

DOI: 10.15690/vramn.v70.i4.1408

А.В. Колесников, А.К. Рябко, И.Г. Шемякин, А.В. Козыр

ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация

# Современные подходы к разработке специфической терапии особо опасных токсикоинфекций

Особо опасные токсикоинфекции являются значительной угрозой здоровью населения и нерешенной проблемой обеспечения биологической безопасности. Наибольшую опасность представляют собой ботулизм и сибирская язва, которые не только имеют практически не контролируемые природные резервуары, но также могут служить возможным оружием биотеррористов. Специфическая терапия этих заболеваний практически отсутствует, существующие методы имеют ограниченные возможности применения и низкую эффективность, в то время как высокочувствительная ранняя диагностика еще не получила широкого распространения. Необходима срочная разработка средств специфической терапии и экстренной профилактики ботулизма и сибирской язвы. Анализ современных тенденций развития этих направлений показал, что на данный момент, вероятно, наиболее перспективными технологиями для создания антитоксинов являются олигоклональные антитела и аптамеры, аллостерически ингибирующие активность эффекторных компонентов обоих токсинов — цинкзависимых протеаз.

**Ключевые слова:** токсикоинфекция, летальный токсин возбудителя сибирской язвы, ботулинический токсин, аптамер, терапевтическое антитело.

(Для цитирования: Колесников А.В., Рябко А.К., Шемякин И.Г., Козыр А.В. Современные подходы к разработке специфической терапии особо опасных токсикоинфекций. *Вестник РАМН*. 2015; 70 (4): 428–434. Doi: 10.15690/vramn.v70.i4.1408)

428

## Введение

Наибольшую опасность при бактериальной токсикоинфекции представляет собой токсин — комплекс белков, высвобождаемый бактерией для борьбы с защитными системами организма-хозяина [1, 2]. Способ, при помощи которого происходит подавление защитных систем организма, не всегда очевиден, а механизм интоксикации изучен во многих случаях не полностью. Известно, что бактерии-возбудители токсикоинфекций, лишённые токсинов, в большинстве случаев авирулентны и не представляют существенной опасности или вызывают незначительную патологию, легко поддающуюся лечению [3, 4], поэтому токсины таких микроорганизмов закономерно рассматривают как принципиальные факторы их вирулентности.

Среди достаточно большого числа бактерий, продуцирующих токсины, наибольшую опасность для жизни в результате интоксикации представляют возбудители ботулизма [5] и сибирской язвы [6]: высокая удельная токсичность продуцируемых токсинов обуславливает высокую смертность в условиях интенсивной терапии и

узкое «окно возможностей», при упущении которого вероятность летального исхода многократно возрастает [7, 8]. В силу этого неспецифическая симптоматическая терапия указанных заболеваний может иметь ограниченный успех, а в случае массовой интоксикации смертность может многократно возрасти ввиду отсутствия достаточного числа мест для проведения мероприятий реанимации и интенсивной терапии [9]. В отличие от других упомянутых токсикоинфекций эффективные средства специфической терапии сибирской язвы и ботулизма до сих пор не созданы, а имеющаяся сибирезывенная вакцина не удовлетворяет современным параметрам безопасности применения и не может быть рекомендована для широкого использования. Между тем современная международная обстановка, глобализация экономики, логистики и миграционных потоков, а также растущая угроза биотерроризма диктуют необходимость создания эффективных мер защиты населения от этих патогенов.

Достаточно давно стало очевидным, что наилучшим решением для предотвращения смертности и инвалидности у пациентов с указанными выше инфекциями является специфическая антитоксинная терапия и/или

A.V. Kolesnikov, A.K. Ryabko, I.G. Shemyakin, A.V. Kozyr

State Research Center for Applied Microbiology &amp; Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

## Development of Specific Therapy to Category A Toxic Infections

Category A select agents continue to be major threat to human population both as naturally occurring diseases and as potential weapon of bioterrorists. Anthrax and botulism are probably the most threatening agents as both have virtually uncontrolled natural reservoirs from which they can be isolated and propagated. Available specific antitoxin therapy of both diseases is outdated; its efficiency is questionable as well as safety of reactogenic or human-derived components used in treatment. Highly sensitive toxin detection techniques are still not as widespread as it needed for timely alerting medical services. There is urgent need of pre-exposure prophylaxis and postexposure specific antitoxin therapy for anthrax and botulism. Analysis of modern studies in the field suggests oligoclonal antibodies acting against receptor-binding toxin subunits and nucleic acid aptamers as allosteric inhibitors of metalloproteolytic toxin components as the most promising candidates for development of efficient antitoxin therapy.

