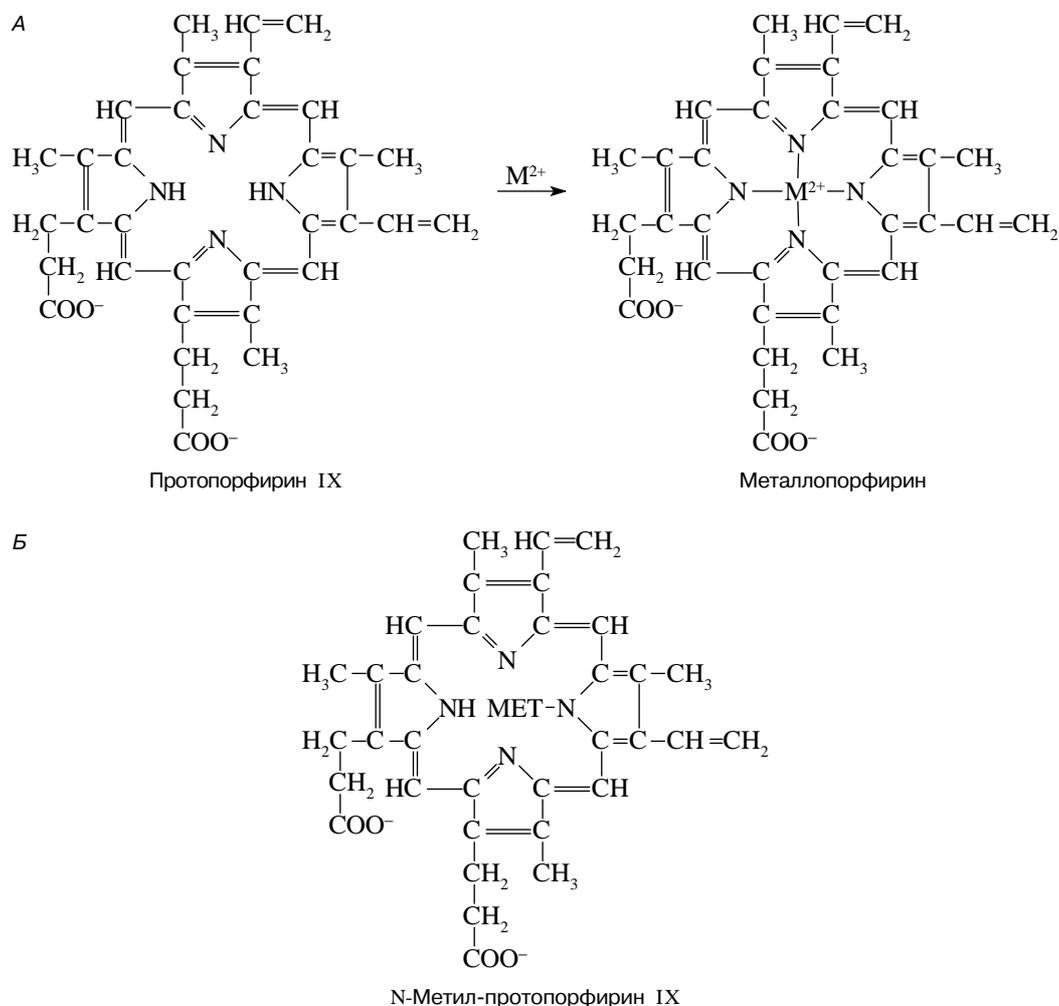
продуцирующих антитела, с клетками миеломы, способными к неконтролируемому делению. Это приводит к образованию клеток гибридомы, устойчиво продуцирующих большие количества гомогенных антител со специфичностью, определяемой исходной клеткой. Последнее обстоятельство очень существенно, так как ответ иммунной системы организма на введение антигена заключается в синтезе громадного разнообразия антител, вырабатываемых разными клетками и различающихся по структуре переменных областей.

Работы по получению каталитических антител были одновременно начаты в нескольких лабораториях; сопутствовавший им успех обеспечил интенсификацию исследований и привел к возникновению нового научного направления, связанного с созданием биологических катализаторов с заранее заданными свойствами. По аналогии с ферментами

такие катализаторы получили название абзимы. К настоящему времени получены десятки абзимов, катализирующих реакции разных типов. Рассмотрим некоторые примеры.

