

УДК 577.15

Каталитические «биоловушки» против токсических эфиров, альтернативный подход для профилактики и лечения отравлений

П. Массон^{1,2 #}, Д. Рошу^{1,3}

¹ Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Toxicology department, La Tronche, France

² Institute of Structure Biology, Molecular Biophysics Laboratory, Grenoble, France

³ Bundeswehr Institute of Toxicology and Pharmacology, Munich, Germany

e-mail: pmasson@unmc.edu

РЕФЕРАТ «Биоловушки» – это биофармацевтические препараты, которые вступают в специфические реакции с токсикантами. Ферменты, вступающие в реакцию с ядовитыми сложными эфирами, могут быть использованы в качестве биоловушек для нейтрализации токсических молекул еще до того, как эти молекулы достигнут физиологических мишеней. Биоловушки могут вводиться парентерально – с целью профилактики или превентивно, а также для экстренной помощи или после контакта с отравляющими веществами, приведшими к интоксикации. Эти ферменты также могут быть использованы в качестве активных компонентов местных средств защиты кожи и обеззараживающих растворов и могут наноситься непосредственно на кожу, слизистые оболочки или раны. Человеческая бутирилхолинэстераза – первая стехиометрическая биоловушка для безопасной и эффективной профилактики отравлений фосфорорганическими соединениями (ФОС), хотя для эффективной защиты требуются огромные количества этого дорогостоящего фермента. Таким образом, данный подход может быть существенно усовершенствован, если использовать «каталитические биоловушки», т. е. ферменты, способные катализировать реакцию деградации токсичных сложных эфиров. Подходящими каталитическими биоловушками являются генно-инженерные мутанты ферментов человека. К настоящему времени созданы эффективные мутанты человеческой бутирилхолинэстеразы, которые гидролизуют кокаин с высокой скоростью. Созданы также мутанты человеческих холинэстераз, способные гидролизовать ФОС, хотя их использование в медицинских целях ограничено в силу низкой активности. Человеческая параоксоназа, фермент плазмы крови с широкой специфичностью, определено наиболее перспективная фосфотриэстераза – биоловушка, однако биотехнологические основы ее производства пока находится в зачаточном состоянии. Потенциально биоловушками могут быть и другие ферменты. Потенциальными биоловушками являются вторичные биологические мишени ФОС, а также карбаматы. В частности, сывороточный альбумин реагирует с ФОС, а затем самореактивируется. Наконец, помимо ферментов человека, фосфотриэстеразы и оксидазы из различных бактериальных и эукариотических источников могут в принципе применяться для наружной терапии отравлений ФОС. Терапия этими ферментами возможна только после их модификации с целью достижения иммунологической совместимости.

Ключевые слова: «Каталитические биоловушки», карбаматы, кокаин, инженерия ферментов, ферментная терапия, фосфорорганические соединения

Аббревиатуры: АХЭ, ацетилхолинэстераза; БХЭ, бутирилхолинэстераза; ХЭ, холинэстераза; GMP, good manufacturing practice (надлежащая практика организации производства); ГТ, глутатион-S-трансфераза; ФОС, фосфорорганические соединения; ГАОК, гидролаза ангидрида органофосфорной кислоты; ПЭГ, полиэтиленгликоль; ПОН1, параоксоназа 1; ФТЭ, фосфотриэстераза; ЛВП, липопротеины высокой плотности.

КОНЦЕПЦИЯ БИОЛОВУШКИ

Ферментные системы кожи, крови, внутренних органов участвуют в естественной защите человека от эндогенных и экзогенных ядов. Процессы детоксикации протекают в соответствии с разными механизмами, включая реакции окисления, гидролиза, конъюгации. Роль ферментов печени, легких и почек, цитохромов P450 (Brown et al., 2008), оксидаз, трансфераз (Miners et al., 2006), амидокарбоксилэстераз (Redinbo and Potter, 2005; Potter and Wadkins, 2006; Satoh

and Hosokawa, 2006) в метаболизме лекарств и ксенобиотиков хорошо известна. Признана также важность эстераз плазмы в инактивации многочисленных токсикантов. Наконец, становится все более очевидным, что каталитические антитела также могут играть эффективную роль в улавливании вредоносных молекул и радикалов (Belogurov et al., 2009). Перечисленные биокатализаторы образуют клеточный и циркуляционный барьеры, защищающие физиологические механизмы и системы от определенных токсикантов.

В данном обзоре мы сосредоточим внимание на тех эндогенных и экзогенных ферментах, которые реагируют с ядовитыми карбоксильными, органофосфорильными и карбамилловыми эфирами. Эти ферменты действуют как стехиометрические или как каталитические биоловушки (т. е. биокатализаторы, способные разлагать ядовитые вещества, при этом оставаясь неизменными в результате каталитического акта). Кроме того, мы рассмотрим ферменты, способные потенциально рассматриваться как каталитические биоловушки.

После краткого обзора каталитических биоловущек, используемых против кокаина, мы остановимся на биокатализаторах, которые следует использовать для профилактики и терапии при отравлении ФОС. Напомним, что отравления ФОС – одна из серьезных проблем здравоохранения, являющаяся причиной ежегодной смерти 200 000 человек (Eddleston et al., 2008). Кроме того, несмотря на то, что 185 государств присоединились к Конвенции о запрещении химического оружия, сохраняется угроза использования нервно-паралитических агентов и других ФОС в ходе военных действий и террористических актов.

За последние двадцать лет удалось добиться значительного прогресса в противодействии отравлениям ФОС (Aas, 2003; Albuquerque et al., 2006; Wetherell et al., 2007; Eyer et al., 2007; Thiermann et al., 2007). Однако классические фармакологические подходы уже достигли оптимального предела. Токсичность ФОС может быть нейтрализована путем понижения кожного всасывания, снижения концентрации ФОС в кровяном русле, что позволяет предотвратить перенос молекул ФОС к физиологическим мишеням (рис. 1). Было показано, что принципиально возможно нейтрализовать ФОС, используя стехиометрические ловушки первого поколения.

Принцип действия биоловущек второго поколения, каталитических, основан на идее непрерывного захвата и разложения ФОС в кровотоке – еще до того, как молекулы ФОС достигнут своих целей в центральной, периферической нервной и нервно-мышечной системах.

ДЕТОКСИКАЦИЯ (-)КОКАИНА

В отличие от плазмы большинства млекопитающих, плазма крови человека не содержит карбоксилэстеразы (Li et al., 2005). Однако два фермента способны разлагать эфиры в кровотоке. Параоксоназа плазмы (ПОН1; ЕС 3.1.8.1) проявляет активность в отношении арилэстеразы, а бутирилхолинэстераза (БХЭ; ЕС 3.1.1.8), обладая широкой эстеразной специфичностью, играет роль в переработке, катаболизме и/или детоксикации многочисленных ядовитых сложных эфиров. Например, человеческая БХЭ гидролизует эфирсодержащие терапевтические и/или наркотические соединения, такие как сукцинилхолин и его длинноцепочечные производные (Grigoryan et al., 2008), аспирин, иринотекан, героин (Lockridge, 1990; Li et al., 2005). БХЭ плазмы также гидролизует пролекарства, такие как изосорбид (isosorbide), диаспиринат (diaspirinate), бамбутерол (bambuterol) (Li et al., 2005) и новое аспириновое пролекарство ISDA (Moriarty et al., 2008).

Было показано, что БХЭ плазмы, являющаяся ферментом, обладающим основным детоксифицирующим действием по отношению к кокаину у человека (Inaba et al., 1978),

эффективно защищает животных от кокаиновой токсичности (Hoffman et al., 1996; Lynch et al., 1997). Однако, БХЭ гидролизует (-)кокаин медленно, с соотношением k_{cat}/K_m около $0.28 \text{ мкМ}^{-1}\text{мин}^{-1}$, так что в физиологических условиях большая часть принятой дозы кокаина достигает биологических целей и запускает токсические эффекты. Работы по сайт-направленному мутагенезу этого фермента позволили в последнее десятилетие добиться радикального увеличения гидролазной активности человеческой БХЭ в отношении кокаина. Первая мутантная форма, A328Y, имела каталитическую активность, в 4 раза превышающую активность человеческой БХЭ (Xie et al., 1999). Двойной мутант A328W/Y322A, предсказанный на основании данных моделирования методом молекулярной динамики и компьютерного лигандного докинга (computer-based ligand docking), имел еще более высокое соотношение $k_{cat}/K_m = 8.5 \text{ мкМ}^{-1}\text{мин}^{-1}$ (Sun et al., 1999). Использование случайного мутагенеза позволило еще повысить k_{cat}/K_m .