**Key words:** toxic infection, lethal toxin of anthrax, botulinum toxin, aptamer, therapeutic antibody.

(For citation: Kolesnikov A.V., Ryabko A.K., Shemyakin I.G., Kozyr A.V. Development of Specific Therapy to Category A Toxic Infections. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2015; 70 (4): 428–434. Doi: 10.15690/vramn.v70.i4.1408)

профилактика [10]. На практике для создания средств специфической терапии этих токсикоинфекций необходимо найти решение ряда проблем. В частности, для разработки специфической терапии против бактериального токсина важно не только найти высокоэффективный ингибитор избранной мишени, но и определить терапевтическое окно для данного типа воздействия. Знание этих и других особенностей взаимодействия токсина с организмом пациента позволяет правильно выбрать как мишени в составе многокомпонентной молекулы, каковой является бактериальный токсин, так и способы инактивации токсина и его отдельных компонентов. Уместно отметить, что эффекторными компонентами обоих токсинов, обуславливающими высокую смертность, являются цинкзависимые металлопротеазы [11], расщепляющие субстраты-мишени с высочайшей степенью селективности. Принципиально сходная структура сибиреязвенного и ботулинического токсинов (двухкомпонентная архитектура, цинкзависимые протеазы в качестве эффекторов, необходимость обеспечения высокой степени специфичности расщепления субстратов, невысокая каталитическая эффективность) предопределяет сходные проблемы в разработке ингибирующих эти токсины молекул [12].

### Сибиреязвенная инфекция

#### *Проблемы специфической терапии сибирской язвы*

Патогенез сибирской язвы и смертность от болезни непосредственно связаны с летальным токсином (ЛТ), состоящим из рецепторсвязывающей субъединицы, известной как протективный антиген (ПА), и эффекторной субъединицы, получившей название летальный фактор (ЛФ) [13]. Вакцинация и антибиотикотерапия являются традиционными мерами борьбы с сибиреязвенной инфекцией. Однако оба подхода не лишены существенных ограничений. Антибиотикотерапия эффективна при условии ранней диагностики инфекции, однако не способна бороться с токсином, уже присутствующим в организме. В результате смерть от интоксикации может произойти даже при условии полной стерилизации организма от патогена [8, 14]. Вакцины, основанные на аттенуированных штаммах или супернатанте культуры таких штаммов, реактогенны и непригодны для широкого применения, а недавно разработанные вакцины на основе ПА требуют неоднократного введения и как минимум 4 нед для развития протективного иммунитета. Кроме того, степень защиты, обеспечиваемая вакцинами, основанными на рекомбинантном ПА, остается не до конца изученной [15].

Несмотря на значительный объем исследований механизма действия ЛТ [16], идентификацию мишеней для ПА и ЛФ [17] и наличие успешной стратегии блокировки действия токсина при помощи нейтрализующих антител [18], успех в разработке средств специфической терапии сибирской язвы сложно назвать полным. Во-первых, несмотря на значительный масштаб исследований, механизм системного поражения организма на поздних стадиях инфекции до конца не ясен [19]. Во-вторых, слабо изучена динамическая структура ЛФ, способного к значительным конформационным перестройкам при связывании субстратов [20, 21]. Это не только затрудняет разработку специфических низкомолекулярных ингибиторов ЛФ, но и поиск новых мишеней этой протеазы, существенная часть которых практически наверняка осталась не идентифицированной [22, 23]. Последние

необходимы для эффективной блокировки действия ЛТ наряду с моноклональными антителами, поскольку антигены препараты не способны проникать внутрь клетки для нейтрализации уже транслоцированного в цитозоль ЛФ [24].

#### *Современные и перспективные средства специфической терапии сибирской язвы*

Моноклональные терапевтические антитела, нейтрализующие ЛТ, стали первым современным фармацевтическим препаратом для специфической терапии сибиреязвенной инфекции. Препарат, получивший название раксибакумаб, разрешен к использованию в качестве терапевтического средства Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA, США) [25]. Однако эффективность раксибакумаба относительно невысока и, по всей видимости, он не может быть использован для монотерапии [26]. В стадии разработки находится несколько антител, блокирующих действие летального или отечного токсинов [27], однако эффект как минимум части этих препаратов по результатам тестов на животных также не может рассматриваться как полный [28]. Более 10 лет назад был сконструирован доминантно-негативный мутант (dominant-negative inhibitory) ПА DNI [29], некоторое время рассматривавшийся в качестве возможного средства для блокировки действия ЛТ. В последнее время DNI используют только в качестве кандидата на роль высокоэффективного антигена для вакцинации: иммунный ответ к DNI развивается быстрее и обеспечивает больший уровень защиты от инфекции по сравнению с ПА дикого типа [30]. Преимущество DNI в качестве компонента вакцины, очевидно, существенно снижает его ценность как ингибитора, поскольку иммунный ответ способствует быстрой элиминации DNI из крови. К этому же классу ингибиторов относится и ряд других молекул, связывающих гептамер ПА и блокирующих конформационные изменения, необходимые для формирования поры, в которую транслоцируется ЛФ [31], а также сам процесс транслокации [32]. Показано, что одно из наиболее эффективных моноклональных антител к ПА, находящихся в стадии разработки, ингибирует процесс конформационных изменений, связанных с pH-зависимым изменением, необходимым для прохождения эффекторных компонентов токсина через пору [31].

