



**РОМАНЮК**

**Світлана Іванівна** —  
кандидат біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
Інституту біохімії ім. О.В. Палла-  
діна НАН України



**КОМІСАРЕНКО**

**Сергій Васильович** —  
академік НАН України,  
директор Інституту біохімії  
ім. О.В. Палладіна НАН України

## МОЛЕКУЛЯРНА БІОЛОГІЯ ТА ІМУНОЛОГІЯ РЕВОЛЮЦІОНУЮТЬ ХІМІЮ, АБО ЯК СКЕРУВАТИ ЕВОЛЮЦІЮ ПРОТЕЇНІВ НА БЛАГО ЛЮДСТВА

Нобелівська премія з хімії 2018 року

*Нобелівську премію з хімії у 2018 р. розділили між собою троє вчених. Половина премії дісталася американській дослідниці Френсіс Арнольд (Frances H. Arnold) «за спрямовану еволюцію ензимів», другу половину поділили між собою американець Джордж Сміт (George P. Smith) та британець Грег Вінтер (Sir Gregory P. Winter) «за фазовий дисплей пептидів і антитіл». Методи, розроблені нобелівськими лауреатами, сприятимуть розвитку більш екологічно чистого виробництва хімічної продукції, нових матеріалів, фармацевтичних засобів, біопалива тощо.*

З жовтня 2018 р. у Стокгольмі в рамках 117-го нобелівського тижня Нобелівський комітет при Каролінському медичному інституті оголосив імена лауреатів Нобелівської премії з хімії. Щороку на цю подію з нетерпінням очікує все світове наукове співтовариство, а напередодні зазвичай точаться гарячі дискусії, хто і за що може здобути цю найпрестижнішу наукову нагороду.

За прогнозами компанії Clarivate Analytics [1], які її співробітники роблять за результатами аналізу кількості цитувань, найбільш імовірними претендентами на Нобелівську премію з хімії 2018 р. вважали трьох учених. По-перше, це Ерік Н. Якобсен (Eric N. Jacobsen), професор кафедри хімії та хімічної біології Гарвардського університету (США), який зробив значний внесок у розроблення каталітичних реакцій для органічного синтезу, особливо реакції епоксидзації Якобсена. По-друге, можливим претендентом на Нобелівську премію називали Джорджа М. Шелдріка (George M. Sheldrick), професора Університету Георга-Августа в Геттингені (Німеччина) за його величезний внесок у розвиток структурної кристалографії, а саме, за впровадження системи комп'ютерних програм SHELX. По-третє, Нобелівську премію могла б отримати Джоанн Стаббе (JoAnne

Stubbe), професор кафедри хімії Массачусетського технологічного інституту (США), яка відкрила вільнорадикальний механізм роботи рибонуклеотидредуктаз, що здійснюють перетворення рибонуклеотидів на дезоксирибонуклеотиди — структурні компоненти, необхідні для синтезу та «ремонт» ДНК.

Однак рішення Нобелівського комітету стало несподіванкою: 110-ту Нобелівську премію з хімії було присуджено трьом дослідникам — Френсіс Гамільтон Арнольд (Frances Hamilton Arnold) з Каліфорнійського технологічного інституту (м. Пасадена, США), Джорджу Пірсону Сміту (George Pearson Smith) з Міссурійського університету (м. Колумбія, США) та серу Грегорі Полу Вінтеру (Sir Gregory Paul Winter) з Кембриджського університету (Велика Британія), які працюють у тій царині експериментальної біології, що охоплює такі науки як біохімія, імунологія, молекулярна біологія, генетика і вірусологія.

Генеральний секретар Шведської королівської академії наук Йоран Ханссон (Göran K. Hansson) оголосив, що половину премії отримує американська дослідниця Френсіс Арнольд «за проведену вперше спрямовану еволюцію ензимів», іншу половину рівними частинами поділять Джордж Сміт і Грег Вінтер «за відкриття та розвиток фагового дисплею пептидів і антитіл». Згідно з офіційним прес-релізом, лауреати «надихнулися силою еволюції та використали ті самі принципи — генетичні зміни і добір — для створення протеїнів, які вирішують хімічні проблеми людства» [2]. Церемонія нагородження лауреатів дипломами та золотими медалями за традицією відбулася в Стокгольмі 10 грудня, в день смерті засновника премії Альфреда Нобеля. Розмір грошової винагороди цьогоріч становив 9 млн крон (\$1,02 млн).

Хіміки відреагували на новину майже одностайно: «Авжеж, за традицією Нобелівську премію з хімії вирішили знову не вручати!». Дійсно, останнім часом Нобелівську премію з хімії все частіше присуджують за дослідження на стику традиційних дисциплін ученим, які працюють у галузі біохімії та молекулярної

біології. Рішення Нобелівського комітету нерідко зазнають критики, багато хто вважає їх несправедливими або необґрунтованими. Однак чи є подібне рішення випадковим, чи воно стало виявом долі, залишається філософським питанням, особливо якщо взяти до уваги, що й сама нобелівська премія з'явилася завдяки випадковому збігу обставин. Ідея про створення Нобелівського фонду прийшла Альфреду Нобелю, коли він за чашкою ранкової кави прочитав у газеті власний некролог під заголовком «Помер торгівець смертю» (Нобель отримав значні статки і був широко відомий завдяки винаходу динаміту). Це була випадкова помилка журналістів, пов'язана зі смертю брата Альфреда, однак ця подія змусила Нобеля замислитися, який слід він лишить по собі в пам'яті людства.

Взагалі робота нобелівських комітетів з різних дисциплін часто пов'язана з гучними скандалами. Так, у 2018 р. не було вручено Нобелівську премію з літератури (у 2019 р. заплановано вручити їх дві) через те, що багато членів Нобелівського комітету з літератури склали з себе повноваження внаслідок скандалу: 72-річного фотографа Жан-Клода Арно, чоловіка члена Шведської академії поетеси Катарини Фростенсон, звинуватили в сексуальних домаганнях до 18 жінок, а кількох інших членів академії — у порушенні правила про нерозголошення імен номінантів. Крім того, саму К. Фростенсон підозрюють у незаконному фінансуванні культурного фонду, що належить її родині, за рахунок коштів Нобелівського комітету [3].

Однак повернімося до Нобелівської премії з хімії та познайомимося ближче з ученими, яким судилося стати лауреатами в цій номінації 2018 року.

62-річна професор хімічної інженерії, біоінженерії та біохімії Френсіс Арнольд працює в Каліфорнійському технологічному інституті. Народилася вона 25 липня 1956 р. у передмісті Пітсбурга — Еджвуді (штат Пенсильванія) у сім'ї Жозефіни Інман і фізика-ядерника Вільяма Говарда Арнольда, а її дідусем був відомий

генерал-лейтенант Вільям Говард Арнольд, командир 5-ї армії США. Навчаючись у старших класах школи, Френсіс втекла до Вашингтона, де брала участь у протестах проти війни у В'єтнамі, з 17 років жила окремо від батьків, працюючи офіціанткою у джаз-клубі та водієм таксі. У 1979 р. здобула бакалаврський ступінь з механічної та аерокосмічної інженерії у Принстонському університеті, де займалася дослідженням сонячної енергії. Френсіс додатково вивчала економіку, російську та італійську мови, планувала стати дипломатом чи генеральним директором міжнародної компанії. На один рік вона переривала навчання в університеті заради роботи на італійському заводі з виробництва компонентів ядерних реакторів.

Після закінчення університету Френсіс як інженер з проектування сонячних електростанцій працювала у Південній Кореї, Бразилії, потім в Інституті досліджень сонячної енергії в штаті Колорадо (нині — Національна лабораторія відновлюваної енергії). В аспірантурі Каліфорнійського університету в Берклі Ф. Арнольд зацікавилася біохімією і в 1985 р. під керівництвом професора Харві Бланча (Harvey W. Blanch) захистила дисертацію, присвячену дослідженню методу афінної хроматографії, здобувши ступінь доктора філософії з хімічної інженерії. У 1986 р. Френсіс Арнольд перейшла на роботу до Каліфорнійського технологічного інституту — знаменитого Калтеху, де в 1996 р. стала професором. У 2013 р. їй було призначено директором Центру біотехнологій (Caltech's Donna and Benjamin M. Rosen Bioengineering Center).