Для дизайна новых мутантов БХЭ успешно применялся также подход с использованием моделирования активности переходного состояния. Высокоактивные мутанты в отношении (-)кокаина были разработаны с использованием данных о трехмерной структуре человеческой БХЭ и методом молекулярной динамики переходного состояния дезацилирования (Nicolet et al., 2003)

Самой эффективной оказалась комбинация четырех мутаций A199S/S287G/A328W/Y322G. Каталитическая эффективность созданного фермента в 456 раз превысила эффективность исходной БХЭ (Pan et al., 2005; Zheng and Zhan, 2008). Эта мутантная форма была конъюгирована с человеческим альбумином, что дало возможность улучшить фармакокинетические свойства такого гибрида ($t_{1/2} = 8 \text{ ч}$ в плазме) без изменения каталитической эффективности (Brimijoin et al., 2008). Конъюгированный фермент уже при 10 мг/кг останавливал симптомы кокаиновой интоксикации у крыс при введении им летальной дозы кокаина (100 мг/кг, интраперитонеально). Интересно, что он также блокировал индуцируемое кокаином восстановление влечения к наркотику у крыс, которые ранее принимали кокаин. Совсем недавно комбинация пяти мутаций A199S/F227A/S287G/A328W/Y322G позволила создать еще более активный фермент (Zheng et al., 2008).

Таким образом, конъюгированные ферменты и новые мутантные формы БХЭ перспективны для эффективной терапии передозировок кокаина и лечения наркомании.

Альтернативной стратегией в случае кокаиновой наркомании может быть иммунофармакотерапия. Были получены моноклональные антитела, катализирующие гидролиз (-)кокаина (Landry et al., 1993; Larsen et al., 2004; McKenzie et al., 2007), но кинетические параметры каталитических антител еще требуют улучшения. Методы компьютерного моделирования (моделирование переходных состояний, расчет сдвига барьера свободной энергии) и мутагенез, как ожидается, позволят создать еще более эффективные биокатализаторы (Pan et al., 2008).

ДЕТОКСИКАЦИЯ ФОС

Фосфорорганические соединения широко используются в качестве пестицидов. Некоторые ФОС являются лекарствами, другие – высокоактивными боевыми отравляю-

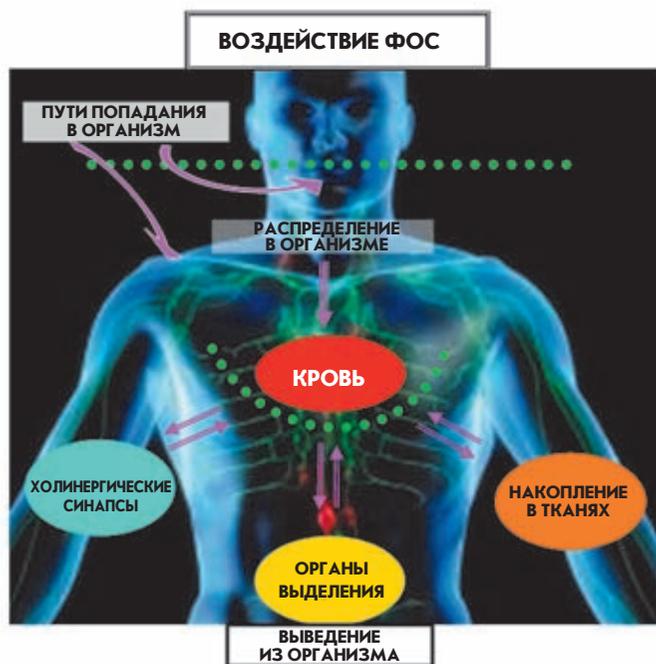


Рис. 1. Пути превращений фосфорорганических соединений в организме человека. Пути проникновения ФОС (нервные газы, пестициды) в организм человека являются абсорбция кожей, глазами и/или дыхательным трактом. Возможно также поглощение через желудочный тракт (самоотравление). Молекулы ФОС распространяются по организму из структурных элементов крови в органы и ткани, включая естественные депо, физиологические мишени и органы выделения (печень и почки). Холинэстеразы холинэргических синапсов являются первичными целями. Их ингибирование определяет токсичность ФОС и реакцию с вторичными мишенями (карбоксилэстеразами, серин-амидазы, пептидазы и другие серин/тирозин белки). Они могут быть ответственны за акцептирование ФОС по нехолинэргическому пути. Этот процесс может вызывать хроническую токсичность на уровне сублетальных эффектов даже при относительно низких поражающих концентрациях токсических агентов (Casida and Quistad, 2004; Costa, 2006)

щими веществами. ФОС являются необратимыми ингибиторами холинэстераз (ХЭ), ацетилхолинэстеразы (АХЭ, ЕС 3.1.1.7) и бутирилхолинэстеразы (рис. 2). АХЭ играет главную роль в холинэргической системе, завершая действие ацетилхолина. Таким образом, синаптические АХЭ являются первичными мишенями ФОС. Основной причиной острой токсичности ФОС является необратимое ингибирование АХЭ (Maxwell et al., 2006). Физиологическая функция БХЭ не ясна. При определенных условиях БХЭ может заменять АХЭ в нервной системе и в нервно-мышечных соединениях (Lockridge et al., 2009). Однако, как это было показано в предыдущем разделе, БХЭ имеет большое фармакологическое и токсикологическое значение.

Эндогенные ферменты участвуют в природной защите от токсичности ФОС. Присутствие ферментов, обезвреживающих ФОС, в коже снижает количество последних, проникающих в организм (Schallreuter et al., 2007). Некоторые вторичные мишени ФОС, обнаруженные в различных тканях, являются обезвреживающими ферментами, и они, безусловно, играют определенную роль в природной защите от ФОС (Wang et al., 1998; Nomura et al., 2005, 2008). Природные биоловушки крови вносят значительный вклад в снижение количества молекул ФОС, достигающих физи-

ологических мишеней. БХЭ является наиболее важной стехиометрической биоловушкой ФОС в плазме человека; ее концентрация около 50 нМ, а кажущаяся константа скорости второго порядка с ФОС составляет $\approx 10^7 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$. ПОН1 плазмы человека проявляет активность, определяемую как «случайная» или «разнородная» (Costa and Furlong, 2002; Mackness et al., 2008). Хотя ее первичная функция, вероятно, заключается в том, что она является липофильной лактоназой (Khersonsky and Tawfik, 2005), участвующей в защите от атеросклероза (Shih et al., 1998; Watson et al., 1995), она гидролизует многочисленные ФОС. Было показано, что животные, у которых концентрация ПОН1 в плазме высока, являются относительно устойчивыми к ФОС (Kaliste-Korhonen et al., 1996). Напротив, мыши, нокаутные по ПОН1, очень чувствительны к ФОС (Shih et al., 1998). Альбумин проявляет низкую эстеразную активность и медленно реагирует с карбамильными и фосфорильными сложными эфирами. Однако его концентрация в крови и лимфе высока ($\approx 0.6 \text{ mM}$), и, очевидно, он играет важную роль в детоксикации карбарильных соединений (Sogorb et al., 2007). Альбумин плазмы мог бы также играть роль в детоксикации ФОС (Tarhoni et al., 2007; Li et al., 2008) даже при токсикологически релевантных концентрациях (Sogorb et al., 2008).

ФОС также нейтрализуются карбоксилэстеразами (ЕС 3.1.1.1) тканей (печень) и окисляются оксидазами, такими как цитохром P450s, глутатион S-трансферазы, лакказы и пероксидазы. Глутатион S-трансферазы (ГТ; ЕС 2.5.1.18), ферменты с молекулярной массой 20-30 кДа, катализируют конъюгацию глутатиона (нуклеофильную атаку тиольной группы) с электрофильными субстратами. Эти ферменты вовлечены в процессы клеточной детоксикации эндогенных соединений и многочисленных ксенобиотиков; установлена их роль в устойчивости насекомых к инсектицидам. Детоксикация ФОС посредством ГТ происходит путем региоселективного дезалкилирования алкильной или арильной боковой цепи (Maturano et al., 1997). Имеются данные, что ГТ вносят вклад в детоксикацию ФОС у человека (Fujioka and Casida, 2007).

СТЕХИОМЕТРИЧЕСКИЕ БИОЛОВУШКИ ПРОТИВ ФОС

Введение человеческой плазмы использовалось для лечения отравления ФОС. Была проведена оценка действия свежезамороженной плазмы на уровни активности холинэстеразы и ее влияния на терапевтические эффекты, полученные у пациентов при отравлении ФОС (Güven et al., 2004). Из результатов следует, что терапия плазмой может быть эффективным альтернативным или вспомогательным методом лечения. БХЭ плазмы и, возможно, другие распространенные ФОС-улавливающие белки плазмы (например, альбумин и ПОН1) внесли вклад в этот результат.