#### *Подходы к разработке специфических ингибиторов токсина сибирской язвы*

Описанные выше белковые ингибиторы ЛТ, очевидно, не могут блокировать действие токсина внутри клетки. Более того, поскольку при попадании в клетку ЛТ диссоциирует на ЛФ и ПА, принципиальное значение для внутриклеточного ингибирования токсина имеет блокировка протеолитической активности ЛФ. Последний является цинковой протеазой с уникальными характеристиками, обеспечивающими, с одной стороны, высокую субстратную специфичность [20, 21], а с другой — адаптивность к различным условиям, в частности, выражающуюся в способности использовать весьма широкий спектр двухвалентных ионов металлов в качестве кофакторов, что нехарактерно для большинства металлопротеаз [33]. В силу этих причин разработка специфических низкомолекулярных ингибиторов ЛФ является весьма сложной задачей. В частности, особенности строения и пластичность активного центра ЛФ осложняют дизайн ингибиторов по трехмерной структуре их комплексов с протеазой.

На протяжении последних 10 лет было идентифицировано несколько эффективных ингибиторов ЛФ, блокирующих протеазную активность фермента [34]. Согласно современным воззрениям, ингибирование ЛФ может оказаться наиболее эффективным способом экстренной специфической терапии сибирской язвы потому, что ЛФ не только напрямую обуславливает токсичность, но и существует в организме значительно дольше, чем ПА: в течение нескольких суток после инактивации бактерий. ПА способен транслоцировать ЛФ не только напрямую в цитозоль, но и в эндосомы, где последний оказывается практически защищенным от деградации, постепенно высвобождаясь в цитозоль [35]. Эти наблюдения помогают оценить эффективность использования ингибиторов ПА и ЛФ на различных этапах инфекции: на самых ранних стадиях блокировка ПА может оказаться более эффективной, но затем на протяжении как минимум нескольких суток основной вклад в эффективную терапию будет вносить ингибирование ЛФ.

Ингибиторы I поколения не дошли до стадии клинических испытаний, поскольку обладали низкой селективностью по отношению к металлопротеазам организма человека и недостаточным протективным эффектом *in vivo*, однако их изучение внесло значительный вклад в понимание структуры и функции ЛФ [36]. Ингибиторы II поколения создавались на основе итеративного подхода, в рамках которого библиотеки фрагментов, соответствующих различным классам лекарственноподобных молекул, скринировали на предмет идентификации ингибиторов ЛФ, а затем на базе отобранных слабых ингибиторов создавали несколько итераций небольших библиотек химических соединений с повышающейся эффективностью ингибирования протеазы. Этот подход существенно эффективнее прямого скрининга, поскольку позволяет оперировать с несколькими сотнями, а не с сотнями тысяч молекул. Тем не менее на настоящий момент ни один ингибитор ЛФ II поколения не стал кандидатом для разработки лекарственного средства. Проблему специфичности мог бы решить подход, заключающийся в скрининге аллостерических ингибиторов, особенно ингибиторов конформационных перестроек фермента, предположительно происходящих при взаимодействии с субстратом. На базе концепции взаимодействия ЛФ и его субстратов не только в активном центре, но и в области экзосайтов [20, 21] был получен аллостерический ингибитор, блокирующий эффективное связывание протеазы с полноразмерными субстратами — MAP-киназами [37]. Обнаруженный ингибитор и разработанный метод скрининга могут быть использованы для создания принципиально нового класса ингибиторов ЛФ и других металлопротеаз, традиционно являющихся весьма сложными мишенями для создания эффективных и селективных низкомолекулярных ингибиторов [38].

Ингибиторы ЛФ III поколения разработаны на основе ранее идентифицированных молекул с использованием глубокого развития дизайна итеративного метода [39–41]. Эти ингибиторы уже обладают заметной протективной активностью *in vivo* [41]. Применение данных ингибиторов совместно с ингибиторами ЛФ продемонстрировало интересный феномен кумулятивного действия этих молекул. Если по отдельности каждый из ингибиторов обеспечивал лишь частичный протективный эффект, то совместное действие ингибиторов различных компонентов токсина обеспечивало полную защиту от патогена. Наиболее вероятное объяснение состоит в том, что одновременное ингибирование эффекторных компонентов токсина оставляет активными защитные системы орга-

низма, которые блокируются действием токсина в достаточной степени, чтобы запустить процесс элиминации патогена [41]. Это наблюдение имеет большое значение для разработки эффективных стратегий ингибирования многокомпонентных бактериальных токсинов и других многокомпонентных факторов вирулентности.

В целом стратегии ингибирования активности ЛФ, заключающиеся в итеративной модификации ингибиторов по аналогии с тем, как это происходит с ингибиторами ВИЧ-протеазы, и идентификации аллостерических ингибиторов, специфичных к экзосайтам для узнавания белковых субстратов, являются наиболее многообещающими. Тем не менее для создания реальных прототипов лекарственных соединений с высокой эффективностью ингибирования *in vivo* необходимы дополнительные структурно-функциональные исследования.