Френсіс Арнольд — член консультативних рад Об'єднаного інституту біоенергетики, Королівського університету науки і техніки ім. короля Абдалли, Стипендії Паккарда у галузі науки і техніки, Премії королеви Єлизавети в галузі техніки і навіть Комітету Національної академії наук США з консультування голлівудських сценаристів для більш точного відтворення наукових тем у кінематографі. Вона є співавтором понад 40 патентів США. У 2005 р. заснувала компанію Gevo Inc. з виробництва біопалива, у 2013 р. — компанію Provivi, яка за-



Френсіс  
Арнольд  
(Frances  
H. Arnold)

ймається пошуком альтернативи пестицидам для захисту рослин. З 2016 р. входить до правління геномної компанії Illumina Inc.

Наукові досягнення Френсіс Арнольд відзначено багатьма нагородами, серед яких медаль Гарвена–Оліна Американського хімічного товариства (2005), премія Федерації американських товариств з експериментальної біології за видатні досягнення в науці (2007), премія Дрейпера Національної інженерної академії США (2011), Національна медаль за технологію та інновації (2011) — найвища державна відзнака США за внесок у технологічний прогрес, Премія Саклера з міждисциплінарних досліджень Національної академії наук США (2017) та ін. Френсіс Арнольд — єдина жінка, яка є членом усіх трьох національних академій США: Національної академії наук (з 2008 р.), Національної інженерної академії (з 2000 р.) та Національної медичної академії (з 2004 р.). Крім того, вона — член Американської академії мистецтв та наук (з 2011 р.), Американської асоціації сприяння розвитку науки (з 2010 р.), Американської академії мікробіології (з 2009 р.), Американського хімічного товариства (з 2005 р.), Американського інституту медичної та біологічної інженерії (з 2001 р.), іноземний член Королівської інже-



Джордж Сміт  
(George  
P. Smith)

нерної академії Великої Британії (з 2018 р.), її також включено до Національної зали слави винахідників (2014).

Френсіс Арнольд мешкає в м. Ла-Каньяда-Флінтридж (штат Каліфорнія). Двічі була одружена. Її перший чоловік помер від раку в 2001 р., а другий, астрофізик за фахом, вкоротив собі віку в 2010 р. Має трьох синів, один з яких у 2016 р. загинув унаслідок нещасного випадку. У неї самої в 2005 р. діагностували рак молочної залози, але після тривалого лікування хворобу вдалося подолати. Френсіс Арнольд багато подорожує, захоплюється підводним плаванням, катанням на лижах, мотоциклом та пішими походами [4].

77-річний професор біології Джордж Сміт працював у Міссурійському університеті (зараз — почесний професор). Народився 10 березня 1941 р. у м. Норволк (штат Коннектикут). З дитинства Джордж захоплювався природою, особливо його цікавили тварини. У 1963 р. здобув ступінь бакалавра з біології в Коледжі Хаверфорда (штат Пенсильванія), захистивши роботу в галузі молекулярної імунології. Протягом року працював шкільним учителем і лаборантом у дослідницькій лабораторії. В 1971 р. у Гарвардському університеті Джордж Сміт здобув ступінь доктора філософії з бактеріології та

імунології, виконавши дисертаційну роботу під керівництвом Едгара Хейбера (Edgar Haber) з дослідження варіативності та адаптивної експресії антитіл. Потім Дж. Сміт працював в Університеті Вісконсин-Медісон (штат Вісконсин) разом з Олівером Смітисом (Oliver Smithies), який у 2007 р. отримав Нобелівську премію з фізіології та медицини «за відкриття принципів уведення специфічних генних модифікацій у мишей з використанням ембріональних стовбурових клітин». У 1975 р. Джордж Сміт перейшов до Міссурійського університету, де у 2000 р. став професором. У 1983–1984 рр. він працював також в Університеті Дьюка у Даремі (штат Північна Кароліна). Саме там з Робертом Вебстером (Robert Webster) Сміт розпочав роботу з бактеріофагами, за яку й отримав Нобелівську премію. Наукові досягнення Джорджа Сміта відзначено премією з біотехнологічних досліджень Promega (2007). З 2001 р. він є членом Американської асоціації сприяння розвитку науки.

Студенти і викладачі університету називають Джорджа Сміта «добрим і скромним генієм», який не женеться за кількістю публікацій і нагород. Одружений з Марджорі Сабель (Marjorie R. Sable), професором і директором Школи соціальної роботи Міссурійського університету, має двох дорослих синів [5].

67-річний професор сер Грегорі Пол Вінтер працює в Лабораторії молекулярної біології Ради медичних досліджень у Кембриджі (Велика Британія). Народився 14 квітня 1951 р. у англійському містечку Лестер (графство Лестершир). Грег був хворобливою дитиною, а в післявоєнні роки життя у Британії було тяжким. Норми вугілля, яку видавали на домогосподарство, не вистачало для достатнього обігріву будинку, тому батько Грега знайшов роботу викладача французької мови в британській колонії Золотий Берег (яка в 1957 р. стала незалежною державою Гана) та перевіз родину до теплого клімату Західної Африки. Згодом вони повернулися до Англії заради навчання Грега у Королівській гімназії в Ньюкасл-епон-Тайні.

Грег продовжив вивчати природничі науки в Трінті-коледжі (Коледжі Святої Трійці) Кембриджського університету, який закінчив у 1973 р. У 1977 р. здобув ступінь доктора філософії в Лабораторії молекулярної біології Ради медичних досліджень у Кембриджі. Його дисертаційна робота, виконана під керівництвом Браяна Хартлі (Brian S. Hartley) і Джорджа Браунлі (George Brownlee), стосувалася досліджень амінокислотної послідовності триптофаніл-тРНК-синтетази бактерії *Bacillus stearothermophilus*. Пізніше Грег Вінтер стажувався в Імперському коледжі Лондона та в Інституті генетики Кембриджського університету. В подальшому повернувся до Лабораторії молекулярної біології Ради медичних досліджень у Кембриджі, де в 1981 р. очолив групу дослідників.

Грег Вінтер був членом Науково-консультативної ради компанії Covagen (зараз це – частина компанії Cilag), головою Науково-консультативної ради компанії Biosceptre International Ltd. Він також член консультативної групи Cambridge Innovation Capital та попечитель низки трастових фондів.

Грег Вінтер є старшим редактором наукового журналу Protein Engineering Design and Selection, членом редколегії журналу European Journal of Immunology. Заснував три біотехнологічні компанії: Cambridge Antibody Technology (1989), Domantis (2000) і Bicycle Therapeutics (2009). У 1994–2006 рр. Грег Вінтер був керівником відділу хімії та біотехнології протеїнів і нуклеїнових кислот Лабораторії молекулярної біології Ради медичних досліджень, у 2006–2011 рр. працював заступником директора, у 2007–2008 рр. – виконувачем обов'язків директора. Крім того, він був заступником директора Центру білкової інженерії Ради медичних досліджень з 1990 р. до його злиття у 2010 р. з Лабораторією молекулярної біології.

Наукові досягнення Грега Вінтера відзначено медаллю Колворта Біохімічного товариства Великої Британії (1986), премією Луї Жанте в галузі медицини однойменного фонду європейських біомедичних досліджень (1989), пре-



Грег Вінтер  
(Sir Gregory  
P. Winter)

мією Шееле Шведського фармацевтичного товариства (1994), міжнародною премією короля Фейсала з медицини (в галузі молекулярної імунології) (1995), премією Вільяма Б. Коулі Інституту досліджень онкологічних захворювань (1999), Королівською медаллю Лондонського королівського товариства (2011), медаллю «Міленіум» Ради медичних досліджень (2013), премією принца Таїланду Махідола (2016) та багатьма іншими нагородами.

Сер Грег Вінтер є членом Європейського товариства молекулярних біологів (з 1987 р.), Лондонського королівського товариства (з 1990 р.), Австралійської академії технологічних наук та інженерії (з 2002 р.), Академії медичних наук Великої Британії (з 2006 р.) та Консультативної ради Кампанії з науки та техніки (Campaign for Science and Engineering) (з 2010 р.). Він має титул командора Ордена Британської імперії (1997) і титул лицаря-бакалавра (2004). З 2012 р. Г. Вінтер очолив престижний Трінті-коледж Кембриджського університету, в якому навчався не лише він сам, а й багато видатних особистостей – шість британських прем'єр-міністрів, відомі вчені Ісаак Ньютон, Джеймс Максвелл, Ернест Резерфорд, Нілс Бор, поет лорд Байрон, деякі члени британської королівської родини, наприклад принц Чарльз [6].

Що ж саме відкрили лауреати Нобелівської премії з хімії 2018 року? І що таке спрямована еволюція ензимів (ферментів) та фаговий дисплей пептидів і антитіл?