Исследования стехиометрических ловушек в основном сфокусированы на ферментах, специфично реагирующих с ФОС – холинэстеразах (Wolfe et al., 1987) и карбоксилэстеразах (Redindo and Potter, 2005; Fleming et al., 2007). Профилактическая инъекция ферментов, способных инактивировать ФОС, быстро позволила бы первым сталкивающимся с ними людям, т.е. пожарным, техникам по обезвреживанию неразорвавшихся боеприпасов и медицинским работникам, безопасно работать в среде, где присутству-

ют отравляющие вещества. Ожидается, что внутривенное или внутримышечное введение биологических веществ людям, пораженным отравляющими веществами, значительно улучшит эффективность применяемых фармакологических мер противодействия (Ashani et al., 1998; Saxena et al., 2006). Однако ферментативная стехиометрическая нейтрализация ФОС требует введения значительных количеств дорогостоящих биологических веществ, например, около 3 мг высокоочищенной БХЭ плазмы на кг веса пациента для того чтобы противодействовать нескольким LD₅₀ ФОС (Ashani and Pistinner, 2004). Широкомасштабное производство в условиях GMP- при разумной стоимости является предметом интенсивного исследования в Северной Америке.

Для массового производства человеческой БХЭ существует два промышленных GMP-процесса. Первый – очистка природного фермента из IV фракции Кона человеческой плазмы. Один литр плазмы дает менее одного миллиграмма GMP-БХЭ. Этот процесс был разработан Baxter Healthcare Corporation в США (www.baxter.com). Высокоочищенная БХЭ из человеческой плазмы была объявлена Управлением по пище и лекарствам (Food & Drug Administration, FDA) в 2006 г. новым исследовательским лекарством для обеспечения защиты от нервно-паралитических отравляющих веществ в США (Lenz et al., 2007; Saxena et al., 2007). Фаза I клинических испытаний на добровольцах будет завершена весной 2009 г., так что фермент вскоре может появиться на рынке. Второй процесс был разработан фирмой Nexia в Канаде (www.nexiabiotech.com); в нем использовался рекомбинантный человеческий фермент, продуцируемый в молоке трансгенных коз. Несколько грамм фермента могут быть секретированы в 1 л молока. Этот рекомбинантный фермент был назван Protexia™. С 2005 г. фирма Pharmatheme в Мэриленд, США (www.pharmatheme.com) разрабатывает Protexia™, ПЭГилированные производные рекомбинантного фермента (Huang et al., 2007) и конъюгированные белки (Huang et al., 2008).

Вторичные мишени ФОС и другие ферменты, взаимодействующие с последними, являются потенциальными стехиометрическими биологическими веществами. В частности, благодаря наличию большого числа остатков аминокислот, ковалентно связывающих молекулы ФОС (5 тирозинов и 2 серина) в молекуле альбумина, последний может достаточно эффективно выполнять роль биологической (Ding et al., 2008); реакционная способность остатков тирозина может быть повышена путем химической модификации, например, нитрования, вызывающего снижение значения рK_a тирозина на несколько порядков (Masson et al., неопубликованные результаты). Модифицированный человеческий альбумин может положить начало новому поколению стехиометрических биологических веществ. Наконец, экономичной альтернативой стехиометрическим биологическим веществам на основе ферментов могли бы быть низкомолекулярные стехиометрические биологические вещества. Так, из комбинаторной библиотеки случайных пептидов были выбраны некоторые серин- и тирозинсодержащие гексапептиды, реагирующие с флуоресцентным аналогом зарина (Landry and Deng, 2006; Deng et al., 2008).

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА ПРОТИВ ФОС

Как было сказано, обезвреживание ФОС включает гидролиз фосфоэфирной связи гидролазами ангидридов ор-

ганофосфорных кислот (ГАОК), которые также называют фосфотриэстеразами (ФТЭ), или окисление до менее токсичных соединений путем деградации их алкильной/арильной цепи. Хотя работы по каталитическим антителам достигли определенного успеха (Vayron et al., 2000; Jovic et al., 2005; Reshetnyak et al., 2007), наиболее перспективной областью исследований является ре-дизайн и инженерия ферментов, способных разлагать ФОС. Эти ферменты могли бы быть использованы в качестве каталитических биологических веществ для профилактики и лечения отравлений ФОС, для местной защиты (Fisher et al., 2005) и для обеззараживания кожи, слизистых оболочек и открытых ран (Lejeune and Russell, 1999; Gill and Ballesteros, 2000). Для обеззараживания воды в биореакторах может быть использована иммобилизованная ГАОК (Simo et al., 2008), а также генетически модифицированные бактерии, ее продуцирующие. Эти компоненты могут быть внесены в установку по обеззараживанию воды с применением системы рециклирования и могут позволить слив воды без нанесения вреда окружающей среде. (Chen and Mulchandani, 1998).

ТРЕБОВАНИЯ К ФЕРМЕНТУ – ЭФФЕКТИВНОЙ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ВЕЩЕСТВУ ПРОТИВ ФОС

Существует несколько общих требований к использованию ФОС-разлагающего фермента в качестве потенциального терапевтического агента при отравлении ФОС. Ферменты должны иметь широкий спектр активностей и в идеале обладать энантиоселективностью в отношении токсических стереоизомеров. Их массовое производство в условиях GMP должно быть реализуемо при разумных затратах. Должно быть возможно их длительное хранение в полевых условиях без потери активности. Конформационная стабильность может быть оптимизирована химической модификацией или добавлением стабилизаторов.

Другие требования зависят от пути введения, системы доставки или источников и технологии получения ферментов. Для парентерального введения следует помнить, что концентрация отравляющего вещества в крови, [ФОС], даже при самых тяжелых случаях отравления всегда очень низка, гораздо ниже K_m фермента для субстратов ФОС, так что гидролиз ФОС в крови будет подчиняться кинетике псевдопервого порядка (Masson et al., 1998): $v = k_{cat}/K_m[E]$ [ФОС]. Константа скорости псевдопервого порядка представляет собой произведение бимолекулярной константы скорости (k_{cat}/K_m) и концентрации активных центров фермента [E]. Таким образом, чем выше каталитическая эффективность (k_{cat}/K_m), тем меньше доза вводимого за очень короткое время (t) фермента для очистки крови от токсических молекул. Каталитическая эффективность ферментов может быть повышена на несколько порядков путем сайт-направленного мутагенеза или химической модификации (Griffiths and Tawfik, 2003; Hill et al., 2003). Концентрация фермента в крови, которая нужна для снижения [ФОС] до нетоксических значений за время t: $[E] = X/(k_{cat}/K_m)$, где X – это фактор, за счет которого [ФОС] снижается ($X = \ln[ФОС]_0/[ФОС]_t$) (Masson et al., 2008). Поэтому следующая задача – это поддерживать концентрацию биологической, [E], в крови как можно более высокой в течение длительного времени. [E] контролируется фармакокинетикой фермента и/или частотой инъекций. Биодоступность

и биологическая стабильность вводимых парентерально стехиометрических или каталитических биологических также являются важными вопросами. Увеличение размера фермента путем полимеризации, конъюгации с альбумином, снижение микрогетерогенности гликанов и химические модификации поверхностей, контактирующих с растворителем, продлевают «функциональную жизнь» вводимых биологических. Быстрый клиренс гликопротеинов часто происходит из-за дефектов гликозилирования. Химические модификации могут существенно продлить пребывание этих препаратов в организме. Фармакокинетическое изучение гликопротеинов, вводимых парентерально животным, показало, что клиренс ферментов зависит от сиаилирования гликанов. Быстрое удаление асиалогликопротеинов из кровотока происходит из-за их захвата рецепторами галактозы, расположенными на поверхности гепатоцитов. Галактоза – это остаток, который является прешественником сиаловой кислоты на конце сложных гликанов. Фармакокинетическое изучение природных и рекомбинантных холинэстераз (ХЭ) подтвердило важность наличия остатков сиаловой кислоты на концах гликанов (Kronman et al., 1995; Saxena et al., 1998; Cohen et al., 2007; Kronman et al., 2007). Было установлено, что время полужизни ХЭ, $t_{1/2}$, обратно пропорционально числу незанятых мест присоединения сиаловой кислоты (Kronman et al., 2000). Для увеличения $t_{1/2}$ рекомбинантных ХЭ все галактозилные остатки должны быть сиаилированы. Полное сиаилирование рекомбинантных ферментов может быть достигнуто путем выбора подходящей системы экспрессии (Chitlaru et al., 1998), способной синтезировать гликаны, аналогичные природным гликанам человеческих гликопротеинов, и путем добавления ингибиторов сиалидазы в среду клеточной культуры. Было обнаружено, что совместная экспрессия человеческой АХЭ и сиаилтрансферазы в клетках НЕК 293 продуцирует полностью сиаилированный рекомбинантный фермент (Kronman et al., 2000). Альтернативно полисиаилирование очищенных ферментов *in vitro* можно осуществлять с помощью сиаилтрансферазы или используя химический метод (Gregoriadis et al., 1999). ПЭГилирование также оказалось эффективной химической модификацией для увеличения полужизни рекомбинантных ХЭ (Cohen et al., 2006, 2007; Huang et al., 2007; Kronman et al., 2007; Mazar et al., 2008; Chilukuri et al., 2008).