### АБЗИМЫ, КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОТОРЫХ ОСНОВАНА ТОЛЬКО НА СТАБИЛИЗАЦИИ ПЕРЕХОДНОГО СОСТОЯНИЯ РЕАКЦИИ

На рис. 3 изображена схема реакции, катализируемой феррохелатазой – конечным ферментом в цепи реакций биосинтеза гема. Метилированный порфирин (N-метилпротопорфирин), являющийся мощным ингибитором данной реакции, имитирует структуру переходного состояния; он был использован в качестве гаптена для получения каталитических антител. Абзимы, выработанные на данное



**Рис. 3.** Реакция, катализируемая феррохелатазой (А). Включение иона железа ( $M^{2+}$ ) в состав протопорфирина IX с образованием протогема реализуется благодаря некоторому искажению структуры субстрата; предполагается, что переходное состояние реакции близко по своему строению к структуре N-метил-протопорфирина IX (Б).

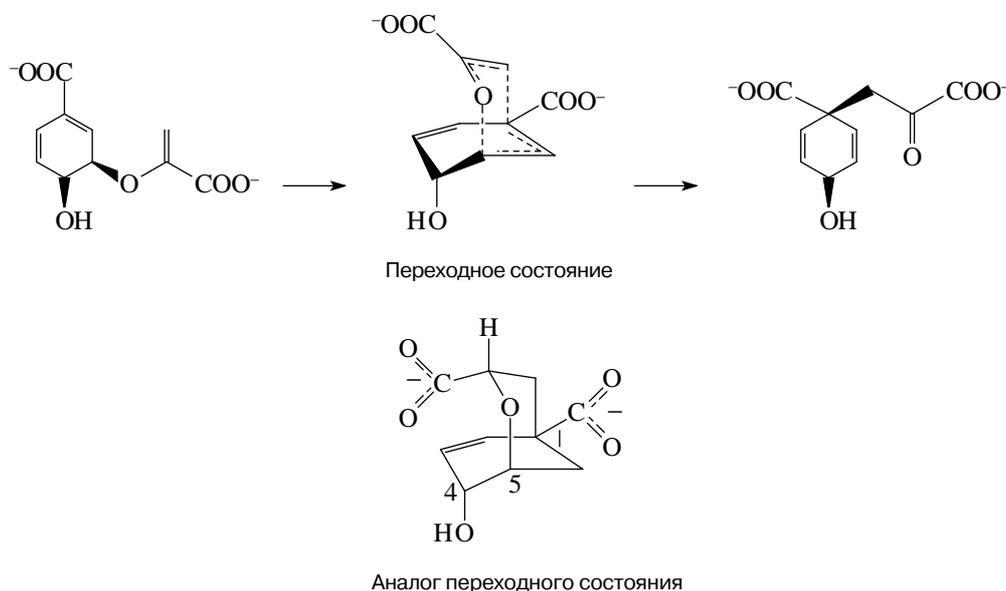
соединение, оказались весьма эффективными катализаторами, лишь в 10 раз уступавшими естественному ферменту в активности. Успех этой работы подтвердил правильность представлений о вероятной структуре переходного состояния реакции, катализируемой феррохелатазой.

Вторым примером реакции, механизм которой не содержит таких элементов химического катализа, как общий кислотно-основный или нуклеофильный катализ, может служить Клайзеновская перегруппировка, катализируемая хоризматмутазой. На рис. 4 показана схема этой реакции (энзиматический механизм катализа пока неизвестен) и предполагаемая структура переходного состояния. На основании этой структуры был синтезирован стабильный аналог переходного состояния. Это оксабициклическое соединение (см. рис. 4) оказалось сильным ингибитором хоризматмутазы, связывавшимся с ферментом в 100 раз прочнее, чем субстрат. Среди антител, выработанных на данное соединение, оказались абзимы, обеспечивавшие тысячекратное ускорение хоризматмутазной реакции. Такое ускорение, однако, было на три порядка ниже, чем характерное для естественного фермента. Вполне понятный интерес к причинам, обуславливающим это отличие, побудил исследователей провести сравнительный анализ структуры комплексов, образуемых ферментом или абзимом с аналогом переходного состояния реакции. На основании рентге-

