

Аннотация работы:

Данное исследование направлено на создание мутантных вариантов протективного антитела против вируса клещевого энцефалита, которые бы обладали повышенной эффективностью по отношению к штаммам Европейского и Сибирского субтипов ВКЭ. Для этого были использованы методы рационального дизайна белковых молекул в комбинации с классическими методами генетической и белковой инженерии. Один из полученных мутантных вариантов обладал в 2.2 раза более высоким сродством по отношению к целевым белкам по сравнению с исходным антителом. В дальнейшем он может быть использован для создания комплексного иммунопрепарата против ВКЭ, обладающего повышенной эффективностью в отношении штаммов Дальневосточного, Сибирского и Европейского субтипов ВКЭ.

Тема исследования: «Моделирование *in silico* эффекта от введения мутаций в антиген-связывающую область антитела против вируса клещевого энцефалита»

Состав коллектива:

1. Байков Иван Константинович, возраст 35 лет, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН), научный сотрудник, к.х.н., ivan_baykov@mail.ru. Является также ассистентом преподавателя кафедры ХТТ ФЕН НГУ.
2. Дюсекевич Павел Юрьевич, 3й курс ФЕН НГУ, распределения по кафедрам пока не было. Работа пока не является курсовой или дипломной. Обучение (бакалавриат) заканчивается в июне 2023.

Информация о финансировании: исследование поддержано граном РФФИ 19-74-00107 «Структурный дизайн антител широкой специфичности против вируса клещевого энцефалита» (1 июля 2019 – 30 июня 2021).

Научное содержание работы**1. Постановка задачи:**

Данное исследование выполнено в рамках проекта РФФИ по структурному дизайну антитела против клещевого энцефалита (19-74-00107). Ранее было показано, что комплексы одного из протективных антител против этого вируса обладают разной стабильностью в зависимости от используемого варианта вирусного гликопротеина Е (Байков ИК и др, 2019). С дальневосточным вариантом антитело образует более стабильные комплексы, тогда как с сибирским и европейским вариантами вирусного белка комплексы менее стабильны на 1-2 порядка. Цель проекта РФФИ - используя подходы рационального дизайна белковых молекул, сконструировать мутантные варианты одного из протективных антител против вируса клещевого энцефалита, которые бы обладали повышенным (по сравнению с исходным антителом) сродством к вирусному гликопротеину Е Европейского и Сибирского субтипов вируса клещевого энцефалита.

Цель вычислительной части проекта – из множества мутаций, которые можно ввести в антитело, методами молекулярной динамики с последующей оценкой свободной энергии образования комплекса (мера стабильности, «прочности» комплекса) отобрать те мутации, которые с наибольшей вероятностью привели бы к стабилизации комплекса, тем самым повысив терапевтический эффект антитела.

Для этого был использован метод молекулярной динамики белкового комплекса с последующим расчетом свободной энергии взаимодействия белков-участников методом ММ/PBSA (Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area). На первой стадии было необходимо на основе доступного программного обеспечения разработать/отработать методику достоверного предсказания величины стабилизирующего эффекта в зависимости от вводимой в антитело мутации. В распоряжении исследователей был набор мутантных вариантов антитела, для которых значение стабилизирующего эффекта было установлено экспериментально. Цель первой стадии сводилась к тому, чтобы подобрать такой вычислительный метод, результаты которого на исследуемой выборке хорошо согласовывались с экспериментальными данными.

На второй стадии предполагалось применить разработанный подход для анализа около 30 других мутантных вариантов антитела, с тем чтобы отобрать 5-10 мутантных вариантов антитела, которые образуют наиболее прочные комплексы с вирусными белками (домены D3 гликопротеина E вируса клещевого энцефалита Дальневосточного и Европейского субтипов вируса).