Недавно рекомбинантный конъюгат человеческого альбумина с человеческой БХЭ с молекулярной массой 150 кДа показал значительно улучшенную фармакокинетику при введении молодым свиньям (для рекомбинантной 70 %-тетрамерной БХЭ $t_{1/2}$ составило примерно 32 ч вместо ≈ 3 ч) (Huang et al., 2008).

Важным фактором является иммунотолерантность вводимых ферментов. Например, бактериальные ферменты в принципе не подходят для использования на людях, однако, их конъюгация с декстраном, ПЭГ или заключение в наноконтейнеры могут снизить антигенность и замедлить клиренс препарата.

Ферменты, использованные в качестве компонентов лосьонов для нанесения на кожу и глаза, а также иммобилизованные в пенах и на тканях для обеззараживания кожи и глаз (Gordon et al., 2003; Simo et al., 2008, Braue et al., 2002), способны активно действовать при условиях, ког-

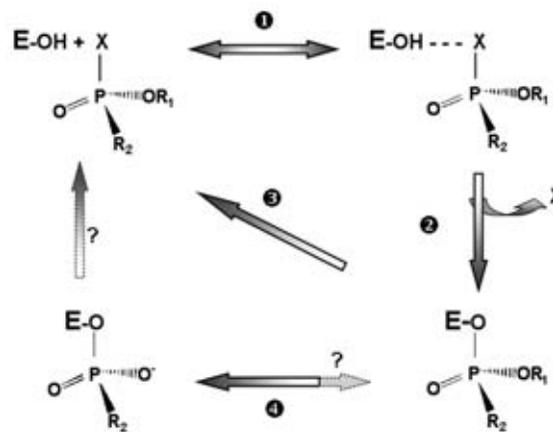


Рис. 2. Ингибирование холинэстераз ФОС и реактивация фосфорилированных ферментов. После образования обратимого комплекса между холинэстеразой и ФОС (этап 1), активированный серин (E-OH) фосфорилируется и далее происходит высвобождение ОР-уходящей группы X (этап 2). Фосфорилированная холинэстераза может быть реактивирована нуклеофильными агентами, такими как оксими (Пралидоксим, ММВ4, Обидоксим, HI-6 и др.), используемыми в качестве антидотов в случае неотложной помощи при отравлении ФОС. (Lundy et al., 2006; Worek et al., 2007) (этап 3). Фосфорилированные конъюгаты ферментов могут претерпевать деактивацию (старение) (Shafferman et al., 1996; Viragh et al., 1997; Masson et al., 1999; Li et al., 2007; Carletti et al., 2008), результатом чего происходит образование необратимо ингибированного («состарившегося») фермента (этап 4). Деактивация может происходить очень быстро ($t_{1/2} = 3$ мин при 37 °С для ацетилхолинэстеразы человека фосфорилированной зоманом). В настоящий момент фармакологических путей реактивации «состарившейся» ацетилхолинэстеразы не существует

да местная концентрация ФОС может быть очень высокой. В этом случае порядок ферментативной реакции по [ФОС] стремится к нулю, так что скорость реакции близка к максимальной скорости, $k_{cat}[E]$. Таким образом, в этих условиях эффективность зависит от концентрации и константы скорости каталитической реакции фермента. Поэтому при использовании ферментов в качестве биологических в условиях наружного применения они должны обладать высокой каталитической активностью и должны быть высококонцентрированными. Совместная иммобилизация различных ферментов могла бы стать простым путем для расширения спектра ФОС, подвергаемых разложению. Это позволило бы обеспечить одновременное обезвреживание различных агентов. Конечно, следует учитывать возможность воздействия одновременно множества агентов. Конечно, следует учитывать возможность воздействия одновременно множества агентов, в частности, при экстремальных конфликтах, криминальных и террористических актах.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ОБЕЗВРЕЖИВАЮЩИЕ ФЕРМЕНТЫ

Холинэстеразы – ФОС могут рассматриваться как «полусубстраты» холинэстераз (ХЭ) (рис. 2). Когда фермент реагирует с карбоксильными эфирами, он временно ацилируется, эта ацильная группа быстро замещается на молекулу воды. Напротив, с фосфильными эфирами стереохимия промежуточного фосфорил-фермента ограничивает доступность воды к атому фосфора. Таким образом, спонтанный гидролиз фосфорилированного фермента очень замедлен или даже невозможен. Джарв (Jarv) выдвинул постулат, что введение второго нуклеофильного «полюса»

в активный центр могло бы активировать молекулу воды, которая могла бы затем атаковать атом фосфора, приводя к разрыву связи Р-серин (Jarv, 1989). Установление трехмерной структуры АХЭ из *Torpedo californica* (Sussman et al., 1991) открыло путь к рациональному повторному дизайну ХЭ. Так, была выдвинута гипотеза о возможности превращения ХЭ в органофосфорные гидролазы (ОФГ). Была выбрана человеческая БХЭ, поскольку ее активный центр больше (500 \AA^3), чем активный центр АХЭ (300 \AA^3), и она менее стереоспецифична. Молекулярное моделирование на основе структуры АХЭ из *Torpedo californica* было использовано для создания мутантов человеческой БХЭ. Второй нуклеофильный «плюс» был создан в оксианионной полости активного центра, где глициновый остаток был замещен на гистидин. Этот первый мутант, G117H, был способен гидролизовать параоксон, зарин, экотиофат и VX (Millard et al., 1995; Lockridge et al., 1997). Однако он неوبرатимо ингибировался зоманом, поскольку «старение» конъюгата шло быстрее, чем дефосфонилирование. Механизм старения, т.е. дезалкилирование алкильной цепи на атоме фосфора, почти полностью выяснен (рис. 2). Эта реакция включает карбокатионное переходное состояние, которое стабилизируется остатками E197 и W82 активного центра и молекулами воды (Shafferman et al., 1996; Viragh et al., 1997; Masson et al., 1999; Nachon et al., 2005; Li et al., 2007). Мутация E197 на D, Q или G снижала скорость старения. Как ожидалось, двойной мутант G117H/E197Q был способен гидролизовать зоман (Millard et al., 1999). Однако каталитическая активность двойного мутанта была слишком слабой, чтобы представлять фармакологический интерес.

Обнаружение мухи (*Lucilia cuprina*), устойчивой к ФОС из-за содержания в ней мутированной карбоксилэстеразы в положении, гомологичном G117, а именно G137D, стимулировало исследование мутантов БХЭ на основе G117H. Хотя активность ГАОК мутанта G137D низкая, она компенсируется наличием фермента в органах насекомого (Newcomb et al., 1997). Было установлено, что кокаутные мыши по АХЭ и мутанты человеческой БХЭ, содержащей G117H, менее чувствительны к ФОС, чем мыши дикого типа (Wang et al., 2004). Хотя эти мыши экспрессируют мутант G117H во всех органах, в отличие от устойчивости *Lucilia cuprina*, их устойчивость к ФОС не может быть объяснена гидролизом ФОС, который является слишком медленным. Скорее всего, этот эффект связан с гидролизом избытка ацетилхолина, который накапливается в холинергических синапсах.

Более 60 двойных или тройных мутантов человеческой БХЭ с мутированными G117 (Schopfer et al., 2004) и мутантов человеческой АХЭ и АХЭ из *Bungarus fasciatus* были созданы с использованием того же подхода (Poyot et al., 2006). Обзор этих работ см. Masson et al. (2008). Ни одна из мутированных ХЭ не была более активной, чем мутант G117, и мы получили доказательство, что мутации в положении G117 вызывают смещение и потерю функциональности оксианионной полости (Masson et al., 2007).

Однако компьютерный дизайн новых ОФГ мутантов ХЭ возможен при использовании нового подхода, названного «умный» дизайн направленного мутагенеза, основанный на моделировании переходных состояний. Как было указано, этот подход был успешно применен для создания мутан-

тов БХЭ, гидролизующих (-)кокаин с большой скоростью. Предполагается, что моделирование переходных состояний дефосфонилирования поможет понять, как оптимизировать взаимодействия, способствующие продуктивному преодолению энергетического барьера дефосфонилирования. Направленная эволюция ХЭ могла бы быть альтернативой компьютерным методам исследования. Однако, функциональная экспрессия ХЭ в дрожжах трудна (Durova et al., неопубликованные результаты) и пока не удается в бактериях.