### Ботулиническая токсикоинфекция

Ботулинический токсин (BoNT), как и сибиреязвенный, является двухкомпонентной системой, содержащей рецепторсвязывающую и эффекторную субединицу, причем последняя так же, как и ЛФ, является цинкзависимой металлопротеазой. Существуют 8 типов (и множество субтипов) ботулинических токсинов, отличающихся распространением, токсичностью, опасностью для человека и мишенями для расщепления [42]. Уникальные механизмы, выработанные в процессе адаптивной эволюции, обеспечивают высокую специфичность как проникновения в нейроны, так и расщепления субстратов, приводящих к блокировке выброса нейротрансмиттеров, параличу и, при отсутствии терапии, смерти от остановки дыхания [43, 44]. В отличие от сибиреязвенного токсина, который вызывает системные повреждения органов и тканей, действие ботулотоксинов может быть полностью обратимо, и при адекватной терапии интоксикация не имеет каких-либо последствий. Данное свойство, а также механизм действия предопределили использование ботулотоксина в медицине при многочисленных спастических и связанных с ними болевых синдромах, а также в косметологии [44, 45]. Успешное и широкое медицинское и косметическое применение ботулотоксина служит одной из причин, по которым вакцинация против наиболее широко встречающихся токсинов типа А и В не получила распространения. Вторая причина — очевидно, финансовая составляющая, связанная с редкостью ботулизма в странах, являющихся основными разработчиками, и отсутствием коммерческого спроса на вакцину [46].

### Современное состояние специфической терапии ботулизма

Специфическая терапия ботулизма представлена препаратами гомо- и гетерологичных поликлональных антител. Они не удовлетворяют многим современным требованиям, предъявляемым к фармацевтической продукции: в первую очередь, безопасности применения (потенциальный риск присутствия инфекционных агентов в гомологичных антителах) и реактогенности (в случае гетерологичных антител). Разработка терапевтических моноклональных антител против ботулотоксина ведется давно, однако в настоящее время на стадии клинических испытаний находится единственный препарат (ХОМА ЗАВ), который является триклональным, как следует из названия, антителом [47]. В настоящее время находится в стадии разработки ряд моноклональных антител, нейтра-



лизующих ботулинический токсин (в основном типа А) [27], но ни одно из них не стало на данный момент кандидатом для проведения клинических испытаний. Более того, во многих работах продолжают направление олигоклональных антител ввиду невозможности нейтрализовать действие токсина единственным антителом [48, 49]. Как для олиго- (или поликлональных), так и для моноклональных антител «терапевтическое окно» весьма невелико: если симптомы заболевания уже развились, большая часть токсина находится внутри клеток и недоступна для нейтрализации. Так же, как и в случае ЛФ, протеаза ботулотоксина может быть активна в клетке достаточно продолжительное время, что объясняет и длительное время восстановления пораженных синапсов [50].

**Перспективные способы ингибирования активности ботулотоксина. Низкомолекулярные ингибиторы**

Наиболее очевидным методом ингибирования активности токсина может стать создание малых молекул или пептидомиметиков, способных проникать внутрь клеток и непосредственно блокировать протеолитическое действие токсина. Таких молекул разработано много [46], однако ни одна из них не обеспечивает защиту на уровне, необходимом для начала проведения клинических испытаний. Идентификация ингибиторов, связывающихся с активным центром металлопротеаз, неоднократно признавалась крайне сложной задачей, в т.ч. и непосредственно для ингибиторов ботулотоксинов [51].

Трудности с созданием эффективных антител и селективных высокоактивных ингибиторов протеолиза привели к разработкам иных методов блокировки активности токсина, таких как блокировка его проникновения внутрь нейронов за счет изменения свойств мембран и цитозоля под действием блокаторов ионных каналов, модификаторов редокс-потенциала нервных клеток, блокаторов транслокации токсина [52] и некоторых других. Общим недостатком этих соединений является их системное токсическое действие на нервные клетки, которое сложно полностью элиминировать без потери этими соединениями антитоксинной активности [51].

Как указано выше, наличие экзосайтов для связывания с субстратами у ЛФ обеспечивает дополнительную специфичность в отношении мишеней для протеолиза. В случае ВоNT связывание протеазы с экзосайтами субстратов не только обеспечивает специфичность расщепления, но и существенно, на 2–3 порядка, ускоряет протекание реакции [53], поэтому блокировка экзосайтов для ВоNT может иметь еще больший ингибирующий эффект, чем для ЛФ. Уместно отметить, что длина минимальных субстратов для различных ботулотоксинов также существенно превосходит длину минимальных субстратов ЛФ: в то время, как ЛФ весьма эффективно протеолизует 11-членный пептид RRKKVYYPYRME [54], ВоNT/A расщепляет минимальный 17-членный субстрат (фрагмент белка SNAP-25) с эффективностью почти на 4 порядка меньшей, чем та, с которой расщепляется минимальный субстрат ЛФ. И только увеличение длины пептида до 65 аминокислот существенно (почти на 3 порядка) увеличивает каталитическую эффективность ВоNT/A по отношению к своему субстрату [53]. Эти наблюдения указывают на потенциальную перспективность разработки ингибиторов к экзосайтам протеазы ботулотоксина как одного из основных направлений исследований. Структурные исследования связывания ВоNT с полноразмерным субстратом определили мишени для последующей идентификации ряда ингибиторов [55]. Основной сложностью идентификации низкомолекулярных ингибиторов связывания с экзосайтами является структур-

ное отличие экзосайтов от активных центров ферментов: последние, как правило, представляют собой достаточно глубокие и узкие структуры, окружающие низкомолекулярный ингибитор с нескольких направлений, в то время как экзосайт не эволюционирует в направлении снижения энергии переходного состояния химической реакции так, как это происходит с активным центром фермента, а обеспечивает только связывание с достаточно большой поверхностью молекулы белка [55–57]. В силу этого экзосайт может иметь более простую, планарную, структуру, которая не благоприятствует высокоаффинным взаимодействиям с малыми молекулами. Действительно, аффинность описанных ингибиторов экзосайтов ВоNT на основе малых органических молекул достаточно невелика и находится в микромолярном диапазоне, чего, как правило, недостаточно для эффективного блокирования активности *in vivo* [56].