Головна ідея, що об'єднує дослідження, відзначені Нобелівською премією, полягає у використанні еволюції, яка ґрунтується на принципах мінливості та добору, в галузі хімії для вирішення важливого завдання біоінженерії протеїнів: одержання в лабораторних умовах біомолекул з цінними для людини властивостями, які ніколи не існували в природі. Блискуча реалізація цієї ідеї спричинила справжню революцію в хімічній і фармацевтичній промисловості.

Але почнемо спочатку. Протеїни — унікальні сполуки, які є основою всього живого. Це великі полімерні молекули, що складаються з 20 різновидів амінокислот, однак залежно від послідовності цих амінокислот полімерний ланцюг може згортатися, формуючи безліч варіантів просторової структури, що й забезпечує можливість виконання молекулою певних функцій. Протеїни виникли внаслідок еволюції, яка тривала мільйони років. Вони здатні каталізувати біохімічні реакції, специфічно взаємодіяти з іншими молекулами (рецепторами, антигенами тощо), демонструючи при цьому фантастичну ефективність, швидкість, специфічність і можливість тонкої регуляції функцій. Тому не дивно, що люди давно намагалися використати ці молекули для власних потреб. Для того, щоб розширити діапазон можливостей того чи іншого протеїну і надати йому нових корисних для людини властивостей, учені почали генно-інженерними методами замінювати певні амінокислоти в послідовності протеїну, моделюючи за допомогою комп'ютерних програм наслідки таких дій. Однак цей підхід виявився досить складним і не завжди успішним, оскільки одна й та сама амінокислотна послідовність може мати кілька варіантів стійких конфігурацій, до того ж під час взаємодії з іншими молекулами вторинна структура може змінюватися внаслідок перерозподілу зарядів.

Френсіс Арнольд запропонувала елегантне і напрочуд просте рішення цієї проблеми: іміту-

вати еволюцію протеїнів у пробірці, однак значно швидшими темпами, ніж у природі (те, на що природній еволюції знадобилося мільйони років, у лабораторії можна зробити всього за тиждень). Адже природа за допомогою еволюції постійно створює нові неймовірні протеїни, наприклад ферменти, які дозволяють бактеріям «харчуватися» пластмасою.

Отже, в ген протеїну вносили випадкові точкові мутації, які приводили до одиничних амінокислотних замінів у структурі відповідних рекомбінантних протеїнів, синтезованих у клітинах бактерій *E. coli*. Потім проводили тестування та відбір протеїнів з потрібними властивостями (навіть, якщо вони проявлялися лише незначною мірою). У гени відібраних протеїнів знову вносили чергову порцію мутацій і так повторювали кілька разів. Такий підхід було названо методом спрямованої еволюції, а результати його застосування виявилися дуже важливими для прикладної хімії.

Термін «спрямована еволюція» з'явився ще в 1960-х роках після експериментів з «монстром» Шпігельмана — довгим ланцюжком РНК бактеріофага Q $\beta$ , який у пробірці самовідтворювався завдяки РНК-репліказі та надавався штучному добору (відбирали першу синтезовану копію), що сприяло вкороченню ланцюжка його еволюції: через 74 покоління оригінальна РНК довжиною у 4500 нуклеотидних основ перетворилася на карликовий геном, що складався лише з 218 основ [7]. Слід зазначити, що теоретичним підґрунтям для появи методу спрямованої еволюції ферментів стала робота [8], опублікована в 1984 р. німецьким хіміком Манфредом Ейгеном (Manfred Eigen), якому, до речі, також було присуджено Нобелівську премію з хімії (1967) за дослідження екстремально швидких хімічних реакцій, що стимулюються порушенням рівноваги за допомогою дуже коротких імпульсів енергії.

Першим протеїном, який Френсіс Арнольд отримала в 1993 р. за допомогою цього методу, був новий варіант субтилізину E — ензиму, який каталізує розщеплення пептидних зв'язків у протеїнах [9]. Цей новий варіант субтилізину мав підвищену на 18 °C термоста-

більшість і був здатний розщеплювати казеїн в органічному розчиннику (60%-му розчині диметилформаміду) у 256 разів ефективніше, ніж вихідний ензим. Кінцевий варіант ензиму містив 10 критичних амінокислотних замінів, 4 з яких були передбачені за допомогою методів комп'ютерного моделювання і внесені цілеспрямовано, а ще 6 — з'явилися після трьох раундів випадкового мутагенезу та відбору.

Другий крок у розвитку методу спрямованої еволюції зробив голландський дослідник Віллем П.К. Стеммер (Willem P.C. Stemmer). У 1994 р. він запропонував не тільки вносити випадкові мутації в гени ензимів, а й «перемішувати» фрагменти ДНК шляхом випадкового «розрізання» ДНК різних варіантів гена та їх «зшивання», що значно підвищило різноманіття можливих варіантів гена. Ефективність цього підходу було підтверджено В. Стеммером на прикладі ензиму  $\beta$ -лактамази (відповідає за стійкість до антибіотиків), активність якого значно зросла після трьох циклів «перемішування» ДНК і відбору з використанням зростаючої концентрації антибіотика цефотаксиму [10]. Використання методу «перемішування» ДНК дало змогу отримати низку протеїнів з корисними властивостями, наприклад ензим, що каталізує детоксикацію арсенату [11], фермент фукозидазу, одержаний на основі галактозидази [12], зелений флуоресцентний протеїн з підсиленою здатністю до світіння, який часто використовують у дослідженнях як мітку [13]. Слід зазначити, що В. Стеммер був засновником багатьох біотехнологічних компаній і також зробив значний внесок у розвиток методу фагового дисплею, отримання рекомбінантних фрагментів антитіл, розроблення фармацевтичних препаратів на їх основі, працював над проблемою збільшення часу їх виведення з організму. Він, безперечно, міг би стати лауреатом нинішньої Нобелівської премії з хімії, якби не помер від раку в 2013 р. у віці 56 років.

До кінця 1990-х років у лабораторіях В. Стеммера і Ф. Арнольд було розроблено низку нових підходів, які вдосконалили метод спрямованої еволюції ензимів, наприклад StEP (від англ. staggered extension process — покро-

ковий процес розширення) [14]. З'ясувалося, що успішність застосування методу спрямованої еволюції ензимів значною мірою залежить від того, чи є у вихідного ензиму бодай якась схильність до тієї ознаки, яку планується підсилити.

Згодом Френсіс Арнольд отримала велику кількість корисних ензимів з незвичайними властивостями для застосування в хімічній та фармацевтичній промисловості. Наприклад, на основі родини генів цитохрому P450 одержано низку ензимів, здатних каталізувати хімічні реакції циклопропанування, азидування, сульфідкування, амінування бензильних C–H зв'язків, вставки N–H зв'язку [15]. Ці реакції використовують для синтезу штучних матеріалів і фармацевтичних препаратів. Нещодавно в лабораторії Ф. Арнольд було отримано цінний фермент для виробництва високонапружених карбоциклів [16]. Метод спрямованої еволюції було застосовано одночасно до кількох ензимів певного метаболічного шляху, що дозволило налагодити виробництво в *E. coli* каротиноїдів [17] та L-метіоніну [18]. Френсіс Арнольд довела, що за допомогою методу спрямованої еволюції можна отримати такий ензим, який однаково ефективно працюватиме як за високих, так і за низьких температур [19]. Також вона успішно провела роботу зі зміни кофакторної залежності ферментів, що беруть участь у перетворенні простих цукрів на ізобутанол, отримавши можливість виробляти у необмеженій кількості екологічно чисте біопаливо для автомобілів майбутнього [20].

За допомогою методу спрямованої еволюції стало можливим одержувати ензими, які каталізують реакції, що ніколи не відбувалися в природі, наприклад енантіоселективне внутрішньомолекулярне амінування C–H [21], утворення вуглецево-боранового зв'язку [22] або ж утворення зв'язку між атомом вуглецю та атомом кремнію [23]. Стало також реальним проводити відомі реакції у змінених умовах: за присутності органічних розчинників, в агресивних середовищах, за високих або низьких температур та ін. Крім того, хімічне виробництво стало більш екологічним завдяки утво-

ренню набагато меншої кількості побічних продуктів, можливості відмовитися від використання великих об'ємів органічних розчинників і важких металів як каталізаторів реакцій.