Некоторые мутанты ХЭ, чувствительные к ФОС, не подверженные старению, полностью регенерируются с помощью оксимов. Так, мутанты ХЭ, связанные с регенераторами-оксимами, действуют как псевдокаталитаторы при замещении ФОС-фрагмента, связанного с ферментом. Эти сопряженные системы фермент-регенератор могли бы привести к новому семейству псевдо-каталитических биологических (Taylor et al., 2007; Kovarik et al., 2007, 2008; Mazor et al., 2008).

Фосфотриэстеразы – ферменты, которые катализируют гидролиз фосфоэфирных связей в ФОС, являются вездесущими, например, пролидаза, названная ангидролозой органофосфорных кислот (АОФК), была идентифицирована в штамме *Alteromonas* (Cheng et al., 1999), диизопропилфторфосфатаза (ДФФФаза) находится в изобилии в кальмаре *Loligo vulgaris*; параоксоназа-1 (ПОН1) содержится в человеческой плазме. Бактериальные ферменты, называемые фосфотриэстеразами (ФТЭ; ЕС 3.1.8.1) или иногда органофосфорными гидролазами (ОФГ), органофосфат-разлагающими ферментами (ОФРФ), отдают предпочтение ФОС со связями Р-О или Р-S. ФТЭ являются членами суперсемейства амидогидролаз (Seibert and Raushel, 2005).

Бактериальные фосфотриэстеразы – Фосфотриэстеразы (ФТЭ; ЕС 3.1.8.1) кодируются геном разложения органофосфатов (*opd*), обнаруженным в *Pseudomonas diminuta*, *Flavobacterium sp.*, *Agrobacterium radiobacter*. Ген, аналогичный *opd*, был также найден в археях (Merone et al., 2005). ФТЭ из *Pseudomonas diminuta* – димерный фермент (72 kDa), содержащий два иона металла, из которых Zn^{2+} участвует в катализе (Carletti et al., в печати). Замена ионов Zn^{2+} в активном центре на ионы Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и Cd^{2+} приводит к почти полному сохранению каталитической активности. После первого установления трехмерной структуры ФТЭ из *P. Diminuta* (Benning et al., 1994), был описан ряд кристаллических структур, кинетические и спектроскопические эксперименты. Катализ ФТЭ протекает по SN_2 механизму с образованием пятикоординированного переходного состояния. Механизм нуклеофильной атаки и регенерации фермента широко обсуждается; функциональные роли катионов двухвалентных металлов и аминокислот в активном центре еще полностью не поняты (Aubert et al., 2004; Samples et al., 2007; Chen et al., 2007 Wong and Gao, 2007; Jackson et al., 2008). Недавно структура *SsoPox* (гипертермофильной ФТЭ из археи *Sulfolobus solfataricus*) дала новую информацию, которая позволила уточнить механизм (Elias et al., 2008; Del Vecchio et al., 2009). Природный субстрат ФТЭ до сих пор не идентифицирован (Ghanem and raushel, 2005), и представляется, что ФТЭ происходит из лактоназы, активность ФТЭ рассматривается как побочная (Elias

Табл. 1. Каталитическая эффективность (k_{cat}/K_m , $M^{-1} \text{ min}^{-1}$) различных природных и синтетических органофосфорных гидролаз в отношении к различным фосфо-органическим соединениям

Источник фермента	Параоксон	диизопропил-фторфосфат	Табун	Зарин	Зоман	GF	Echothiophate	VX
Человеческая ПОН1 Q192	6.8×10^5 [a]	4×10^4 [b]		9.1×10^5 [c]	2.8×10^6 [c]			+ [d]
Человеческая ПОН1 R192	2.4×10^6 [a]			7×10^4 [c]	2.1×10^6 [c]			+ [d]
Человеческая рекПОН1 в 293Т					6.2×10^5 - 4.1×10^6 [e]			
рекПОН1млекопитающих G3C9	7.2×10^5 [f]							
рекПОН1млекопитающих V346A					8.7×10^4 [g]	3.6×10^{10} [g]		
Человеческая БХЭ G117H	5.7×10^3 [h]	5.2×10^2 [h]		1.6×10^2 [i]	-		1×10^4 [h]	1.5×10^3 [i]
Карбоксилэстераза из мух G117D	2×10^5 [i]							
<i>B. fasciatus</i> AChE HQT	64 [b]	7.6×10^2 [h]					24 [b]	
<i>Loligo vulgaris</i> DFPase		7.8×10^7 [k]		2.4×10^6 [k]	2.4×10^{10} [k]			0 [k]
<i>P. diminuta</i> ОРАН	2×10^9 [l]	5.8×10^8 [m]		4.8×10^6 [n]	6×10^5 [n]	5×10^3 [o]		4×10^4 [p]
<i>Alteromonas</i> sp. JD6.5 ОРАА		4.6×10^{10} [q]			14.6 [r]			
<i>Alteromonas</i> sp. JD6.5 cloned				5.8×10^6 [r]	1×10^7 [r]	6.2×10^7 [r]		
<i>Alteromonas undina</i>			21.8 [s]	30.4 [s]	1.6×10^2 [s]	1.3×10^2 [s]		
NG108-15 гибридные клетки					2.5×10^3 [t]			

[a] Smollen et al., 1991; [b] Masson et al., 1998; [c] Davis et al., 1996; [d] C.A. Broomfield, неопубликованные результаты; [e] Yeung et al., 2008, с 4мя стереоизомерами зомана; [f] Harel et al., 2004; [g] Amitai et al., 2006; [h] Poyot et al., 2006; [i] Lockridge et al., 1997; [j] Newcomb et al., 1997; [k] Hartlieb and Ruterjans 2001; [l] Kuo et al., 1997; [m] Lai et al., 1995; [n] Dumas et al., 1990; [o] Hoskin et al., 1995; [p] Rastogi et al., 1997; [q] Cheng et al., 1999; [r] Cheng et al., 1994; [s] DeFranck et al., 1993; [t] Ray et al., 1988.

et al., 2008). В то время как каталитическая эффективность ФТЭ для параоксона, наилучшего субстрата, идентифицированного в настоящее время, достигает контролируемого диффузией предела, она низка в отношении нервно-паралитических агентов на основе ФОС (табл. 1). Между тем, направленная эволюция ФТЭ показала, что замена только трех аминокислот значительно повышает каталитическую эффективность для аналога зомана на 3 порядка (Hill et al., 2003).

Многочисленные исследования посвящены возможностям ФТЭ при ее использовании для обеззараживания, защиты кожи и биосенсорного детектирования ФОС (Lejeune and Russell, 1999; Gill and Ballesteros, 2000; Létant et al., 2005; Ghanem and Raushel, 2005; Karnati et al., 2007). Было показано, что введение ФТЭ до или после воздействия ФОС улучшает предварительное и текущее лечение отравления ФОС (Doctor and Saxena, 2005). Было показано, что *ordA* улучшает выживание после отравления высокотоксичными органофосфорными пестицидами (Bird et al., 2008). Для предотвращения слишком быстрой фармакокинетики и/или иммунологического ответа введенных бактериальных ферментов, ФТЭ можно ПЭГилировать (Jun et al., 2007, 2008) или инкапсулировать. Первые попытки по использованию ФТЭ, инкапсулированной в стерически стабилизированных липосомах, были многообещающими, так как обеспечивали защиту крыс от многих LD₅₀ органофосфорных пестицидов (Petrikovics et al., 2004). Альтернативно детоксикация крови может быть достигнута путем

экстракорпоральной циркуляции через полый волокнистый картридж, покрытый иммобилизованной ФТЭ (Masson et al., неопубликованные результаты).

ФТЭ, возможно, могли бы быть использованы для защиты кожи в качестве активных компонентов средств местной защиты кожи или ковалентно присоединенные к ороговевшему слою эпидермиса (Parsa and Green, 2001). Термостабильные ФТЭ из термофильных бактерий (Merone et al., 2005; Elias et al., 2008; Del Vecchio et al., 2009) или мутированные/сконструированные высокостабильные ферменты из мезофильных бактерий являются перспективными для использования при местной защите и обеззараживании. ФТЭ была также включена в добавки для латексного покрытия биозащитных поверхностей. Было показано, что такие добавки на основе ФТЭ для красок и покрытий сохраняют каталитические параметры и стабильность фермента (McDaniel et al., 2006). Для обеззараживания и восстановления отравленной среды альтернативный подход, заключающийся в фиторазложении трансгенными растениями (например, табаком), экспрессирующими бактериальную ФТЭ, рассматривается в качестве потенциально дешевого, безопасного и эффективного метода (Wang et al., 2008).

Человеческая параоксоназа-1 – ПОН1 является гликозилированным кальцийзависимым ферментом с молекулярной массой 45 кДа, экспрессируемым в основном в печени и связывающимся исключительно с липопротеинами высокой плотности в ассоциации с другими аполипопро-

теинами (рис. 3). ПОН1 проявляет генетический полиморфизм; самый известный – аллелизм Q192R, который имеет значительное влияние на активность ПОН1 в отношении арилэфиров и ФОС (Smolen et al., 1991) (табл. 1). Химическая модификация и направленный мутагенез позволили идентифицировать аминокислотные остатки, необходимые для активности ПОН1 (Josse et al., 1999; Yeung et al., 2004; Khersonsky and Tawfik, 2006; Amitai et al., 2007; Tavori et al., 2008; Hu et al., 2009).