**Аптамеры как ингибиторы ферментативной активности**

В последнее время в качестве ингибиторов ферментов активно исследуют аптамеры — короткие фрагменты нуклеиновых кислот, которые получают при скрининге библиотек олигонуклеотидов с произвольной последовательностью (N)<sub>x</sub>, где x — длина рандомной части олигонуклеотида — может составлять в среднем от 20 до 60 оснований [58]. Эта часть фланкирована константными участками, которые являются праймерами для амплификации отобранных аптамеров после каждого раунда селекции. Полученные при проведении скрининга, различные варианты которого известны под общим названием SELEX, аптамеры амплифицируют, конвертируют в одноцепочечный формат и подвергают дальнейшей селекции. Методики селекции в последнее время подверглись существенной модернизации и переосмыслению, в результате чего сформировался ряд новых подходов, позволяющих получать высокоаффинные аптамеры практически к любым молекулам, включая малые [59]. Аптамеры на данный момент являются наиболее эффективным решением для разработки ингибиторов, связывающихся с экзосайтами протеаз. Аптамеры имеют в несколько раз большую площадь связывания с мишенью по сравнению с малыми органическими молекулами и существенно более протяженную структуру. В силу этого эффективность связывания с относительно планарными, по сравнению с активными центрами, структурами у аптамеров существенно выше. Это наблюдение подтверждается фактами селекции высокоаффинных аптамеров к ряду протеаз системы свертывания крови [60], в первую очередь к тромбину [61]. Ряд аптамеров к протеазам этой системы обладает высокой аффинностью и селективностью к мишеням и находится на различных стадиях клинических испытаний [62].

Конформационные и структурные особенности аптамеров позволяют им, в отличие от многих других субъектов скрининга библиотек химических и биологических соединений, эффективно связываться не только с экзосайтами субстратов протеаз, но и с другими сайтами ферментов, блокируя их активность посредством запрета конформационных перестроек, связанных с катализом, или за счет других сходных механизмов [63, 64]. Ингибиторы такого рода являются особенно ценными с фармакологической точки зрения, поскольку, как правило, обладают наибольшей селективностью. Классическим примером такого ингибитора являются широко извест-

ный препарат иматиниб и семейство вновь разрабатываемых ингибиторов тирозинных киназ [65].

Недавно полученные аптамеры, ингибирующие активность ВоNT/A, обладают высокой аффинностью к мишени и являются неконкурентными ингибиторами протеолиза, т.е. связываются вне активного центра либо с экзосайтами, либо с иными участками фермента, взаимодействие с которыми блокирует конформационные перестройки протеазы в процессе катализа.

Таким образом, аптамеры могут рассматриваться как один из наиболее многообещающих типов ингибиторов ботулинического токсина. Уместно отметить, что работы по селекции аптамеров к бактериальным токсинам были начаты совсем недавно. Так, к примеру, исследование аптамеров, специфичных к сибирезвеному токсину, проводилось только в контексте разработки высокочувствительных систем детекции, но не создания новых подходов к терапии [66].

### Заключение

Учитывая то, что технологии селекции и способы оптимизации аффинности и стабильности аптамеров интенсивно развиваются, наиболее вероятным сценарием разработки специфической терапии ботулизма и сибирской язвы в ближайшем будущем является совместное использование моноклональных антител и

аптамеров. Эффективное взаимодействие последних с экзосайтами протеаз дает возможность преодолеть проблему селективности ингибиторов протеолитических ферментов. Аптамеры требуют дополнительной оптимизации для обеспечения проникновения внутрь клетки, однако соответствующие технологии так же быстро развиваются [67]. Комбинированный подход к ингибированию токсинов может стать не только основным методом борьбы с особо опасными токсикоинфекциями, но и тонким инструментом анализа патофизиологии интоксикации.

### Источник финансирования

Обзор подготовлен при финансовой поддержке Российского научного фонда в соответствии с условиями Соглашения № 14-15-00630 от 11.07.2014 г. на выполнение фундаментальных исследований по научному проекту «Селекция ДНК-аптамеров к летальному токсину *V. anthracis* и нейротоксину ботулизма типа А и исследование их антиоксидантной активности».

### Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Todar K. Bacterial Protein Toxins. URL: <http://textbookofbacteriology.net/proteintoxins.html> (Available: 10.05.2015).
2. Proft T. Bacterial Toxins: Genetics, Cellular Biology and Practical Applications. *Norfolk: Caister Academic Press*. 2013. P. 234.
3. Casadevall A., Pirofski L. Host-pathogen interactions: the attributes of virulence. *J. Inf. Dis.* 2001; 184 (3): 337–344.
4. Montie T.C. Bacterial Protein Toxins. *NY: Elsevier*. 2013. Vol. 3. 109 p.
5. Montal M. Botulinum neurotoxin: a marvel of protein design. *Ann. Rev. Biochem.* 2010; 79: 591–617.
6. Mock M., Fouet A. Anthrax. *Ann. Rev. Microbiol.* 2001; 55: 647–671.
7. Brook I. Botulism: the challenge of diagnosis and treatment. *Rev. Neurol. Dis.* 2006; 3 (4): 182–189.
8. Comer J.E., Ray B.D., Henning L.N., Stark G.V., Barnewall R.E., Mott J.M., Meister G.T. Characterization of a therapeutic model of inhalational anthrax using an increase in body temperature in New Zealand white rabbits as a trigger for treatment. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012; 19 (9): 1517–1525.
9. Karwa M., Bronzert P., Kvetan V. Bioterrorism and critical care. *Crit. Care Clin.* 2003; 19 (2): 279–313.
10. Rainey G.J., Young J.A. Antitoxins: novel strategies to target agents of bioterrorism. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2 (9): 721–726.
11. Miyoshi S., Shinoda S. Bacterial metalloprotease as the toxic factor in infection. *Toxin Rev.* 1997; 16 (4): 177–194.
12. Hicks R.P., Hartell M.G., Nichols D.A., Bhattacharjee A.K., van Hamont J.E., Skillman D.R. The medicinal chemistry of botulinum, ricin and anthrax toxins. *Curr. Med. Chem.* 2005; 12 (6): 667–690.
13. Liu S., Moayeri M., Leppla S.H. Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis. *Trends Microbiol.* 2014; 22 (6): 317–325.
14. Jernigan D.B., Raghunathan P.L., Bell B.P., Brechner R., Bresnitz E.A., Butler J.C. Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8 (10): 1019–1028.
15. Kaur M., Singh S., Bhatnagar R. Anthrax vaccines: present status and future prospects. *Exp. Rev. Vaccines.* 2013; 12 (8): 955–970.
16. Baldari C.T., Tonello F., Paccani S.R., Montecucco C. Anthrax toxins: A paradigm of bacterial immune suppression. *Trends Immunol.* 2006; 27 (9): 434–440.
17. Guichard A., Nizet V., Bier E. New insights into the biological effects of anthrax toxins: linking cellular to organismal responses. *Microbes Infect.* 2012; 14 (2): 97–118.
18. Chen Z., Moayeri M., Purcell R. Monoclonal antibody therapies against anthrax. *Toxins (Basel)*. 2011; 3 (8): 1004–1019.
19. Liu S., Zhang Y., Moayeri M., Liu J., Crown D., Fattah R.J., Wein A.N., Yu Z.X., Finkel T., Leppla S.H. Key tissue targets responsible for anthrax-toxin-induced lethality. *Nature*. 2013; 501 (7465): 63–68.
20. Maize K.M., Kurbanov E.K., De La Mora-Rey T., Geders T.W., Hwang D.J., Walters M.A., Johnson R.L., Amin E.A., Finzel B.C. Anthrax toxin lethal factor domain 3 is highly mobile and responsive to ligand binding. *Acta Crystallogr. Biol. Crystallogr.* 2014; 70 (Pt. 11): 2813–2822.
21. Tonello F., Ascenzi P., Montecucco C. The metalloproteolytic activity of the anthrax lethal factor is substrate-inhibited. *J. Biol. Chem.* 2003; 278 (41): 40075–40078.
22. Levinsohn J.L., Newman Z.L., Hellmich K.A., Fattah R., Getz M.A., Liu S., Sastalla I., Leppla S.H., Moayeri M. Anthrax lethal factor cleavage of Nlrp1 is required for activation of the inflammasome. *PLoS Pathog.* 2012; 8 (3): 1002638.
23. Banks D.J., Ward S.C., Bradley K.A. New insights into the functions of anthrax toxin. *Exp. Rev. Mol. Med.* 2006; 8 (7): 1–18.
24. Nestorovich E.M., Bezrukov S.M. Designing inhibitors of anthrax toxin. *Exp. Opin. Drug Discov.* 2014; 9 (3): 299–318.
25. Yao S. FDA NEWS RELEASE. FDA approves raxibacumab to treat inhalational anthrax. 2012. URL: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm332341.html> (Available: 11.05.2015).