Приблизно одночасно з появою методу спрямованої еволюції ензимів було розроблено ще один метод, в основі якого лежали еволюційні принципи мінливості та добору — метод фагового дисплею, розроблений Джорджем Смітом у 1985 р. [24] для вирішення актуального на той час завдання: встановлення місцезнаходження в геномі генів, що кодують відомі протеїни. Джордж Сміт запропонував використати для цього бактеріофаги (або просто фаги) — віруси, що проникають у бактерії і використовують їх для копіювання вірусного геному та синтезу власних протеїнів. Фрагменти невідомої ДНК вставляли в ДНК фагів M13 (достатньо великих за розміром) в районі гена протеїну III — одного з п'яти протеїнів вірусної оболонки (капсиду). Після інфікування цими фагами бактерій *E. coli* у клітинах синтезувалися капсидні протеїни, злиті з невідомими протеїнами, які після збирання фагових частинок стирчали назовні. Утворювалася ціла фагова бібліотека невідомих протеїнів, з якої необхідно було відібрати вірусні частинки, що несли на своїй поверхні певний відомий протеїн. Це можна було зробити за допомогою специфічних до нього антитіл, іммобілізованих на твердому носії. Після відбору залишалося лише прочитати геном фага і дізнатися нуклеотидну послідовність гена, що кодує досліджуваний протеїн.

Згодом виявилось, що метод фагового дисплею може бути дуже корисним для вирішення інших завдань, наприклад для пошуку пептидів, здатних взаємодіяти з певними протеїнами (в тому числі з антитілами). Для цього у фаги вставляли довільні нуклеотидні послідовності й інфікували фагами бактерії. У процесі розмноження фагів їх ДНК зазнавала природних мутацій, і в результаті відбору отримували фаги, які виявляли хоча б слабку взаємодію з досліджуваним протеїном чи антитілом. Одержаними фагами знову інфікували бактерії і знову все повторювали. Виявилось, що всього

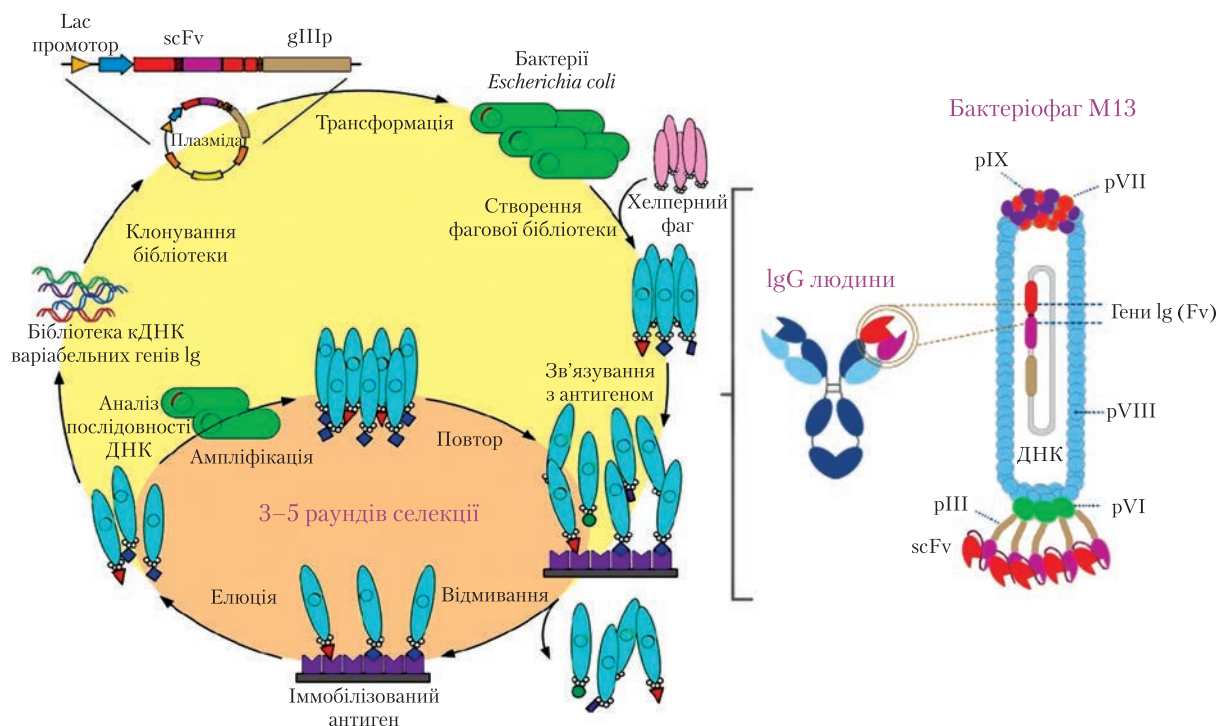
за 5 раундів відбору можна отримати фагові частинки з пептидами, що досить сильно взаємодіють з іммобілізованим протеїном, дізнатися нуклеотидну послідовність, яка кодує ці пептиди, і отримувати їх у практично необмежених кількостях у клітинах бактерій.

У 1988 р. Джордж Сміт запропонував [25] (практично одночасно з іншими дослідниками [26]) використовувати фагові бібліотеки пептидів з випадковими послідовностями для епітопного картування антитіл — визначення амінокислотної послідовності, з якою зв'язується активний центр антитіла. І в 1990 р. в журналі *Science* вийшло водночас дві статті з повідомленнями про створення таких бібліотек: бібліотека Девліна містила 20 млн 15-мерних пептидів [27], а бібліотека Сміта — 40 млн 6-мерних пептидів [28].

У тому ж 1990 р. стався ще один прорив: Грег Вінтер повідомив про успішне застосування методу фагового дисплею для одержання рекомбінантних фрагментів антитіл, які на поверхні фага зберігають здатність взаємодіяти з певним антигеном [29]. Антитіла є протеїнами класу імуноглобулінів, молекули яких досить великі (мінімум близько 150 кДа). Вони складаються з 4 поліпептидних ланцюгів (двох однакових легких і двох однакових важких), з'єднаних дисульфідними зв'язками. В кожному пептидному ланцюзі є внутрішні дисульфідні зв'язки, що формують відповідну конформацію, яка зветься доменом (їх чотири у важкому ланцюзі і, як правило, два — у легкому). Антитіла мають на  $\text{NH}_2$ -кінцях відповідно 4 варіабельних домени (по одному в кожному ланцюзі), які попарно (варіабельний домен легкого ланцюга разом з варіабельним доменом важкого) утворюють 2 активні центри молекули антитіла, що здатні специфічно зв'язуватися з певним антигеном. Різноманіття можливих конформацій активних центрів антитіл є практично безмежним, особливо якщо врахувати існування механізму соматичних гіпермутацій. Саме тому організм може виробити імунітет до будь-якого раніше невідомого антигена.

Зрозуміло, що молекула антитіла не могла бути експонована на поверхні фагової частин-





Принцип методу фагового дисплею на прикладі одержання scFv-антитіл певної специфічності з бібліотеки кДНК варіабельних генів імунoglobулінів людини. На рисунку позначено pIII, pVI, pVII, pVIII, pIX протеїни оболонки (капсиду) бактеріофага M13, які можуть використовуватися для фагового дисплею

ки через свої великі розміри, тому Грег Вінтер використав ДНК, яка кодувала лише два варіабельні домени антитіла, з'єднані коротким пептидним «містком» (лінкером). Отримані рекомбінантні антитіла фактично були активними центрами нативних антитіл, тому їх назвали scFv-антитілами (від англ. single chain fragment variable – одноланцюгові варіабельні фрагменти). Перше scFv-антитіло, одержане методом фагового дисплею, специфічно розпізнавало лізоцим курячого яйця і не давало перехресних реакцій з іншими антигенами. У 1991 р. Грег Вінтер одночасно з іншими дослідниками [30] отримав за допомогою фагового дисплею рекомбінантні Fab-фрагменти антитіл, що збиралися на поверхні фага і мали 4 варіабельних домени і, відповідно, два активних центри [31].

Заслугою Грега Вінтера є також те, що саме він запропонував створити великі комбінаторні фагові бібліотеки, що містять усі можливі

комбінації генів варіабельних доменів антитіл, з яких шляхом відбору можна отримати scFv-антитіло до будь-якого антигена. Крім того, специфічність і силу зв'язування з антигеном (афінність) цих scFv-антитіл можна підвищити проведенням кількох раундів відбору і внесенням у ДНК фага природних мутацій на кожному етапі. Це було підтверджено експериментально при одержанні антитіл проти 2-фенілоксазол-5-ону (phOx) з імунної фагової бібліотеки миші [32]. Одночасно Річард Лернер (Richard A. Lerner) зі співробітниками отримали з нативної фагової бібліотеки людини високоафінні Fab-фрагменти людини проти глікопротеїну gp120 вірусу імунodefіциту людини [33].