ноструктурного анализа обоих комплексов были выявлены типы взаимодействий, ответственных за связывание аналога переходного состояния (рис. 5). Как видно на рисунке, это водородные связи и электростатические взаимодействия. Фермент образует наибольшее число контактов с одной из карбоксильных групп молекулы аналога переходного состояния (рис. 5Б), тогда как второй карбоксил (на рисунке внизу) расположен у входа в активный центр и полностью доступен растворителю. В случае антитела этот последний образует водородную связь с тирозином, а гидроксил в “верхней” части цикла, по-видимому, фиксируется недостаточно прочно из-за отсутствия в его окружении второго остатка аргинина. В совокупности с другими отличиями это приводит к недостаточно эффективной стабилизации переходного состояния, и, как следствие, к замедлению катализа.

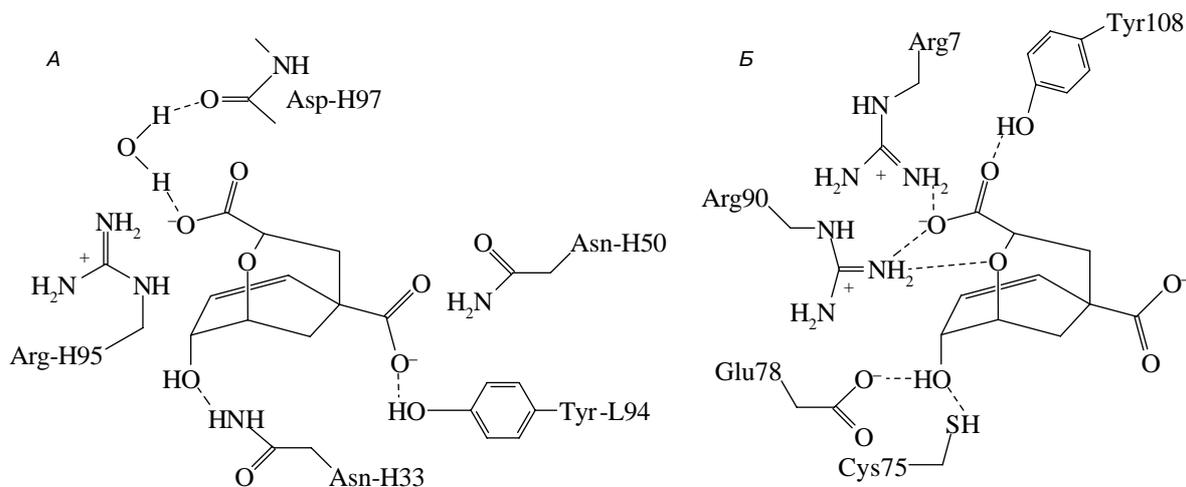
### АБЗИМЫ, АКТИВНОСТЬ КОТОРЫХ СВЯЗАНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НУКЛЕОФИЛЬНОГО КАТАЛИЗА

Хотя стабилизация переходного состояния — важнейший фактор ферментативного катализа, в действии большинства ферментов существенную роль играют также элементы химического катализа (общий кислотно-основный и ковалентный катализ). Оказалось, что в некоторых случаях абзимы также способны использовать элементы



**Рис. 4.** Реакция, катализируемая хоризматмутазой.

Превращение хоризмовой кислоты (хоризмата) в префеновую (префенат) представляет собой внутримолекулярную перегруппировку, включающую поворот энол-пирувильной группы с образованием переходного состояния, предполагаемая структура которого показана на рисунке. Стабилизация такого состояния, обеспечиваемая его прочным связыванием с ферментом, создает возможность разрыва связи углерода, находящегося в пятом положении цикла, с кислородом и последующее образование связи между первым углеродным атомом цикла и углеродом энол-пирувильной группы. Внизу показана структура стабильного аналога переходного состояния.



**Рис. 5.** Схематическое изображение комплекса, образуемого абзимом (А) и хоризатмутазой из *B. subtilis* (Б) с аналогом переходного состояния.