2. Современное состояние проблемы

В настоящее время разработка рекомбинантных антител является бурно развивающимся направлением биоиндустрии, что связано с высокой эффективностью иммунопрепаратов. Разработан также ряд антител и к вирусу клещевого энцефалита, переносимому клещами (Guirakhoo F. et al., 1989, Tsekhanovskaya N. A. et al., 1993, Jiang W. et al., 1993, Протопопова Е. В. и др., 1996), однако до терапевтического использования эти антитела не были доведены. Вместе с тем, в последние несколько лет интерес к терапевтическим антителам против ВКЭ существенно вырос. До начала 2000х годов в мире был доступен австрийский препарат FSME-Bulin, основанный на сывороточных антителах человека против ВКЭ. После прекращения производства этого препарата в мире осталось только одно специфическое средство против ВКЭ – «Иммуноглобулин человека против клещевого энцефалита», производимый в России. Этот препарат доступен только на территории России и имеет ряд недостатков. Из-за отсутствия адекватного специфического средства лечения клещевого энцефалита в настоящее время, по крайней мере, три научных коллектива из России, Чехии и Китая активно участвуют в разработке рекомбинантных терапевтических антител против ВКЭ (Füzik T. et al., 2018; Yang X et al., 2019; Байков ИК et al, 2014).

Ранее коллективом исследователей было разработано рекомбинантное антитело ch14D5 против ВКЭ (Байков ИК et al, 2014). Это антитело обладает высокими противовирусными свойствами, является высокоаффинным и способно защищать модельных животных от введения сотен летальных доз вируса. Было определено место на поверхности вирусного гликопротеина E, с которым связывается это антитело (Байков ИК и др. 2018). Исследование связывания данного антитела с вирусными белками, полученными на основе различных субтипов ВКЭ (Дальневосточный, Сибирский, Европейский) показало, что с белками Сибирского и Европейского субтипов антитело связывается в 10-100 раз менее прочно, чем с белком, полученным на основе штамма Софьин Дальневосточного субтипа ВКЭ (Байков ИК и др. 2018). Несмотря на то, что на модельных животных различия в эффективности антитела по отношению к различным субтипам ВКЭ не обнаружено (Matveev AL et al, 2019), различия на вирусных белках стали толчком для структурных исследований с целью объяснения различия в связывании и поиска мутантных вариантов антитела, которые бы более прочно связывались с вирусными белками Сибирского и Европейского субтипов ВКЭ.

При разработке рекомбинантных антител активно используются методы рационального дизайна, направленные на улучшение различных свойств антитела (Sormanni P. et al., 2018; Krawczyk K et al., 2017; Yamashita T, 2018). Оптимизация структуры антиген-связывающей области антитела позволяет повысить аффинность антитела по отношению к антигену (Lippow SM et al., 2007, Kiyoshi M et al., 2014; Mahajan SP et al., 2018), сузить или, наоборот, расширить специфичность узнавания антителом антигена либо группы антигенов (Winkler K et al., 2000), и также повысить каталитическую активность абзимов (Smirnov IV et al., 2016). Благодаря модификациям константной части антител можно менять изотип или аллотип антител, снижать иммуногенность антител, изменять сродство антитела к клеточным рецепторам для увеличения времени циркуляции антитела в кровотоке либо для «отключения» эффекторных функций антитела (Lo M et al., 2017; Schlothauer T et al., 2016). При направленной модификации антиген-связывающей области антитела активно используют различные методы моделирования, такие как молекулярный докинг, молекулярная динамика, а также методы квантовой механики. Ряд исследователей отмечают, что введение модификаций, увеличивающих количество электростатических взаимодействий, позволяет существенно повысить прочность комплекса между антителом и антигеном (Kiyoshi M et al., 2014; Mahajan SP et al., 2018). В качестве примера, иллюстрирующего применение подходов рационального дизайна для создания терапевтических антител, можно привести высокоаффинное вируснейтрализующее антитело Ab513 против всех четырех серотипов вируса лихорадки Денге (Robinson LN et al., 2015).

3. Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы

В рамках проекта РФФИ было получено несколько мутантных вариантов одноцепочечного антитела sc14D5 против вируса клещевого энцефалита (табл. 1). Эти мутантные варианты были разработаны в результате структурного дизайна на основе структуры комплекса антитела 14D5 с фрагментом вирусного белка (Baykov IK et al, 2021, bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.07.28.453943>) (рис. 1 А). В качестве модельных вирусных белков, выполняющих роль антигенов, в данном проекте использованы белки D3_Sof, D3_Zau и D3_Eu, которые представляют собой полученные в бактериях E.coli D3-домены гликопротеина E вируса клещевого энцефалита Дальневосточного, Сибирского и Европейского субтипов, соответственно. Сродство мутантных вариантов антитела к белкам D3_Sof и D3_Eu было установлено экспериментально с использованием биосенсора ProteOn XPR 36, использующем явление поверхностного плазмонного резонанса (табл. 1). Было показано, что лишь немногие мутантные варианты, спроектированные на данной стадии, сохранили способность связываться с вирусными белками. Наиболее удачным оказался вариант Y32M, который сохранил данную способность, а с белками D3_Zau и D3_Eu образовывал более стабильные комплексы, чем исходное антитело sc14D5.

Параллельно была оценена свободная энергия комплексов «антитело-вирусный белок» для исходного антитела sc14D5, а также для мутантных вариантов. Для этого был использован вычислительный подход ММ/ПБСА (Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area), который заключается в вычислении молекулярно-динамической траектории для каждого комплекса в явном растворителе, после чего для различных промежуточных состояний (кадров траектории) рассчитывается свободная энергия взаимодействия двух белков, образующих комплекс (антитело и D3-фрагмент вирусного гликопротеина E). Для решения этой задачи был использован вычислительный кластер НГУ.

Протокол проведения вычислений был следующим:

1. На основе исходной структуры комплекса [1] с помощью UCSF Chimera v. 1.13.1 готовили .pdb-файл, в котором находились молекула белка D3_Sof, а также переменные домены легкой и тяжелой цепей антитела 14D5, не связанные

ковалентными связями. Эти два домена были моделью одноцепочечного антитела sc14D5. Константные домены антитела, входящие в исходную структуру, были убраны для снижения вычислительной нагрузки.

2. В случае моделирования траектории для мутантного варианта антитела либо для белка D3_Eu, в структуры белков вносили соответствующие мутации с помощью инструмента Rotamers пакета UCSF Chimera.
3. Готовили молекулярно-динамическую систему с помощью пакета GROMACS 2020.3. В системе использовали явный растворитель (воду) TP3P, концентрация хлорида натрия была «доведена» до 100 мМ. В качестве силового поля использовали amber99sb, показавшее одни из лучших результатов в аналогичных исследованиях. Дисульфидные связи между остатками цистеина в молекулах белков были сформированы. Температура симуляции составила 300К, давление составило около 1 бар.
4. Траектории молекулярной динамики вычисляли с помощью пакета GROMACS 2020.3 на узлах кластера a6500g10, оборудованного графическими ускорителями Tesla V100. Продолжительность траекторий составила 100 нс с шагом 2 фс. Анализировали график значения среднеквадратичного отклонения позиций атомов от начального положения в течение траектории. Убеждались в том, что система достигает «равновесия» за первые 10-15 нс симуляции (рис. 1 Б, В, Г).
5. Из полученной траектории извлекали 75 кадров начиная с 25й наносекунды и до конца траектории, с шагом в 1 нс. Производили расчет средних значений свободной энергии комплекса с помощью скрипта g_mmpbsa, параметр диэлектрической проницаемости белка использовали равным 2 или 4. Полученные значения приведены в табл. 1.

4. Полученные результаты

В результате проведенных исследований было показано, что рассчитанные значения свободной энергии комплексов очень слабо коррелируют с экспериментальными значениями. В частности, антитело F101M должно связываться с белком D3_Sof более прочно, чем антитела Y32H и Y32M, т.к. у него более низкое значение свободной энергии связывания. Фактически же антитело F101M вообще не связывалось с данным белком. Кроме того, согласно вычисленным значениям, антитело Y32H должно образовывать гораздо более прочный комплекс с белком D3_Eu, чем антитело Y32M, однако фактически происходит наоборот.