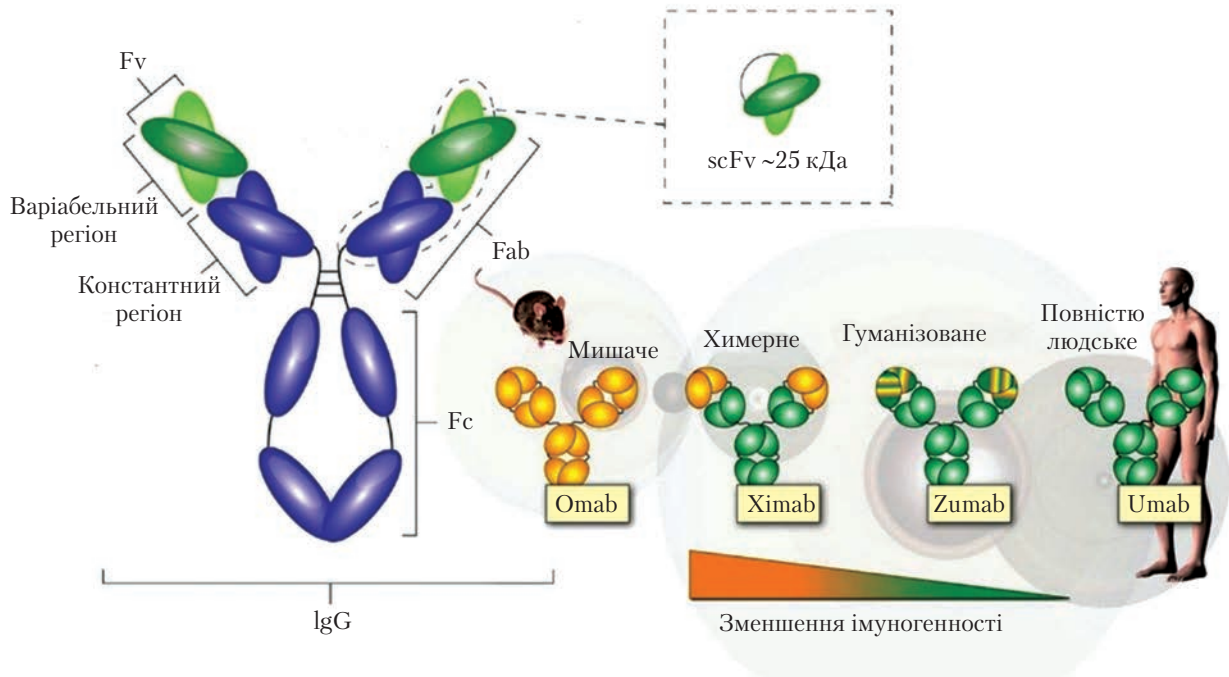
Фантастична ідея, запропонована Грегом Вінтером, спричинила справжню революцію у фармацевтичній промисловості, відкривши захмарні перспективи для виробництва препаратів на основі терапевтичних антитіл. Звичай-

но, антитіла здавна широко використовували в медицині для діагностики та лікування різних захворювань (специфічні поліклональні та моноклональні антитіла тваринного походження або ж неспецифічні імуноглобуліни людини, отримані з крові донорів). Однак використання антитіл обмежувалося ймовірністю появи у пацієнтів важких побічних реакцій на введення чужорідних протеїнів, а також складністю одержання антитіл до деяких антигенів (наприклад, до токсинів). Спочатку для вирішення цієї проблеми було запропоновано (до речі, також Грегом Вінтером) проводити «гуманізацію» моноклональних антитіл миші, при цьому найбільш антигенні ділянки мишачих антитіл з використанням генної інженерії замінювали на відповідні ділянки антитіл людини. Завдяки роботам Грега Вінтера з розроблення «гуманізованих» антитіл у подальшому стала можливою поява таких відомих препаратів, як трастузумаб (Herceptin) для лікування раку молочної залози і бевацизумаб (Avastin) для лікування деяких видів раку та вікової макулярної дегенерації. Однак безперечними перевагами фагового дисплею були швидкість, дешевизна, відсутність необхідності використання імунізованих лабораторних тварин для отримання антитіл і гібридом (гібридів лімфоцитів і ракових клітин, що продукують моноклональні антитіла), можливість отримання саме антитіл людини, що не викликають сторонніх реакцій при введенні, одержання рекомбінантних антитіл у практично необмеженій кількості в клітинах бактерій-продуцентів, а також можливість отримання антитіл до будь-якого антигена (навіть до токсичного для ссавців або до власного протеїну людського організму).

Крім мишачих і людських, було отримано фагові бібліотеки генів імуноглобулінів інших видів тварин. Виявилось, що в деяких тварин (верблюдів, лам, акул) антитіла мають лише 2 варіабельних домени, кожний з яких здатен самостійно зв'язуватися з антигеном [34]. Однодоменні рекомбінантні антитіла на їх основі (нанободі) використовують для діагностики та лікування багатьох захворювань, зокрема

онкологічних і аутоімунних [35]. Також знайдено подібні однодоменні антитіла людини та миші (dAb — від англ. domain antibody), здатні взаємодіяти з антигеном, хоча і менш ефективно [36]. Рекомбінантні антитіла можуть бути біспецифічними, мультимерними, являти собою комбінації варіабельного домену з різною кількістю константних доменів тощо. Можна отримувати конструкції різної мультимерності, що складаються з декількох (від 1 до 4) scFv, змінюючи довжину лінкера відповідно від 12 до 3 амінокислотних залишків [37]. Згодом було розроблено рибосомний [38], бактеріальний [39] та еукаріотичний (у клітинах ссавців чи дріжджів) [40] дисплей, однак фаговий дисплей залишається найпоширенішим.

Засновані Грегом Вінтером компанії Cambridge Antibody Technology, Domantis і Bicycle Therapeutics розвивають різні біотехнологічні напрями, пов'язані з використанням фагового дисплею. Робота Bicycle Therapeutics зосереджена на синтезі терапевтичних біциклічних пептидів (цей напрям сам Грег Вінтер вважає одним з найперспективніших). Завдяки невеликим розмірам такі пептиди здатні проникати глибоко у тканини, а їх жорстка структура запобігає швидкому виведенню з організму. Компанія Domantis займається розробленням однодоменних антитіл людини (dAbs) проти цитокінів, пухлинних антигенів і факторів росту, клітинних рецепторів тощо. Cambridge Antibody Technology працює над одержанням терапевтичних антитіл за допомогою фагового і рибосомного дисплею. Цю компанію часто називають «коштовністю в короні» британської біотехнологічної промисловості. Вона прославилася у 1990-х роках розробленням за участю Грега Вінтера препарату адалімумаб — першого генно-інженерного моноклонального антитіла людини, одержаного за допомогою фагового дисплею, проти фактора некрозу пухлин (TNF) альфа, що відіграє важливу роль у виникненні запалення при багатьох аутоімунних захворюваннях [41]. У 2002 р. адалімумаб було затверджено для лікування ревматоїдного артриту, і зараз його також використовують для лікування псоріазу та запальних



Будова молекули повнорозмірного антитіла, його фрагментів і scFv-антитіла, а також класифікація терапевтичних антитіл за походженням. Наведено типові закінчення в назвах терапевтичних антитіл різних класів для антитіл, одержаних до 2017 р. Нещодавно було вирішено відмовитися від шифрування походження антитіла в назві у зв'язку зі зростаючим розмиванням кордонів між різними класами антитіл унаслідок розвитку рекомбінантних технологій (Parren P.W.H.I., Carter P.J., Plückerthun A. Changes to International Nonproprietary Names for antibody therapeutics 2017 and beyond: of mice, men and more. *MAbs*. 2017. 9(6): 898-906)

захворювань кишечника. Підрозділ компанії Abbott Laboratories, яка отримала права на препарат, випускає адалімумаб під торговою назвою «Хуміра». У 2017 р. обсяги продажу цього найпопулярнішого у світі препарату перевищили 18 млрд дол. США, незважаючи на появу на ринку кількох його аналогів. Ще однією відомою розробкою Cambridge Antibody Technology є белімумаб («Бенліста») – генно-інженерне моноклональне антитіло людини проти BAFF (фактора активації В-клітин) або BLyS (стимулятора В-лімфоцитів) для лікування аутоімунного захворювання – системного червоного вовчак. Незважаючи на скромніші успіхи белімумабу, він став першим терапевтичним препаратом для лікування цього захворювання за останні 50 років, і у 2011 р. його затверджено до використання в США. Успішними виявилися також генно-

інженерні препарати на основі антитіл людини для лікування сибірки [42] та деяких форм раку. У 2006 р. Cambridge Antibody Technology і Domantis були придбані, відповідно, фармацевтичними гігантами AstraZeneca (за 702 млн фунтів) і GlaxoSmithKline (за 230 млн фунтів). На сьогодні у медичній практиці використовують понад 50 нових препаратів на основі генно-інженерних антитіл, і щороку до їх числа додається 3–5 нових. Очікується, що до 2020 р. продажі терапевтичних антитіл сягнуть 106 млрд євро.