26. Kummerfeldt C.E. Raxibacumab: potential role in the treatment of inhalational anthrax. *Infect. Drug Resist.* 2014; 7: 101–109.
27. Chow S.K., Casadevall A. Monoclonal antibodies and toxins – a perspective on function and isotype. *Toxins (Basel)*. 2012; 4 (6): 430–454.
28. Malkevich N.V., Hopkins R.J., Bernton E., Meister G.T., Vela E.M., Atiee G., Johnson V., Nabors G.S., Aimes R.T., Ionin B., Skiadopoulou M.H. Efficacy and safety of AVP-21D9, an anthrax monoclonal antibody, in animal models and humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58 (7): 3618–3625.
29. Aulinger B.A., Roehrl M.H., Mekalanos J.J., Collier R.J., Wang J.Y. Combining anthrax vaccine and therapy: a dominant-negative inhibitor of anthrax toxin is also a potent and safe immunogen for vaccines. *Infect. Immun.* 2005; 73 (6): 3408–3414.
30. Vance D.J., Rong Y., Brey R.N., Mantis N.J. Combination of two candidate subunit vaccine antigens elicits protective immunity to ricin and anthrax toxin in mice. *Vaccine*. 2015; 33 (3): 417–421.
31. Mechaly A., Levy H., Epstein E., Rosenfeld R., Marcus H., Ben-Arie E., Shafferman A., Ordentlich A., Mazor O. A novel mechanism for antibody-based anthrax toxin neutralization: inhibition of prepore-to-pore conversion. *J. Biol. Chem.* 2012; 287 (39): 32665–32673.
32. Karginov V.A., Yohannes A., Robinson T.M., Fahmi N.E., Alibek K., Hecht S.M. Beta-cyclodextrin derivatives that inhibit anthrax lethal toxin. *Bioorg. Med. Chem.* 2006; 14 (1): 33–40.
33. Lo S.Y., Säbel C.E., Webb M.I., Walsby C.J., Siemann S. High metal substitution tolerance of anthrax lethal factor and characterization of its active copper-substituted analogue. *J. Inorg. Biochem.* 2014; 140: 12–22.
34. Kumar B.V., Malik S., Grandhi P., Dayam R., Sarma J.A. Anthrax lethal factor inhibitors as potential countermeasure of the infection. *Curr. Top Med. Chem.* 2014; 14 (17): 1977–1989.
35. Abrami L., Brandi L., Moayeri M., Brown M.J., Krantz B.A., Leppla S.H., van der Goot F.G. Hijacking multivesicular bodies enables long-term and exosome-mediated long-distance action of anthrax toxin. *Cell Rep.* 2013; 5 (4): 986–996.
36. Turk B.E. Discovery and development of anthrax lethal factor metalloproteinase inhibitors. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008; 9 (1): 24–33.
37. Bannwarth L., Goldberg A.B., Chen C., Turk B.E. Identification of exosite-targeting inhibitors of anthrax lethal factor by high-throughput screening. *Chem. Biol.* 2012; 19 (7): 875–882.
38. Sela-Passwell N., Rosenblum G., Shoham T., Sagi I. Structural and functional bases for allosteric control of MMP activities: can it pave the path for selective inhibition? *Biochim. Biophys. Acta.* 2010; 1803 (1): 29–38.
39. Jiao G.S., Kim S., Moayeri M., Cregar-Hernandez L., McKasson L., Margosiak S.A., Leppla S.H., Johnson A.T. Antidotes to anthrax lethal factor intoxication. Part 1: Discovery of potent lethal factor inhibitors with in vivo efficacy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010; 20 (22): 6850–6853.
40. Kim S., Jiao G.S., Moayeri M., Crown D., Cregar-Hernandez L., McKasson L., Margosiak S.A., Leppla S.H., Johnson A.T. Antidotes to anthrax lethal factor intoxication. Part 2: structural modifications leading to improved in vivo efficacy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011; 21 (7): 2030–2033.
41. Jiao G.S., Kim S., Moayeri M., Crown D., Thai A., Cregar-Hernandez L., McKasson L., Sankaran B., Lehrer A., Wong T., Johns L., Margosiak S.A., Leppla S.H., Johnson A.T. Antidotes to anthrax lethal factor intoxication. Part 3: Evaluation of core structures and further modifications to the C2-side chain. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2012; 22 (6): 2242–2246.
42. Rossetto O., Pirazzini M., Montecucco C. Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* 2014; 12 (8): 535–549.
43. Levin B.R., Svanborg E.C. Selection and evolution of virulence in bacteria: an ecumenical excursion and modest suggestion. *Parasitol.* 1990; 100 (Suppl.): 103–115.
44. Shilpa P.S., Kaul R., Sultana N., Bhat S. Botulinum toxin: The Midas touch. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 2014; 5(1): 8–14.
45. Cavallini M., Cirillo P., Fundarò S.P., Quartucci S., Sciuto C., Sito G., Tonini D., Trocchi G., Signorini M. Safety of botulinum toxin A in aesthetic treatments: a systematic review of clinical studies. *Dermatol. Surg.* 2014; 40 (5): 525–536.
46. Patel K., Cai S., Singh B.R. Current strategies for designing antidotes against botulinum neurotoxins. *Expert Opin. Drug Discov.* 2014; 9 (3): 319–333.
47. Nowakowski A., Wang C., Powers D.B., Amersdorfer P., Smith T.J., Montgomery V.A., Sheridan R., Blake R., Smith L.A., Marks J.D. Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99 (17): 11346–11350.
48. Diamant E., Lachmi B.E., Keren A., Barnea A., Marcus H., Cohen S., David A.B., Zichel R. Evaluating the synergistic neutralizing effect of anti-botulinum oligoclonal antibody preparations. *PLoS One.* 2014; 9 (1): 87089.
49. Chen C., Wang S., Wang H., Mao X., Zhang T., Ji G., Shi X., Xia T., Lu W., Zhang D., Dai J., Guo Y. Potent neutralization of botulinum neurotoxin/B by synergistic action of antibodies recognizing protein and ganglioside receptor binding domain. *PLoS One.* 2012; 7 (8): e43845.
50. Whitemarsh R.C., Tepp W.H., Johnson E.A., Pellett S. Persistence of botulinum neurotoxin subtypes 1–5 in primary rat spinal cord cells. *PLoS One.* 2014; 9 (2): 90252.
51. Kiris E., Burnett J.C., Kane C.D., Bavari S. Recent advances in botulinum neurotoxin inhibitor development. *Curr. Top Med. Chem.* 2014; 14 (18): 2044–2061.
52. Nestorovich E.M., Karginov V.A., Popoff M.R., Bezrukov S.M., Barth H. Tailored  $\beta$ -cyclodextrin blocks the translocation pores of binary exotoxins from *C. botulinum* and *C. perfringens* and protects cells from intoxication. *PLoS One.* 2011; 6 (8): 23927.
53. Lebeda F.J., Cer R.Z., Mudunuri U., Stephens R., Singh B.R., Adler M. The zinc-dependent protease activity of the botulinum neurotoxins. *Toxins (Basel)*. 2010; 2 (5): 978–997.
54. Turk B.E., Wong T.Y., Schwarzenbacher R., Jarell E.T., Leppla S.H., Collier R.J., Liddington R.C., Cantley L.C. The structural basis for substrate and inhibitor selectivity of the anthrax lethal factor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004; 11 (1): 60–66.
55. Breidenbach M.A., Brunger A.T. Substrate recognition strategy for botulinum neurotoxin serotype A. *Nature.* 2004; 432 (7019): 925–929.
56. Xue S., Javor S., Hixon M.S., Janda K.D. Probing BoNT/A protease exosites: implications for inhibitor design and light chain longevity. *Biochemistry.* 2014; 53 (43): 6820–6824.
57. Sikorra S., Henke T., Galli T., Binz T.J. Substrate recognition mechanism of VAMP/synaptobrevin-cleaving clostridial neurotoxins. *Biol. Chem.* 2008; 283 (30): 21145–21152.
58. Radom F., Jurek P.M., Mazurek M.P., Otlewski J., Jeleń F. Aptamers: molecules of great potential. *Biotechnol. Adv.* 2013; 31 (8): 1260–1274.
59. McKeague M., Derosa M.C. Challenges and opportunities for small molecule aptamer development. *J. Nucleic Acids.* 2012; 2012: 748913.
60. Dupont D.M., Andersen L.M., Botkjaer K.A., Andreasen P.A. Nucleic acid aptamers against proteases. *Curr. Med. Chem.* 2011; 18 (27): 4139–4151.
61. Krauss I., Merlino A., Giancola C., Randazzo A., Mazzarella L., Sica F. Thrombin-aptamer recognition: a revealed ambiguity. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39 (17): 7858–7867.
62. Ni X., Castanares M., Mukherjee A., Lupold S.E. Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons. *Curr. Med. Chem.* 2011; 18 (27): 4206–4214.