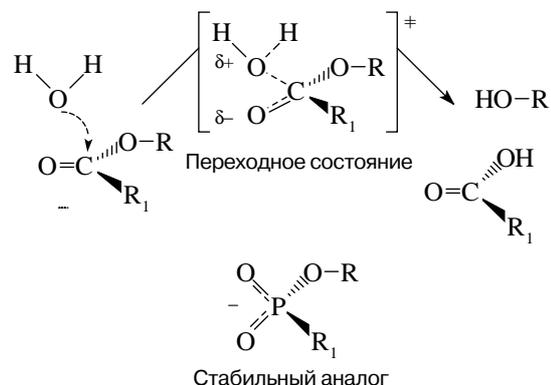
Пунктирными линиями обозначены водородные связи, возникающие между разными группами молекулы аналога переходного состояния и аминокислотными остатками белка, участвующими в ее связывании. В случае абзима (А) это остатки, формирующие антиген-связывающий центр (так как абзим – это антитело, выработанное на гаптен – аналог переходного состояния). В случае хоризатмутазы (Б) это остатки, входящие в активный центр фермента.

химического катализа. Характерный пример – антитела, гидролизующие сложные эфиры карбоновых кислот, – первые абзимы, описанные в литературе. Согласно теоретическим представлениям, механизм реакции переноса ацила на воду включает переходное состояние тетраэдрической структуры с отрицательным зарядом на кислороде карбонильной группы (рис. 6). Стабилизация этого заряда – важнейшее условие осуществления реакции; предполагается, что активный центр фермента эстеразы обеспечивает такую стабилизацию при связывании переходного состояния.

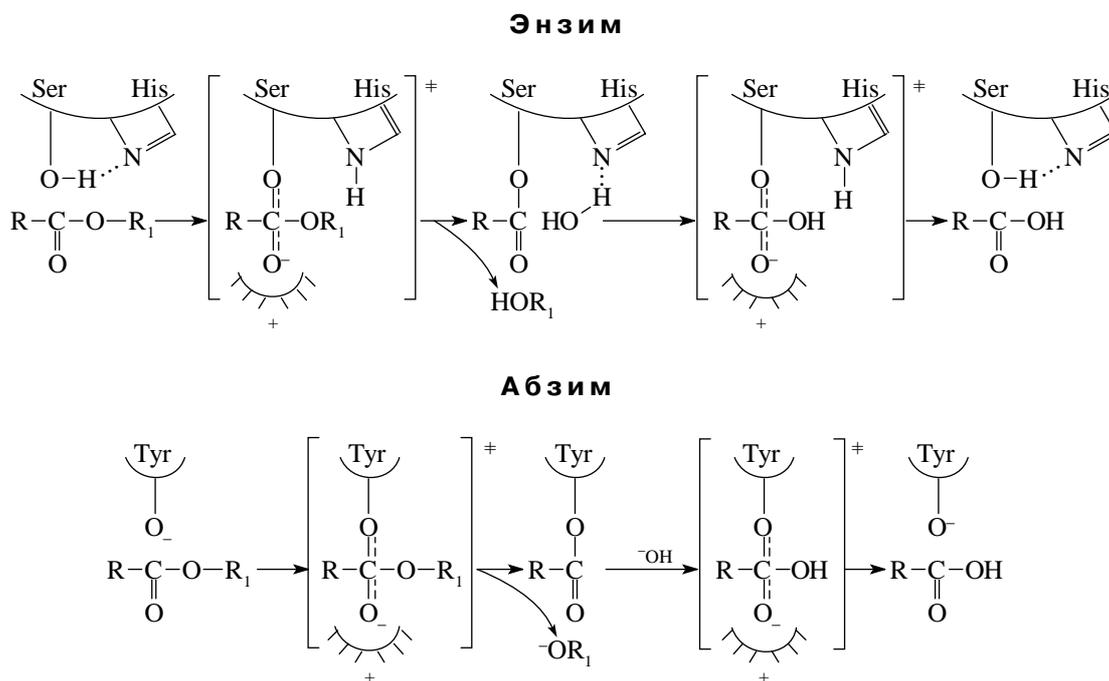
Структура переходного состояния может быть “имитирована” стабильным аналогом, имеющим сходную тетраэдрическую конфигурацию и отрицательный заряд на кислороде (эфир фосфоната, рис. 6). Эфиры фосфоната известны как мощные ингибиторы эстеразных реакций, что говорит об их прочном связывании с ферментом и подтверждает их сходство с предполагаемой структурой переходного состояния. Использование эфиров фосфоната в качестве гаптенов оказалось успешным и привело к получению антител, обладающих эстеразной активностью. Детальное исследование свойств этих абзимов показало, что их эффективность в ряде случаев приближается к эффективности соответствующих ферментов; более того, оказалось, что в ходе катализа происходит ковалентное присоединение ацильной группы субстрата к белку, аналогично ситуации, имеющей место при нуклеофильном катализе сериновыми протеиназами.