Крім фагового дисплею розвиваються й інші підходи для одержання терапевтичних антитіл людини. У 1991 р. вперше було отримано трансгенних мишей, здатних синтезувати антитіла людини [43]. З того часу ця альтернативна технологія значно розвинулася. Перші покоління таких трансгенних мишей мали низку недолі-

ків: вони могли синтезувати лише якийсь певне антитіло людини, були імунодефіцитними. Зараз уже є миші, які можуть продукувати весь спектр можливих антитіл людини і водночас розвивають повноцінну імунну відповідь миші [44]. Трансгенних мишей було використано для розроблення другого комерційного, після адаліумабу, повністю людського моноклонального антитіла – панітумабу, яке є специфічним до рецептора епідермального фактора росту (EGFR). У 2006 р. його затверджено для лікування колоректального раку. Останнім часом одержано не тільки трансгенних мишей, а й трансгенних щурів, а також велику рогату худобу [45]. Одним з останніх досягнень цього підходу є розроблення препарату Yervoy (іпіліумаб) – моноклонального антитіла людини проти CTLA-4/CD152, яке було затверджено у 2011 р. для лікування меланоми [46]. До речі, 2018 р. за відкриття механізмів, завдяки яким це антитіло успішно працює, присуджено Нобелівську премію з фізіології та медицини.

Незважаючи на успіхи трансгенних технологій, фаговий дисплей набув більш широкого використання в галузі одержання антитіл, що входять до складу фармацевтичних препаратів, діагностиків, вакцин, систем доставки лікарських засобів (наприклад, на основі ліпосом), імунотоксинів (для лікування онкологічних і аутоімунних захворювань), інтрабоді (молекулярних зондів для дослідження внутрішньоклітинних процесів у динаміці). Такі рекомбінантні антитіла можуть бути об'єднані на рівні ДНК з різноманітними маркерними молекулами, такими як флуоресцентні протеїни, ензими [47] або специфічні теги (наприклад, полістеринзв'язувальний пептид або PS-тег, що використовується для орієнтованої іммобілізації антитіла на поверхні полістиролу в діагностичних тест-системах [48]).

Зараз інформація про амінокислотну послідовність пептидів, що взаємодіють з різними антигенами, накопичується в базі даних загального доступу VDB, а метод фагового дисплею використовується в дослідницьких лабораторіях по всьому світу, і Україна не є винятком. Так, в Інституті молекулярної біо-

логії та генетики НАН України у відділі регуляторних механізмів клітини під керівництвом члена-кореспондента НАН України, академіка НАМН України В.А. Кордюма з імунної комбінаторної бібліотеки кДНК V-генів імуноглобулінів миші отримано scFv-антитіла проти різних типів інтерферону, на основі яких можуть бути створені високочутливі тест-системи для виявлення інтерферону [49].

Уже понад 15 років технологію фагового дисплею застосовують у відділі молекулярної імунології Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України. Співробітники відділу одержали низку scFv-антитіл, що можуть бути використані для діагностики та лікування небезпечних інфекційних захворювань, а також як інструмент фундаментальних досліджень. Зі створених у відділі бібліотек генів імуноглобулінів миші та людини за допомогою методу фагового дисплею отримано високоафінні scFv-антитіла миші та людини проти дифтерійного токсину (ДТ) [50–52]. Ці scFv-антитіла можуть використовуватися при розробленні тест-систем для діагностики дифтерії, а їх злиття з протеїном А золотистого стафілокока дозволяє використовувати їх в імуноензимних тест-системах з комерційними кон'югатами будь-якої видової належності [53]. Крім того, scFv-антитіла людини проти В-субодиниці токсину можуть входити до складу імунотерапевтичних препаратів для лікування дифтерії, оскільки вони мають токсиннейтралізуючі властивості та завдяки малим розмірам і людському походженню не викликають алергічних реакцій у хворих [54].

Одержані scFv-антитіла до гепаринзв'язуючого фактора росту, подібного до епідермального фактора росту (HB-EGF – від англ. heparin binding epidermal growth factor – like growth factor) [55], було застосовано при розробленні імуноліпосом для спрямованої доставки лікарських речовин у пухлини, що експресують у значній кількості онкомаркер proHB-EGF [56]. До того ж такі антитіла самі можуть мати протипухлинні властивості, пригнічуючи розмноження клітин внаслідок блокування мітогенної дії proHB-EGF. А оскільки proHB-EGF

є рецептором для ДТ, то таке блокування, ймовірно, може запобігати токсичному ураженню тканин при дифтерії.

Крім того, одержано scFv-антитіла до антигенів МРТ63 та МРТ83 збудника туберкульозу, що можуть використовуватися в тест-системах для діагностики цього захворювання [57]. І хоча традиційно вважають, що головну роль у захисті від туберкульозу відіграє клітинний імунітет, останнім часом з'являється все більше відомостей, що антитіла проти антигенів збудника можуть обмежувати його поширення і, можливо, запобігати інфікуванню через слизові оболонки [58].

Одержані scFv-антитіла до послідовності Pro144-Leu155 протеїну С людини (фактора згортання крові XIV — ключового компонента антикоагуляційної системи крові) можуть застосовуватися для кількісного визначення протеїну С в імуноензимному аналізі, що має важливе діагностичне значення, адже зниження кількості протеїну С корелює з ризиком тромбогенезу [59]. Поза тим, отримано scFv-антитіла до нікотинового ацетилхолінового рецептора  $\alpha 7$ -субтипу ( $\alpha 7$ -nAChR), зміни експресії якого спостерігаються в мозку при хворобах Альцгеймера, Паркінсона та шизофренії. Цікаво, що антитіла проти цього рецептора можуть з'являтися у хворих на нейродегенеративні захворювання, а їх виявлення у здорових людей може бути свідченням ризику виникнення хвороби Альцгеймера [60]. scFv-антитіла проти  $\alpha 7$ -nAChR, які генно-інженерними методами були об'єднані з червоним флуоресцентним білком mCherry, можуть використовуватися для визначення рівня експресії  $\alpha 7$ -nAChR на клітинах.

У 2003 р. на базі Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України Федерацією європейських біохімічних товариств (FEBS) було проведено поглиблені курси з молекулярної імунології і використання методів фагового дисплею, в яких взяли участь молоді науковці з багатьох європейських країн та деякі всесвітньо відомі імунологи.

У 2015 р. колекцію рекомбінантних антитіл людини та гібридом-продуцентів моноклональ-

них антитіл Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України було внесено до Державного реєстру наукових об'єктів, що становлять національне надбання. Ця колекція має винятково важливе значення для подальшого розвитку фундаментальних і прикладних напрямів біології та медицини, а також відкриває широкі можливості для розвитку біотехнології антитіл не лише в Інституті біохімії, а й в інших наукових установах України. У 2016 р. п'ятьох співробітників Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України було відзначено Державною премією України в галузі науки і техніки за впровадження методів отримання одноланцюгових і моноклональних антитіл.

Антитіла, створені за допомогою фагового дисплею та генно-інженерних технологій за бажанням людини, дійсно є універсальним інструментом для лікування найрізноманітніших захворювань. Наступним проривом у цій галузі могло б стати винайдення способу створення антитіл з дуже тривалим періодом напіввиведення з організму людини. Зараз дослідники намагаються рухатися в цьому напрямі, приєднуючи до антитіл поліетиленгліколь [61] або створюючи мультимерні конструкції. Такі ліки з пролонгованою дією можна було б приймати раз чи два на рік, значно знизивши вартість курсу лікування (хоча фармацевтичні компанії навряд чи зраділи би таким відкриттям).

Сьогодні метод спрямованої еволюції ензимів широко використовують для масового виробництва багатьох продуктів: підсилювачів смаку, ліків проти діабету та атеросклерозу, ліпідознижуючих фармакологічних препаратів. У неймовірно великих масштабах виробляють промислові хімікати та ліпази, що входять до складу миючих засобів. Відкриття цього методу має не тільки велике прикладне значення. Зокрема, воно дає безцінний фактичний матеріал для розвитку фундаментальної науки, кращого розуміння хімії та фізики біополімерів, вдосконалення комп'ютерних програм для моделювання протеїнів з певними властивостями, передбачення властивостей невивчених природних протеїнів тощо.