Попытки установления трехмерной структуры человеческой ПОН пока не удалось. Однако молекулярное моделирование (Fokine et al., 2003; Yeung et al., 2004) и кристаллическая структура гибридного рекомбинантного варианта ПОН1 млекопитающих, полученного направленной эволюцией (Harel et al., 2004), показали, что ПОН1 – это шестилопастный β -пропеллерный белок, аналогичный ДФФазе из *Loligo vulgaris* (Katsemi et al., 2005). Каталитический механизм ДФФазы был недавно описан (Blum et al., 2006). Подтверждение сходства механизма для активности человеческой ПОН1 значительно помогло бы дизайну более активных мутантов ПОН1. «Крышка» активного центра ПОН1 находится в контактной близости к области, которая, как предполагается, способствует связыванию ПОН1 с альфа-липопротеинами высокой плотности (ЛВП). Предполагается, что гидрофобный N-конец ПОН1 способствует его прикреплению к ЛВП, но точный способ связывания ПОН1 с ЛВП, а также других связанных с ЛВП белков, до сих пор неизвестен.

Как природный фермент плазмы, человеческая ПОН1 является наиболее перспективным кандидатом в качестве каталитической биоловухи для предварительной обработки и терапии отравлений ФОС (La Du, 1996; Rochu et al., 2007a). Таким образом, ПОН1 находится в центре интенсивных исследований по улучшению ее эффективности и функционализации. Для обеспечения противодействия интоксикации нервно-паралитическими агентами каталитическая эффективность ПОН1 должна быть увеличена только на 1 или 2 порядка. Мутанты рекомбинантной ПОН1, полученные направленной эволюцией и проявляющие повышенную ОФГ-активность (Amitai et al., 2006), позволяют предположить, что эта цель вскоре будет достигнута. Однако нестабильность этих мутантов может помешать их биотехнологической разработке. Плазменная ПОН1 работает в сложной и динамической среде частиц ЛВП, которые содержат до 90 ассоциированных белков (Vaisar et al., 2007). Поэтому ПОН1 должна быть ассоциирована с аполипопротеиновыми партнерами для сохранения своей стабильной активной конформации (James and Deakin, 2004; Gaidukov and Tawfik, 2005).

Недавно был открыт человеческий фосфатсвязывающий белок (ЧФСБ) – аполипопротеин, который связывает неорганический фосфат в крови. Были установлены его трехмерная структура и полная аминокислотная последовательность (Morales et al., 2006; Diemer et al., 2008). Условия для разделения ЧФСБ и ПОН1 *in vitro* показали, что ЧФСБ прочно связан с ПОН1 (Renault et al., 2006). Более того, стабилизация активных форм человеческой ПОН1 с помощью ЧФСБ показывает, что последний действует как функциональный шаперон (Rochu et al., 2007b,c; Cléry-Barraud et al., 2009).

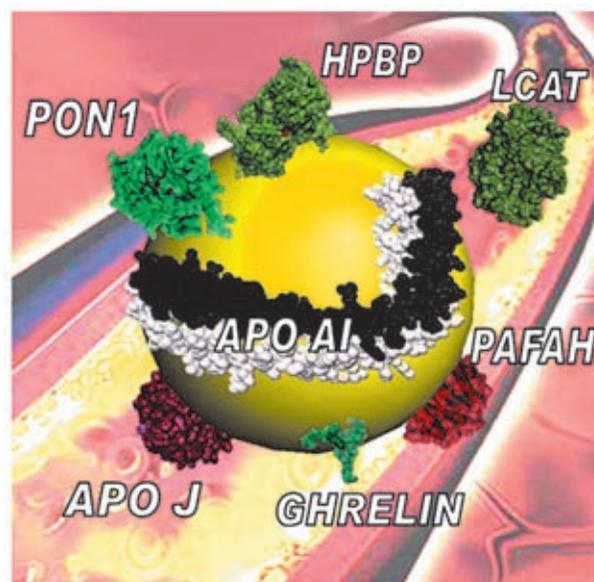


Рис. 3. Схематическое представление ПОН1-содержащих частиц липопротеинов высокой плотности (ЛВП). ЛВП представляют собой сферы диаметром около 10 нм с неполярным кором холестерина и триглицеридов, инкапсулированных в аполипопротеины и триглицериды, образующие монослои. Среди множества ЛВП-ассоциированных белков, вовлеченных в метаболизм липидов, регуляцию активности комплемента и ингибирование протеаз (Vaisar et al., 2007), некоторые ассоциированы с ПОН1. Было показано, что эти ЛВП со-выделяются с ПОН1 и являются контаминирующими составляющими очищенных фракций ПОН1. ПОН1 – параоксоназа 1. HPBP – липопротеины высокой плотности. LCAT – лецитин-холестерин-ацетилтрансфераза. PAFAH – ацетилгидролаза тромбоцит-активирующего фактора. APO A1 – аполипопротеин А1. APO J – аполипопротеин J. GHRELIN – пептидный гормон грелин

Мы попытались осуществить со-кристаллизацию комплекса ПОН1-ЧФСБ. Для этого в качестве первой стадии нужно было создать гибридный ген для совместной экспрессии ЧФСБ и ПОН1 в *E. coli*. С этой целью на основе аминокислотной последовательности был синтезирован ген ЧФСБ. Ожидается, что совместная экспрессия, целью которой было способствовать правильной укладке активной ПОН1 и стабилизации активной функциональной конформации фермента, позволит получить кристаллизуемый комплекс ПОН1-ЧФСБ. Наконец, предполагается, что пригодные для дифракции кристаллы комплекса позволят установить трехмерную структуру природной человеческой ПОН1. Эта ключевая фаза будет первой ступенью на пути, ведущем к разработке стабильных мутантов человеческой ПОН1 с повышенной каталитической эффективностью против ФОС. То, что функциональная экспрессия человеческой ПОН1 представляется осуществимой (Stevens et al., 2008), могло бы облегчить биотехнологию ПОН1 и открыть новые перспективы.

ДРУГИЕ ФЕРМЕНТЫ. В биоразложении ФОС участвуют другие гидролазы, такие как ангидролазы ортофосфорной кислоты (АОФК; ЕС 3.1.8.2) и ортофосфат-разлагающие агенты (ОФРА) или пролидазы (ЕС 3.4.13.9). Пролидазы были впервые выделены из галофильных бактерий (*Alteromonas haloplanktis* и *A. sp.* JD6.5). Пролидаза из *A. sp.* JD6.5 – АОФК, проявляющая наивысшую из известных активностей против зомана ($k_{cat} = 3100 \text{ c}^{-1}$), но неактивная

против VX (Cheng et al., 1999). ОФРА был включен в качестве активного ингредиента в Landguard™ OP-A, состав, разработанный для обработки воды ливневой канализации, обработки оборудования и обеззараживания почвы (Dawson et al., 2008). Поскольку эти применения связаны с сельскохозяйственным и лекарственным рынком, модификации, необходимые для детоксикации, будут относительно небольшими, поскольку фермент может быть применен в форме порошка, жидкости или в связанных с матрицей формах.

Пролидаза была также выделена из печени человека. Она проявляет высокую каталитическую активность против зомана и проявляет гомологию последовательностей с пролидазой из *Aleromonas haloplanktis* (Wang et al., 1998). Человеческая пролидаза была клонирована и экспрессирована в *Sacharromyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*, и представляется, что она является одним из наиболее интересных ФОС-разлагающих ферментов для защиты от нервно-паралитических отравляющих веществ (Wang et al., 2005; Wang et al., 2006). Недавно открытая человеческая цитозольная аминопептидаза (АП; ЕС 3.4.11.9) могла бы также стать ценной каталитической биологической против органофосфатов и органофосфонатов (Hsu et al., 2008).

Лакказы (ЕС 1.10.3.2) представляют собой фенольные оксидоредуктазы грибов и используются для детоксикации множества ксенобиотиков (Richardt and Blum, 2008). Было обнаружено, что лакказы из *Pleurotus ostreatus* и *Chaetomium thermophilum* быстро разлагают VX и VR в присутствии 2,2'-азинобис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоната) (АБТС) в качестве медиатора (Amitai et al., 1998). Мы обнаружили, что лакказы из *Trametes versicolor* и *Corioloropsis polyzona* с АБТС проявляют аналогичные свойства против V-агентов (Trovaslet et al., неопубликованные результаты). Гем-содержащая хлорпероксидаза (ЕС 1.11.1.X) из *Caldaromyces fumago* с пероксидом в качестве совместного субстрата является другим эффективным ферментом, разлагающим VX (Amitai et al., 2003).