Наряду с этим выявились и существенные отличия, показавшие несовершенство абзимов по срав-

нению с естественными ферментами. Как видно из рис. 7, в действии сериновой протеиназы (например, химотрипсина) важную роль играет общий кислотно-основный катализ, обеспечивающий активацию гидроксильной группы серина, а также последующую активацию молекулы воды. Активный центр абзима лишен такой способности, так как не содержит групп, способных осуществлять общий кислотно-основный катализ. Поэтому, в отличие от фермента, функционирующего при физиологических значениях pH, абзим проявляет свою активность при pH выше 9,5, где ионизирована OH-группа тирозина, которая и атакует субстрат. Активный центр абзима оказывается также неспособным обеспечить активацию молекулы воды, и вторая



**Рис. 6.** Реакция гидролиза сложного эфира карбоновой кислоты и структура эфира фосфоната – стабильного аналога переходного состояния.



**Рис. 7.** Механизм реакции гидролиза сложного эфира карбоновой кислоты, катализируемой энзимом (химотрипсином) или абзимом.

Первая стадия катализа энзимом – отход протона от гидроксильной группы серина (Ser) на гистидин (His). Это обеспечивает возникновение отрицательного заряда на кислороде серина и возможность атаки карбонильного углеродного атома субстрата с образованием тетраэдрического интермедиата – переходного состояния. В его стабилизации важную роль играет положительный заряд в так называемой “анионной ямке”, формируемой активным центром. Следующая стадия, в которой гистидин выступает как общая кислота, – это отход протона от гистидина на кислород так называемой “уходящей группы”, то есть  $OR_1$ , с освобождением продукта – спирта ( $HOR_1$ ). Гистидин вновь приобретает способность выступать в качестве общего основания, оттягивая протон на этот раз от молекулы воды. Образовавшийся ион гидроксила осуществляет нуклеофильную атаку на карбонильный углерод с образованием нового переходного состояния, также стабилизируемого взаимодействием с положительно заряженным участком активного центра. Следующий затем переход протона с гистидина на кислород серина сопровождается освобождением второго продукта реакции. Абзим катализирует ту же реакцию без участия общего кислотно-основного катализа, используя остаток тирозина (Tyr) в качестве нуклеофила, образующего ковалентный тетраэдрический интермедиат, также стабилизируемый взаимодействием с положительно заряженным участком активного центра. Первый продукт реакции освобождается в непротонированной форме ( $-OR_1$ ).

стадия реакции идет за счет нуклеофильной атаки свободным ионом гидроксила.

Приведенное сравнение показывает, что, хотя абзимы могут не уступать естественным ферментам в эффективности химического катализа, они безусловно являются менее совершенными с точки зрения способности функционировать в физиологических условиях. Понимание причин этих отличий необходимо для направленного поиска путей усовершенствования абзимов. Вместе с тем оно имеет важное значение для развития теоретических представлений в энзимологии.

#### ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ КАТАЛИТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ СПОСОБСТВУЕТ РАЗВИТИЮ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ ЭНЗИМОЛОГИИ

Наиболее демонстративным вкладом в учение о ферментативном катализе, безусловно, является

сам факт успешного получения антител, обладающих каталитической активностью. Блестящее подтверждение гипотезы Полинга–Дженкса можно считать лучшим доказательством справедливости представлений о комплементарности активного центра фермента структуре переходного состояния реакции. Рентгеноструктурные исследования, проведенные на комплексах хоризматмутазы и соответствующего абзима с аналогом переходного состояния, подтвердили, что оба катализатора обеспечивают прочное связывание той геометрической структуры, которая предполагается в качестве переходного состояния данной реакции. Аналогичные рентгеноструктурные исследования проведены в последнее время и с другими абзимами. Детальный сравнительный анализ взаимодействий между белком и лигандом может дать ценную информацию о том вкладе, который вносят отдельные контакты в эффективность катализа; он важен и для проверки

правильности теоретических представлений о структуре переходного состояния.