Перспективними напрямками розвитку методу спрямованої еволюції ферментів вважають такі підходи, як розроблення гібридних металоорганічних каталізаторів, створення великих бібліотек кДНК мутантних ферментів і використання еукаріотичного дисплею [62], нових методів швидкого скринінгу [63], а також розширення діапазону реактивності через включення до складу ензимів нових функціоналізованих неприродних амінокислот (так зване «розширення генетичного коду») [64]. На наших очах відбувається революція в хімії: перехід від синтетичної хімії, яка використовує продукти нафтопереробки і важкі метали, до

ДНК-програмованого хімічного синтезу, який є більш ефективним, селективним і екологічно чистим [65].

Ймовірно, що у майбутньому вчені з легкістю зможуть отримати ензими для проведення будь-якої реакції або антитіла для лікування будь-якого захворювання лише на основі точних розрахунків будови молекули. Зараз ми лише починаємо підіймати завісу над молекулярними таємницями природи, і запозичення еволюційної методології, запропоноване нобелівськими лауреатами з хімії 2018 р., значно допомагає пришвидшити цей процес і отримати фантастичні практичні розробки, корисні для людства.

## REFERENCES

## [СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ]

1. The 2018 Clarivate Citation Laureates. <https://web.ornl.gov/sci/first/ClarivateAnalyticsCitationLaureates.pdf>
2. The Nobel Prize in Chemistry 2018. Press Release. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/press-release/>
3. Nobel prize in literature 2018 cancelled after sexual assault scandal. <https://www.theguardian.com/books/2018/may/04/nobel-prize-for-literature-2018-cancelled-after-sexual-assault-scandal/>
4. Frances Arnold. Wikipedia. [https://en.wikipedia.org/wiki/Frances\\_Arnold](https://en.wikipedia.org/wiki/Frances_Arnold)
5. George Smith. Wikipedia. [https://en.wikipedia.org/wiki/George\\_Smith\\_\(chemist\)](https://en.wikipedia.org/wiki/George_Smith_(chemist))
6. Greg Winter. Wikipedia. [https://en.wikipedia.org/wiki/Greg\\_Winter](https://en.wikipedia.org/wiki/Greg_Winter)
7. Spiegelman S., Haruna I., Holland I.B., Beaudreau G., Mills D. The Synthesis of a Self-propagating and Infectious Nucleic Acid with a Purified Enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1965. **54**(3): 919. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.54.3.919>
8. Eigen M., Gardiner W. Evolutionary molecular engineering based on RNA replication. *Pure Appl. Chem*. 1984. **56**(8): 967. <http://dx.doi.org/10.1351/pac198456080967>
9. Chen K., Arnold F.H. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. **90**(12): 5618. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.12.5618>
10. Stemmer W.P. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*. 1994. **370**(6488): 389. <http://dx.doi.org/10.1038/370389a0>
11. Cramer A., Dawes G., Rodriguez E. Jr., Silver S., Stemmer W.P. Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.* 1997. **15**(5): 436. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0597-436>
12. Zhang J.H., Dawes G., Stemmer W.P. Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. **94**(9): 4504. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.94.9.4504>
13. Cramer A., Whitehorn E.A., Tate E., Stemmer W.P. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.* 1996. **14**(3): 315. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0396-315>
14. Zhao H., Giver L., Shao Z., Affholter J.A., Arnold F.H. Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat. Biotechnol.* 1998. **16**(3): 258. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0398-258>
15. Arnold F. The nature of chemical innovation: new enzymes by evolution. *Q. Rev. Biophys.* 2015. **48**(4): 404. <http://dx.doi.org/10.1017/S003358351500013X>
16. Chen K., Huang X., Kan S.B.J., Zhang R.K., Arnold F.H. Enzymatic construction of highly strained carbocycles. *Science*. 2018. **360**(6384): 71. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aar4239>
17. Schmidt-Dannert C., Umeno D., Arnold F.H. Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nat. Biotechnol.* 2000. **18**(7): 750. <http://dx.doi.org/10.1038/77319>

18. May O., Nguyen P.T., Arnold F.H. Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat. Biotechnol.* 2000. **18**(3): 317. <https://doi.org/10.1038/73773>
19. Wintrode P.L., Miyasaki K., Arnold F.H. Patterns of adaptation in a laboratory evolved thermophilic enzyme. *BBA Protein Struct. Mol. Evol.* 2001. **1549**(1): 1. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00226-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00226-6)
20. Bastian S., Liu X., Meyerowitz J.T., Snow C.D., Chen M.M.Y., Arnold F.H. Engineered ketol-acid reductoisomerase and alcohol dehydrogenase enable anaerobic 2-methylpropan-1-ol production at theoretical yield in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 2011. **13**(3): 345. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.02.004>
21. McIntosh J.A., Coelho P.S., Farwell C.C., Wang Z.J., Lewis J.C., Brown T.R., Arnold F.H. Enantioselective intramolecular C-H amination catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes in vitro and in vivo. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2013. **52**(35): 9309. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201304401>
22. Kan S.B.J., Huang X., Gumulya Y., Chen K., Arnold F.H. Genetically programmed chiral organoborane synthesis. *Nature.* 2017. **552**(7683): 132. <http://dx.doi.org/10.1038/nature24996>
23. Kan S.B., Lewis R.D., Chen K., Arnold F.H. Directed evolution of cytochrome c for carbon-silicon bond formation: Bringing silicon to life. *Science.* 2016. **354**(6315): 1048. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aah6219>
24. Smith G.P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985. **228**(4705): 1315. <http://dx.doi.org/10.1126/science.4001944>
25. Parmley S.F., Smith G.P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene.* 1988. **73**(2): 305. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90495-7](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(88)90495-7)
26. de la Cruz V.F., Lal A.A., McCutchan T.F. Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J. Biol. Chem.* 1988. **263**(9): 4318.
27. Devlin J.J., Panganiban L.C., Devlin P.E. Random peptide libraries: a source of specific protein-binding molecules. *Science.* 1990. **249**(4967): 404. <http://dx.doi.org/10.1126/science.2143033>
28. Scott J.K., Smith G.P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science.* 1990. **249**(4967): 386. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1696028>
29. McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature.* 1990. **348**(6301): 552. <http://dx.doi.org/10.1038/348552a0>
30. Kang A.S., Barbas C.F., Janda K.D., Benkovic S.J., Lerner R.A. Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1991. **88**(10): 4363. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.10.4363>
31. Hoogenboom H.R., Griffiths A.D., Johnson K.S., Chiswell D.J., Hudson P., Winter G. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucl. Acid. Res.* 1991. **19**(15): 4133. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/19.15.4133>
32. Clackson T., Hoogenboom H.R., Bonnert T.P., McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature.* 1991. **352**(6336): 624. <http://dx.doi.org/10.1038/352624a0>
33. Burton D.R., Barbas C.F. 3rd, Persson M.A., Koenig S., Chanock R.M., Lerner R.A. A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1991. **88**(22): 10134. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.22.10134>
34. Kovalenko O.V., Olland A., Piché-Nicholas N.J. Atypical antigen recognition mode of a shark immunoglobulin new antigen receptor (IgNAR) variable domain characterized by humanization and structural analysis. *Biol. Chem.* 2013. **288**(24): 17408. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.435289>
35. Siontorou C.G. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. *Int. J. Nanomedicine.* 2013. (8): 4215. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S39428>
36. Holt L.J., Herring Ch., Jespers L.S. et al. Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends Biotechnol.* 2003. **21**(11): 484. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.08.007>
37. Guo J., Cai M. New type recombinant antibody fragment scFv multimer and cancer targeting. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 2003. **20**(2): 361.
38. Hanes J., Plückthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1997. **94**(10): 4937.
39. Georgiou G., Staphopolous C., Daugherty P., Nayak A.R., Iverson B.L., Curtiss R. 3rd. Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nature Biotech.* 1997. **15**(1): 29. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0197-29>
40. Boder E.T., Wittrup K.D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature Biotech.* 1997. **15**(6): 553. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0697-553>