Для получения статистически-значимых результатов было проведено несколько повторных вычислений для комплекса sc14D5+D3_Eu. При этом для каждого повтора использовали различную «затравку» при псевдо-случайной генерации начальных скоростей атомов на этапе уравнивания системы. Оказалось, что полученные значения свободной энергии образования комплекса имеют высокий разброс: -91 ± 8 кДж/моль, -65 ± 8 кДж/моль, -58 ± 10 кДж/моль, -67 ± 10 кДж/моль для четырех повторов. С этой проблемой сталкивались и другие исследователи, работающие в данной области (например, Wan S et al., Interface Focus, 2020. doi: 10.1098/rsfs.2020.0007), однако до сих пор во многих публикациях эту особенность метода обходят стороной. Согласно авторам исследования (), для получения статистически-значимых результатов необходимо получать высокое число (20-50) сравнительно коротких траекторий, после чего анализировать распределение значений и делать вывод о достоверности полученных результатов. За неимением достаточного времени в связи с плотным графиком экспериментальных работ по данному проекту РФН дальнейшие попытки получить статистически-значимые значения для энергий комплексов были отложены.

В настоящий момент проект РФ успешно завершен, полученный мутантный вариант Y32M оказался наиболее успешным из всех исследованных вариантов антител (Baikov IK et al., Viruses 2021). Вместе с тем, работы по прогнозированию эффекта от введения тех или иных мутаций в антитело планируется продолжить осенью 2021 г. При этом будут учтены наработки, полученные авторами работ (Wan S et al., Interface Focus, 2020. doi: 10.1098/rsfs.2020.0007).

Иллюстрации:

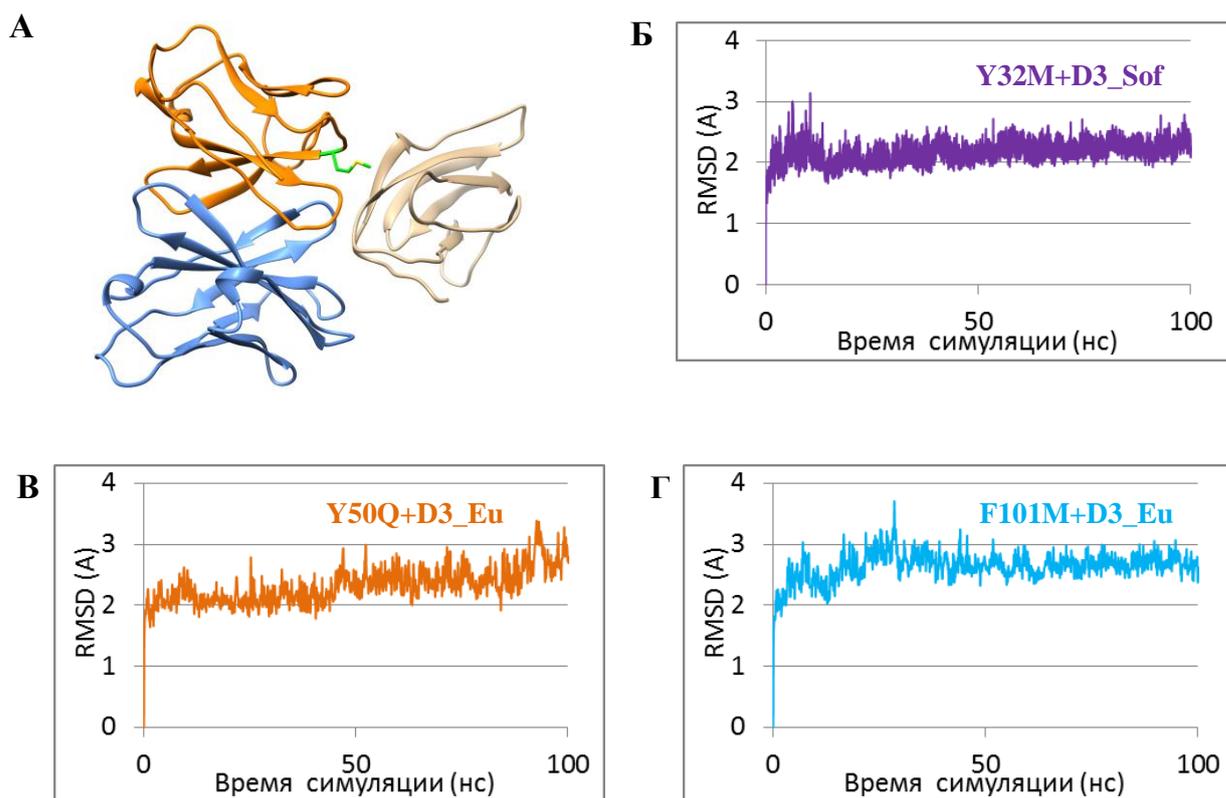


Рис. 1. Симуляция молекулярной динамики для комплекса Fv-фрагментов антитела с белком D3_Sof или D3_Eu. А) Исходная модель комплекса на примере Fv-фрагмента, содержащего мутацию L_Y32M (остаток метионина показан зеленым). Оранжевым и синим показаны переменные домены легкой и тяжелой цепей антитела, соответственно. Бежевым показан домен D3 гликопротеина Е. Б), В) и Г) Типичные графики среднеквадратичного отклонения положения тяжелых атомов в зависимости от времени, вычисленные для траекторий, полученных в результате симуляции динамики комплексов различных Fv-доменов.

Таблица 1. Значения свободной энергии связывания вариантов антитела sc14D5 с белками D3_Sof и D3_Eu, вычисленные методом ММ/ПБСА. При расчетах диэлектрическая проницаемость белка выбрана равной 2. Для сравнения приведены экспериментальные данные о сродстве вариантов антител к белкам D3.

Антитело	Вычисленное значение свободной энергии связывания, кДж/моль (среднее \pm стд. ошибка среднего)		Экспериментально определенное значение равновесной константы диссоциации	
	D3_Sof	D3_Eu	D3_Sof	D3_Eu
sc14D5	-132 \pm 5	-91 \pm 7	40 \pm 5 нМ	> 6 мкМ
Y32H	-97 \pm 6	-130 \pm 7	+	> 2 мкМ
Y32M	-110 \pm 8	-35 \pm 10	~120 нМ	1.6 \pm 0.2 мкМ
Y32Q	-97 \pm 8	-81 \pm 7	–	–
Y50H	-78 \pm 9	+38 \pm 10	–	–
Y50Q	-46 \pm 10	-68 \pm 8	–	–
F101L	-61 \pm 8	-83 \pm 6	–	–
F101M	-120 \pm 7	+25 \pm 8	–	–
F101Q	-99 \pm 6	-79 \pm 11	–	–

“–” значимого связывания не обнаружено; “+” связывание есть, но значения равновесной константы диссоциации не удалось вычислить.

Публикации/конференции:

1. Байков, I.K.; Desyukevich, P.Y.; Mikhaylova, E.E.; Kurchenko, O.M.; Tikunova, N.V. **Computational and Rational Design of Single-Chain Antibody against Tick-Borne Encephalitis Virus for Modifying Its Specificity.** Viruses 2021, 13, 1494. <https://doi.org/10.3390/v13081494>
Ссылка на ИВЦ НГУ не включена, поскольку молекулярно-динамическая часть исследования не была включена в публикацию.
2. Устный доклад «**Структурный дизайн антитела против вируса клещевого энцефалита с целью расширения его специфичности**» на конференции Open Bio 2020 (27-30 октября 2020 г, наукоград Кольцово Новосибирской обл). В докладе присутствует ссылка на то, что исследования выполнены с использованием ИВЦ НГУ.
3. Устный доклад «**Рациональный дизайн рекомбинантных антител против вируса клещевого энцефалита**» на конференции Bio-top 2020 (21-24 декабря 2020 г, г. Новосибирск). В докладе присутствует ссылка на то, что исследования выполнены с использованием ИВЦ НГУ.