Имеющиеся в настоящее время данные позволяют считать, что в большинстве случаев абзимы можно рассматривать по сравнению с естественными ферментами как катализаторы примитивного типа. Изучение их свойств — один из подходов к пониманию механизмов усовершенствования свойств ферментов в ходе эволюции, обеспечивших их эффективное функционирование в живой клетке.

### **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АБЗИМОВ**

Работы по усовершенствованию каталитических свойств антител получили значительное развитие. Мы ограничимся лишь краткой характеристикой используемых в настоящее время экспериментальных подходов. Прежде всего это подходы, направленные на введение в активный центр абзимов функциональных групп, присутствующих в активных центрах соответствующих ферментов и способных обеспечивать разные типы химического катализа. Примером может служить прием, получивший название “bait and switch” (приманить и включить) и основанный на иммунизации мыши гаптенем — аналогом переходного состояния, несущим дополнительный заряд. В том случае, если этот заряд положительный, можно ожидать, что антитела, выработанные на такой гаптен (наиболее прочно его связывающие), будут содержать в участке связывания группы, заряженные отрицательно. При удачном расположении таких групп (например, карбоксильных) в активном центре абзима они могут принимать участие в катализе, увеличивая его эффективность. Помимо описанного выше иммунологического подхода, для введения функциональных групп (а также молекул кофакторов, ионов металлов) в область активного центра абзимов могут быть использованы методы химической модификации, а также большой набор молекулярно-биологических приемов.

Появившаяся в последние годы возможность оперировать со структурой генов, кодирующих антитела, позволяет включать в активные центры абзимов не только новые аминокислоты, но и отдельные фрагменты полипептидной цепи. Нет сомнений, что сочетание разных подходов может обеспечить, подобно замыслу исследователя, значительные изменения каталитических свойств абзимов, приближая их к свойствам естественных ферментов.

### **ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ АБЗИМОВ**

Очень важной, если не основной, причиной бурного развития исследований, посвященных каталитическим антителам, является исключительная перспективность их практического использования. Она прежде всего связана с уникальной особеннос-

тью абзимов, отличающей их от других биологических катализаторов: они могут быть выработаны для катализа почти всех химических реакций. Потенциальное число таких химических превращений несравненно выше, чем число реакций, происходящих в живых системах и катализируемых соответствующими ферментами. Используя абзимы, исследователь приобретает возможность создавать совершенно новые катализаторы для их применения как в научных, так и в практических целях.

Трудно переоценить роль, которую может сыграть использование абзимов в органической химии. Во-первых, это увеличение специфичности катализа (например, селективное расщепление пептидной связи между конкретными аминокислотными остатками). Во-вторых, это разделение энантиомеров (молекул, содержащих три разных заместителя у углеродного атома, называемого асимметрическим; они существуют в двух изомерных формах, являющихся зеркальным отражением друг друга). Абзимы, как и ферменты, обладают стереоспецифичностью и могут связывать один энантиомер в 1000 раз прочнее, чем другой. Поскольку получение чистых право- и левовращающих популяций молекул, неотличимых по их химическим свойствам, — задача весьма трудная, если вообще разрешимая, применение соответствующих абзимов может оказаться чрезвычайно полезным в подобных случаях, например при синтезе фармакологических препаратов. В настоящее время, к сожалению, многие лекарства готовятся как смеси энантиомеров, лишь один из которых активен в медицинском отношении, а другой нередко вызывает побочные реакции. В-третьих, это катализ трудно идущих химических превращений. В том случае, если определенный субстрат (А) способен претерпевать превращения по разным путям с образованием разных продуктов:



в отсутствие катализатора предпочтительной окажется реакция с наименьшей энергией активации, например  $A \rightarrow B$ . Однако использование абзима, прочно связывающего переходное состояние реакции  $A \rightarrow C$  и смещающего равновесие в сторону образования данного переходного состояния, приводит к изменению баланса энергии в пользу пути превращения  $A \rightarrow C$ , который в отсутствие катализатора является менее кинетически выгодным.