41. Jespers L.S., Roberts A., Mahler S.M., Winter G., Hoogenboom H.R. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. *Biotechnology (NY)*. 1994. **12**(9): 899. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0994-899>
42. Cirino N.M., Sblattero D., Allen D., Peterson S.R., Marks J.D., Jackson P.J., Bradbury A., Lehnert B.E. Disruption of anthrax toxin binding with the use of human antibodies and competitive inhibitors. *Infect. Immun.* 1999. **67**(6): 2957.
43. Brüggemann M., Spicer C., Buluwela L., Rosewell I., Barton S., Surani M.A., Rabbitts T.H. Human antibody production in transgenic mice: expression from 100 kb of the human IgH locus. *Eur. J. Immunol.* 1991. **21**(5): 1323. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830210535>
44. Moran N. Mouse platforms jostle for slice of humanized antibody market. *Nat. Biotechnol.* 2013. **31**(4): 267. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0413-267>
45. Brüggemann M., Osborn M.J., Ma B., Hayre J., Avis S., Lundstrom B., Buelow R. Human antibody production in transgenic animals. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 2015. **63**(2): 101. <http://dx.doi.org/10.1007/s00005-014-0322-x>
46. Wolchok J.D., Hodi F.S., Weber J.S., Allison J.P., Urba W.J., Robert C., O'Day S.J., Hoos A., Humphrey R., Berman D.M., Lonberg N., Korman A.J., Ann N.Y. Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Acad. Sci.* 2013. (1291): 1. <http://dx.doi.org/10.1111/nyas.12180>
47. Oyama H., Tanaka E., Kawanaka T. et al. Anti-idiotypic scFv-enzyme fusion proteins: a clonable analyte-mimicking probe for standardized immunoassays targeting small biomarker. *Anal. Chem.* 2013. **85**(23): 11553. <http://dx.doi.org/10.1021/ac402868f>
48. Kumada Y., Hamasaki K., Shiritani Y. et al. Direct immobilization of functional single-chain variable fragment antibodies (scFvs) onto a polystyrene plate by genetic fusion of a polystyrene-binding peptide (PS-tag). *Anal. Bioanal. Chem.* 2009. **395**(3): 759. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-009-2999-y>
49. Pavlova M.V., Nikolaev Iu.S., Irodov D.M., Okunev O.V., Kordium V.A., Gil'chuk P.V. Characterization of a panel of mouse single-chain antibodies against recombinant human interferon beta1b. *Tsitol. Genet.* 2008. **42**(4): 3.
50. Oliinyk O.S., Kaberniuk A.A., Redchuk T.A., Korotkevich N.V., Labyntsev A.J., Romanyuk S.I., Kolibo D.V., Komisarenko S.V. Construction of immune library of murine immunoglobulin genes and screening of single-chain Fv-antibodies to diphtheria toxin b subunit. *Ukr. Biochem. J.* 2009. **81**(2): 68.  
[Олійник О.С., Кабернюк А.А., Редчук Т.А., Короткевич Н.В., Лабинцев А.Ю., Романюк С.І., Колибо Д.В., Комісаренко С.В. Створення імунної бібліотеки імуноглобулінових генів миші та відбір одноланцюгових Fv-антитіл, специфічних до В-субодиниці дифтерійного токсину. *Український біохімічний журнал*. 2009. Т. 81, № 2. С. 68–79.]
51. Oliinyk O.S., Kaberniuk A.A., Burkaleva D.O., Romaniuk S.I., Kolibo D.V., Shepelyakovskaya A.O., Laman A.G., Komisarenko S.V. Obtaining of recombinant scFv-antibodies against diphtheria toxin using phage display system. *Ukr. Biochem. J.* 2007. **79**(5): 91.  
[Олейник Е.С., Кабернюк А.А., Буркалева Д.А., Романюк С.И., Колибо Д.В., Шепеляковская А.О., Ламан А.Г., Комисаренко С.В. Получение рекомбинантных scFv-антител против дифтерийного токсина методом фагового дисплея. *Український біохімічний журнал*. 2007. Т. 79, № 5. С. 91–97.]
52. Oliinyk O.S., Kaberniuk A.A., Kolibo D.V., Komisarenko S.V. Single chain variable fragments of antibodies against diphtheria toxin b-subunit isolated from phage display human antibody library. *Biotechnologia Acta*. 2014. **7**(1): 54. <http://dx.doi.org/10.15407/biotech7.01.054>
53. Oliinyk O.S., Kaberniuk A.A., Redchuk T.A., Kolibo D.V., Komisarenko S.V. Construction of bifunctional molecules specific to antigen and antibody's Fc-fragment by fusion of scFv-antibodies with staphylococcal protein A. *Biopolym. Cell*. 2009. **25**(3): 245. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0007E3>
54. Oliinyk O.S., Labyntsev A.J., Korotkevich N.V., Kolibo D.V., Komisarenko S.V. Study on toxin-neutralization properties of recombinant single-chain variable antibody's fragments against diphtheria toxin B subunit. *Biopolym. Cell*. 2009. **25**(4): 315. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0007EB>
55. Oliinyk O.S., Kaberniuk A.A., Kolibo D.V., Komisarenko S.V. Isolation and characterisation of recombinant single chain variable fragment antibodies (scFv) against human heparinbinding EGF-like growth factor. *Biotechnologia*. 2012. **5**(6): 61.  
[Олійник О.С., Кабернюк А.А., Колибо Д.В., Комісаренко С.В. Одержання та характеристика рекомбінантних одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіл (ScFv) проти гепаринзв'язувального EGF-подібного фактора росту людини. *Біотехнологія*. 2012. Т. 5, № 6. С. 61–70.]



56. Oliinyk O.S., Labyntsev A.J., Manoylov K.Yu., Kolibo D.V., Komisarenko S.V. Immunoliposomes for the targeted delivery of biologically active compounds into tumor tissue cells. In: *Nano-size systems and nanomaterials: research in Ukraine*. (Kyiv: Akadempriodyka, 2014).  
[Олейник Е.С., Лабынцев А.Ю., Манойлов К.Ю., Колибо Д.В., Комисаренко С.В. Иммунолипосомы для направленной доставки биологически активных соединений в клетки опухолевых тканей. В кн.: *Наноразмерные системы и наноматериалы: исследования в Украине*. Киев: Академперіодика, 2014. С. 510–514.]
57. Palyvoda K.O., Oliinyk O.S., Kolibo D.V., Komisarenko S.V. Obtaining and characterization of recombinant single-chain variable antibody fragments (scFv) against MRT63. *Ukr. Biochem. J.* 2014. **86**(5): 121.  
[Паливода К.О., Олійник О.С., Колибо Д.В., Комісаренко С.В. Отримання та характеристика рекомбінантних однокланцових варіабельних фрагментів антитіл (scFv) проти МРТ63. Тези XI Укр. біохім. конгр. (6–10 жовтня 2014, Київ). *Український біохімічний журнал*. 2014. Т. 86, №5 (II). С. 121.]
58. Jacobs A.J., Mongkolsapaya J., Sreaton G.R., McShane H., Wilkinson R.J. Antibodies and tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016. (101): 102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2016.08.001>
59. Oliinyk O.S., Palyvoda K.O., Lugovskaya N.E., Kolibo D.V., Lugovskoy E.V., Komisarenko S.V. Recombinant single chain variable fragment antibodies (scFv) against Pro144–Leu155 fragment of human protein C. *Ukr. Biochem. J.* 2015. **87**(2): 88. <http://dx.doi.org/10.15407/ubj87.02.088>
60. Koval L., Lykhmus O., Kalashnyk O. et al. The presence and origin of autoantibodies against  $\alpha 4$  and  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in the human blood: possible relevance to Alzheimer's pathology. *J. Alzheimer's Dis.* 2011. **25**(4): 747. <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-2011-101845>
61. Chen C., Constantinou A., Deonarain M. Modulating antibody pharmacokinetics using hydrophilic polymers. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2011. **8**(9): 1221. <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2011.602399>
62. Könnig D., Kolmar H. Beyond antibody engineering: directed evolution of alternative binding scaffolds and enzymes using yeast surface display. *Microb. Cell Fact.* 2018. **17**(1): 32. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-018-0881-3>
63. Ye L., Yang C., Yu H. From molecular engineering to process engineering: development of high-throughput screening methods in enzyme directed evolution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. **102**(2): 559. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-017-8568-y>
64. Liu C.C., Mack A.V., Tsao M.L., Mills J.H., Lee H.S., Choe H., Farzan M., Schultz P.G., Smider V.V. Protein evolution with an expanded genetic code. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2008. **105**(46): 17688. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0809543105>
65. Arnold F.H. Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2018. **57**(16): 4143. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201708408>

*S.I. Romanyuk, S.V. Komisarenko*

Palladin Institute of Biochemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

MOLECULAR BIOLOGY AND IMMUNOLOGY REVOLUTIONIZE CHEMISTRY,  
OR HOW TO GUIDE THE EVOLUTION OF PROTEINS FOR THE BENEFIT OF HUMANITY

Nobel Prize in Chemistry for 2018

The Nobel Prize in Chemistry for 2018 was shared by three scientists. Half the prize went to the American researcher Frances H. Arnold “for the guided evolution of enzymes”, the other half was shared between the American George P. Smith and Briton Sir Gregory P. Winter “for the phage display of peptides and antibodies.” The methods developed by Nobel laureates will promote the development of more environmentally friendly production of chemical products, new materials, pharmaceuticals, biofuels, etc.