63. Verghese J., Liang A., Sidhu P.P., Hindle M., Zhou Q., Desai U.R. First steps in the direction of synthetic, allosteric, direct inhibitors of thrombin and factor Xa. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009; 19 (15): 4126–4129.
64. Radi M., Schenone S., Botta M. Allosteric inhibitors of Bcr-Abl: towards novel myristate-pocket binders. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2013; 14 (5): 477–487.
65. Fukuda K., Umehara T., Sekiya S., Kunio K., Hasegawa T., Nishikawa S. An RNA ligand inhibits hepatitis C virus NS3 protease and helicase activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 325 (3): 670–675.
66. Choi J.S., Kim S.G., Lahousse M., Park H.Y., Park H.C., Jeong B., Kim J., Kim S.K., Yoon M.Y. Screening and characterization of high-affinity ssDNAaptamers against anthrax protective antigen. *J. Biomol. Screen.* 2011; 16 (2): 266–271.
67. Röder R., Wagner E. Sequence-defined shuttles for targeted nucleic acid and protein delivery. *Ther. Deliv.* 2014; 5 (9): 1025–1045.

#### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Колесников Александр Владимирович**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ГНЦ ПМБ

**Адрес:** 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, **тел.:** +7 (496) 736-00-03,

**e-mail:** pfu2000@mail.ru

**Рябко Алёна Константиновна**, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ГНЦ ПМБ

**Адрес:** 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, **тел.:** +7 (496) 736-00-03,

**e-mail:** ryabko\_alena@mail.ru

**Шемякин Игорь Георгиевич**, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией молекулярной биологии ГНЦ ПМБ

**Адрес:** 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, **тел.:** +7 (496) 736-00-03,

**e-mail:** shemyakin@obolensk.org

**Козырь Арина Владимировна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ГНЦ ПМБ

**Адрес:** 142279, Московская обл., Серпуховский р-н, пос. Оболенск, **тел.:** +7 (496) 736-00-03,

**e-mail:** avkozyr@gmail.com

434

#### ОПЕЧАТКА

В № 2 нашего журнала за 2015 г. на 237 с. в переводе названия статьи С.И. Колесникова, Б.Я. Власова, Л.И. Колесниковой «Сероводород как третья эссенциальная газовая молекула живых тканей» на английский язык упущено слово «Sulfide». Читать название статьи следует так: «Hydrogen Sulfide as a Third Essential Gas Molecule in Living Tissues». Редакция приносит читателям свои извинения.