Особую роль может сыграть применение каталитических антител в биотехнологии и медицине, и это опять обусловлено их уникальной способностью катализировать любые химические реакции в дополнение к тем, для которых существуют естественные ферменты. Можно ли ввести каталитическое антитело в клетку и заставить его там функционировать? Ответ на этот вопрос был получен в работе, проведенной на штамме дрожжей, лишенных вследствие мутации в структурном гене, кодирующем хорионатмутаза, способности синтезировать

ароматические аминокислоты. Используя генно-инженерные подходы, авторы включили ген абзима, обладавшего хоризматмутазной активностью, в генетический аппарат дрожжевой клетки. Ген активно экспрессировался, и проявившаяся активность абзима вполне компенсировала недостаток фермента. Таким образом была показана принципиальная возможность направить эукариотическую клетку по пути синтеза катализаторов, созданных руками человека и потенциально способных осуществлять любые химические реакции.

Весьма заманчивы перспективы использования каталитических антител в терапевтических целях. Иммунная система организма могла бы быть “улучшена” за счет выработки антител, которые способны не только связывать токсины, бактерии, вирусы или раковые клетки, но и катализировать их разрушение. При этом было бы достаточно даже невысокой каталитической активности; введение безвредного конъюгата гаптена могло бы обеспечить длительный эффект. Другой подход может быть основан на введении в организм человека готового абзима. Применение такого подхода зависит от разработки техники получения моноклональных антител, пригодных для использования в медицине. В силу малой доступности моноклональных антител человека основное внимание сосредоточено на использовании антител, полученных при иммунизации мышей.

Чтобы уменьшить степень иммунологической несовместимости, применяют методы генной инженерии, позволяющие конструировать “химерные” или “гуманизированные” антитела, сочетающие элементы структуры мышинных и человеческих антител. В первом случае молекула антитела человека сохраняет все элементы тяжелых и легких цепей, за исключением их переменных N-концевых отрезков ( $V_L$  и  $V_H$ , см. рис. 1), на место которых вводят соответствующие отрезки моноклонального антитела мыши. Таким образом, антитело человека становится носителем антиген-связывающего центра антитела мыши. Более совершенным вариантом является “гуманизированное” антитело, в котором антителу мыши принадлежат лишь гипервариабельные элементы, формирующие антиген-связывающий центр. Такие антитела уже успешно применяются для лечения вирусных заболеваний, и есть основания ожидать, что абзимы займут достойное место среди терапевтических средств данного типа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени описано более 60 реакций, катализируемых абзимами. По каталитической эффективности некоторые абзимы не уступают естественным ферментам, а по специфичности даже превосходят их. Абзимы могут быть выработаны для катализа любой химической реакции и приготовлены в сколь угодно больших количествах. Разработка научной базы усовершенствования каталитических антител для их использования интенсивно ведется в ряде мощных научных центров, объединяющих химиков и иммунологов. Уже не подлежит сомнению, что эти катализаторы могут найти широкое применение в биологии, химии, промышленности и медицине. Есть все основания ожидать, что абзимы будут одним из важных инструментов биотехнологии, которая скорее всего станет преобладающей технологией XXI века.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Schultz P.G.* The interplay between chemistry and biology in the design of enzymatic catalysts // *Science*. 1988. V. 240. P. 426 – 443.
2. *Green B.S., Tawfik D.S.* Catalytic monoclonal antibodies: tailor-made, enzyme-like catalysts for chemical reactions // *Biotechnol.* 1989. V. 7. P. 304 – 310.
3. *Chook Y.M., Gray J.V., Ke H., Lipscomb W.N.* The monofunctional chorismate mutase from *Bacillus subtilis*. Structure determination of chorismate mutase and its complexes with a transition state analog and prephenate, and implications for the mechanism of the enzymatic reaction // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 240. P. 476 – 500.
4. *Lerner R.A., Tramontano A.* Antibodies as enzymes // *Biochem. Sci.* 1987. V. 12. P. 427 – 430.
5. *Janda K.D.* New strategies for the design of catalytic antibodies // *Biotechnol. Prog.* 1990. 6. P. 178 – 181.
6. *Danishefsky S.* Catalytic antibodies and disfavored reactions // *Science*. 1993. V. 259. P. 469 – 470.
7. *Tang Y., Hicks J.B., Hilvert D.* In vivo catalysis of a metabolically essential reaction by an antibody // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 8784 – 8786.

\* \* \*

Наталья Константиновна Наградова, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, лауреат Государственной премии. Область научных интересов – энзимология. Автор трех монографий и более 150 статей.