Эти ферменты представляют интерес для разрушения запасов химического оружия, восстановления почвы, обеззараживания материалов защитного снаряжения и воды, зараженной пестицидами и нервно-паралитическими агентами (Russel et al., 2003). В частности, фосфоротиолаты, такие как VX, относительно устойчивы к ФТЭ. Таким образом, окислительное расщепление связи P-S может быть достигнуто с помощью оксидаз, таких как лакказы. Эти ферменты могли бы быть использованы вместе с другими ФОС-разлагающими ферментами для обеззараживания и местной защиты кожи. Хотя работы по совместному действию оксидаз и гидролаз до сих пор не были осуществлены, ожидается, что окисление связанных с фосфором алкильных/арильных цепей оксидазами изменит энантиоселективность ФТЭ по отношению к родственным ФОС и поэтому улучшит эффективность каталитических биологических.

ВЫВОДЫ И НАПРАВЛЕНИЯ БУДУЩИХ ИССЛЕДОВАНИЙ. Ферменты, разлагающие ФОС, были выделены из человеческих органов, различных видов животных, грибов и бактерий. Идентификация и выделение новых природных ферментов, в частности, из насекомых, устойчивых к фосфорорганическим

пестицидам, и среди вторичных мишеней ФОС у человека, является активным полем для исследования. Потенциальные «экстремозимы» были открыты также в галофильных, термофильных и пьезофильных бактериях и в других экстремальных условиях окружающей среды (Merone et al., 2005; Feerer et al., 2007). Все эти ферменты могут быть выделены из их природных источников. Однако получение природных ферментов в условиях производства ГМР является дорогостоящим. Поэтому перспективными с точки зрения биофармацевтического применения являются, главным образом, рекомбинантные ферменты. Эти ферменты могут быть получены в прокариотических системах экспрессии (*E. coli*), в эукариотических системах экспрессии (дрожжи, насекомые, культуры клеток млекопитающих), в трансгенных животных (черви, кролики, козы), трансгенных растениях (томаты, картофель, табак), а также в бесклеточных биосинтетических системах. Целью современных исследований в области белковой инженерии является улучшение массового производства стабильных ферментов с низкими затратами.

Улучшение каталитической активности кокаингидролаз и АОФК, разлагающих нервно-паралитические отравляющие вещества и пестициды, *in vitro* и *in vivo* является весьма животрепещущей проблемой. Улучшение термодинамической стабильности для длительного хранения в растворе или в виде лиофилизированных форм и функциональная стабильность *in vivo*, улучшение иммунологической толерантности и биодоступности являются важными практическими задачами этой области. Молекулярное моделирование и моделирование переходного состояния, подходы с использованием направленного мутагенеза и направленной эволюции в комбинации с химической модификацией были успешно использованы для улучшения свойств ферментов в качестве каталитических биологических. (Bershtein and Tawfik, 2008). Наконец, фармакокинетические, токсикокинетические и иммунологические исследования на моделях животных, а затем на добровольцах позволяют обосновать применение тех или иных ферментов в качестве активных терапевтических агентов. Множество ферментов будут включены в активные местные средства защиты кожи и инструменты для обеззараживания. Вскоре каталитические биологические займут свое место среди медицинских мер противодействия для профилактики и лечения острого отравления ФОС и лечения кокаиновой передозировки.

В будущем генная терапия могла бы противостоять ФОС. Эта стратегия представит возможность временно продуцировать гуманизированные ФОС-разлагающие ферменты в организме. Обнадеживающие результаты уже получены для человеческих АХЭ и БХЭ (Li et al., 2006; Chilukuri et al., 2008) и человеческой ПОН1 (Conwan et al., 2001; Fu et al., 2005; Bradshaw et al., 2005; Miyoshi et al., 2007; Guns et al., 2007; Zhang et al., 2008). Наиболее эффективным подходом представляется использование мутированных генов ПОН1, кодирующих фермент с высокой ОФГ-активностью против пестицидов и нервно-паралитических агентов. Некоторые исследования, используя различные векторы генной доставки у мышей, показали, что уровень ПОН1 в плазме повышается. Высокие уровни ПОН1 замедлили и даже предотвратили проникновение ФОС в мозг и сни-

зили симптомы атеросклероза (Conwanet et al., 2001; Fu et al., 2005; Bradshaw et al., 2005; Guns et al., 2008). Направленная доставка гена ПОН1 с использованием вектора на основе вируса Сендай ингибировала неонатальную гиперплазию после артериального повреждения у кроликов, которых кормили пищей с высоким содержанием жиров (Miyoshi et al., 2007). Перенос человеческого гена ПОН1Q мыши привел к эффективной экспрессии фермента, способного защитить

печень от окислительного стресса (Zhang et al., 2008). Таким образом, повышенная экспрессия ПОН1 с помощью генной терапии могла бы быть полезной для различных функций фермента. Между тем, и множественные, и неверно идентифицированные активности ПОН1 определенно указывают, что стратегия периодического повторяющегося введения высоких концентраций ПОН1 должна применяться с осторожностью. ●

Список литературы:

- Aas, P. (2003) *Prehosp. Disast. Med.* V18, P208.
- Afriat, L., Roodveldt, C., Manco, G., and Tawfik, D.S. (2006) *Biochemistry* V45, P13677.
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Aracava, Y., Fawcett, W.P., Oliveira, M., Randal, W.R., Hamilton, T.A., Kan, R.K., Romano, J.A., Jr., and Adler, M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V103, P13220.
- Amitai, G., Adani, R., Sod-Moriah, I., Rabinovitz, A., Vincze, H., Leader, H., Chefetz, B., Leibovitz-Persky, L., Friesem, D., and Hadar, Y. (1998) *FEBS Lett.* V438, P195.
- Amitai, G., Adani, R., Herschkovitz, M., Bel, P., Rabinovitz, I., and Meshulam, H. (2003) *J. Appl. Toxicol.* V23, P225.
- Amitai, G., Gaidukov, L., Adani, R., Yishay, S., Yacov, G., Kushnir, M., Teitlboim, S., Lindenbaum, M., Bel, P., Khersonsky, O., Tawfik, D.S., and Meshulam, H. (2006) *FEBS J.* V273, P1906.
- Amitai, G., Gupta, R.D., and Tawfik, D.S. (2007) *HFSP J.* V1, P67.
- Ashani, Y., Leader, H., Rothschild, N., and Dosoretz, C. (1998) *Biochem. Pharmacol.* V55, P159.
- Ashani, Y., and Pistinner, S. (2004) *Toxicol. Sci.* V77, P358.
- Aubert, S.D., Li, Y., and Raushel, F.M. (2004) *Biochemistry* V43, P5707.
- Belogurov, A., Kozyr, A., Ponomarenko, N. and Gabibov, A. (2009) *BioAssays*, in press.
- Benning, M.M., Kuo, J.M., Raushel, F.M., and Holden, H.M. (1994) *Biochemistry* V33, P15001.
- Bershtein, S., and Tawfik, D.S. (2008) *Curr. Opin. Chem. Biol.* V12, P151.
- Bird, S.B., Sutherland, T.D., Gresham, C., Oakeshott, J., Scott, C. and Eddleston, M. (2008) *Toxicology* V247, P88.
- Blum, M.-M., Löhr, F., Richardt, A., Rüterjans, H., and Chen, J.C.-H. (2006) *J. Am. Chem. Soc.* V128, P12750.
- Bradshaw, G., Gutierrez, A., Miyake, J.H., Davis, K.R., Li, A.C., Glass, C.K., Curtiss, L.K., and Davis, R.A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V102, P11029.
- Braue, E.H., Hobson, S.T., Govardhan, C., and Khalaf, N. (2002) *U.S. Patent n° US 6,410,604 B1*, Jun. 25.
- Brimjoin, S., Gao, Y., Anker, J., Gliddon, L.A., LaFleur, D., Shah, R., Zhao, Q., Singh, M. and Carroll, M.E. (2008) *Neuropsychopharmacol.* V33, P2715.
- Brown, C.M., Reisfeld, B. and Mayeno, A.N. (2008) *Drug Metab. Rev.* V40, P1.
- Carletti, E., Li, H., Li, B., Ekstrom, F., Nicolet, Y., Loiodice, M., Gilon, E., Froment, M.T., Lockridge, O., Schopfer, L.M., Masson, P. and Nachon, F. (2008) *J. Am. Chem. Soc.* V130, P16011.
- Carletti, E., Jacquamet, L., Loiodice, M., Rochu, D., Masson, P., and Nachon, F. (2009) *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, in press.
- Casida, J.E., and Quistad, G.B. (2004) *Chem. Res. Toxicol.* V17, P983.
- Chen, S.-L., Fang, W.-H., and Himo, F. (2007) *J. Phys. Chem. B.* V111, P1253.
- Chen, W., and Mulchandani, A. (1998) *TIBTECH*, V16, P71.
- Cheng, T.-C., Harvey, S.P., and MacKenzie, A. (1994) in: *Proceedings of the 1993 ERDEC Scientific Conference on Chemical Defense Research AD-A286742*, P955.
- Cheng, T.-C., DeFrank, J.J., and Rastogi, V.K. (1999) *Chem.-Biol. Interact.* V119-120, P455.
- Chilukuri, N., Sun, W., Naik, R.S., Parikh, K., Tang, L., Doctor, B. and Saxena, A. (2008) *Chem. Biol.-Interact.* V175, P255.
- Chilukuri, N., Duysen, E.G., Parikh, K., Sun, W., Doctor, B.P., Lockridge, O. and Saxena, A. (2008) *Chem.-Biol. Interact.* V175, P327.
- Chitlaru, T., Kronman, C., Zeevi, M., Kam, A., Harel, A., Ordentlich, A., Velan, B., and Shaffer, A. (1998) *Biochem J.* V336, P647.
- Cléry-Barraud, C., Renault, F., Leva, J., El Bakdouri, N., Masson, P., and Rochu, D. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, in press.
- Cohen, O., Kronman, C., Raveh, L., Mazor, O., Ordentlich, and A. Shaffer, A. (2006) *Mol. Pharmacol.* V70, P1121.
- Cohen, O., Kronman, C., Lazar, A., Velan, B., and Shaffer, A. (2007) *J. Biol. Chem.* V282, P35491.
- Costa, L.G., and Furlong, C.E. Eds. (2002). "Paraoxonase (PON1) In Health and Disease: Basic and Clinical Aspects". Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Costa, L.G. (2006) *Clin. Chim. Acta* V366, P1.
- Cowan, J., Sinton, C.M., Varley, A.W., Wiens, F.H., Haley, R.W., and Munford, R.S. (2001) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* V173, P1.
- Davis, H.G., Richter, R.J., Keifer, M., Broomfield, C.A., Sowalla J., and Furlong, C.E. (1996) *Nature Genet.* V14, P334.
- Dawson, R.M., Pantelidis, S., Rose, H.R., and Kotsonis, S.E. (2008) *J. Hazard Mater.* V157, P308.
- DeFranck, J.J., Beaudry, W.T., Cheng, T.C., Harvey, S.P., Stroup, A.N., and Szafraniec, L.L. (1993) *Chem.-Biol. Interact.* V87, P141.
- Deng, S.X., Zhu, Z.Z., Vinogradov, M., Macdonald, J., Stojanovic, M.N. and Landry, D.W. (2008) *Bioscience Review* 2008, Hunt Valley, MD, USA, June1-6. P6.
- Diemer, H., Elias, M., Renault, F., Rochu, D., Contreras-Martel, C., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., and Chabrière E. (2008) *Proteins.* V71, P1708.
- Ding, S.-J., Carr, J., Carlson, E., Xue, W., Li, Y., Schopfer, L.M., Li, B., Nachon, F., Asojo, O., Thompson, C.M., Hinrichs, S.H., Masson, P., and Lockridge, O. (2008) *Chem. Res. Toxicol.* V21, P1787.
- Doctor, B.P., and Saxena, A. (2005) *Chem.-Biol. Interact.* V157-158, P167.
- Dumas, D.P., Durst, H.D., Landis, W.G., and Raushel, F.W. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* V277, P155.
- Eddelston, M., Buckley, N.A., Eyer, P., and Dawson, A.H. (2008) *Lancet*, V371, P597.
- Elias, M., Dupuy, J., Merone, L., Mandrich, L., Porzio, E., Moniot, S., Rochu, D., Lecomte C., Rossi, M., Masson, P., Manco, G., and Chabrière E. (2008) *J.Mol. Biol.* V379, P1017.
- Del Vecchio, P., Elias, M., Merone, L., Graziano, G., Dupuy, J., Mandrich, L., Carullo, P., Fournier, B., Rochu, D., Rossi, M., Masson, P., Chabrière E. and Manco, G. (2009). *Extremophiles*, in press.
- Eyer, P., Szinicz, L., Thiermann, H., Worek, F., and Zilker, T. (2007) *Toxicology* V233, P108.
- Feerer, M., Golyshina, O., Beloqui, A., and Golyshin, P.N. (2007) *Current Opin. Microbiol.* V10, P207.
- Fisher, S., Arad, A., and Margalit, R. (2005) *Arch. Biochem. Biophys.* V434, P108.
- Fleming, C.D., Edwards, C.E., Kirby, S.D., Maxwell, D.M., Potter, P.M., Cerasoli, D.M., and Redindo, M.R. (2007) *Biochemistry* V46, P5063.
- Fokine, A., Morales, R., Contreras-Martel, C., Carpentier, P., Renault, F., Rochu, D., and Chabrière, E. (2003) *Acta Cryst. D* V59, P2083.
- Fu, A.L., Wang, Y.X., and Sun, M.J. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V328, P901.
- Fujioka, K., and Casida, J.E. (2007) *Chem. Res. Toxicol.* V20, P1211.
- Gaidukov, L., and Tawfik, D.S. (2005) *Biochemistry* V44, P11843.
- Ghanem, E., and Raushel, F.M. (2005) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* V207, P459.
- Gill, I., and Ballesteros, A. (2000) *Biotechnol. Bioeng.* V70, P400.
- Gordon, R.C., Doctor, B.P., Saxena, A., Feaster, S.R., Maxwell, D., Ross, M., Lenz, D., Lejeune, K., and Russell, A. (2003) *U.S. Patent n° US 6,642,037 B2*, Nov. 4.
- Gregoriadis, G., Fernandes, A. and McCormack, B. (1999) *S.T.P. Pharma Sci.* V9, P61.
- Griffiths, A.D., and Tawfik, D.S. (2003) *EMBO J.* V22, P24.
- Grigoryan, H., Halebyan, G., Lefebvre, B., Brasme, B. and Masson, P. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, V1784, P1818.
- Guns, P.-J., Van Assche, T., Verreth, W., Franssen, P., Mackness, B., Mackness, M., Holvoet, P., and Bult, H. (2008) *Brit. J. Pharmacol.* V153, P508.
- Güven, M., Sungur, M., Eser, B., Sari, I., and Altuntas, F. (2004) *Clin. Toxicol.* V42, P617.
- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., Dvir, H., Ravelli, R.B.G., McCarty, A., Tokar, L., Silman, I., and Sussman, J. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.* V11, P412.
- Hartlieb, J., and Rüterjans, H. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* V1546, P312.
- Hill, C.M., Li, W.S., Thoden, J.B., Holden, H.M., and Raushel, F.M. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* V125, P8990.
- Hoffman, R., Morasco, R. and Goldfrank, L. (1996) *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, V34, P259.
- Lynch, T., Mattes, C., Singh, A., Bradley, R., Brady, R. and Dretchen, K. (1997) *J. Appl. Pharmacol.*, V145, P363.
- Hu, X., Jiang, X., Lenz, D.E., Cerasoli, D.M., and Wallqvist, A. (2009) *Proteins*. In press.
- Huang, Y.J., Huang, Y., Baldassarre, H., Wang, B., Lazaris, A., Leduc, M., Bilodeau, A.S., Bellemare, A., Côté, M., Herskovits, P., Touati, M., Turcotte, C., Valeanu, L., Lemée, N., Wilgus, H., Bégin, I., Bhatia, B., Rao, K., Neveu, N., Brochu, E., Pierson, J., Hockley, D.K., Cerasoli, D.M., Lenz, D.E., Karatzas, C.N., and Langermann, S. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V104, P13603.
- Huang, Y.J., Lundy, P.M., Lazaris, A., Huang, Y., Baldassarre, H., Wang, B., Turcotte, C., Cote, M., Bellemare, A., Bilodeau, A.S., Brouillard, S., Touati, M., Herskovits, P., Begin, I., Neveu, N., Brochu, E., Pierson, J., Hockley, D.K., Cerasoli, D.M., Lenz, D.E., Wilgus, H., Karatzas, C.N., and Langermann, S. (2008) *BMC Biotechnol.* V8, P50.
- Inaba, T., Stewart, D.J. and Kalow, W. (1978) *Clin. Pharmacol. Ther.* V23, P547.
- Järvi, J. (1989) in "Enzymes hydrolysing organophosphorus compounds" (E. Reiner, W.N. Aldridge, and F.C.G. Hoskin, Eds.), Ellis Horwood Ltd, Chichester, UK, P221.
- Jackson, C.J., Foo, J.-L., Kim, H.-K., Carr, P.D., Liu, J.-W., Salem, G., and Ollis, D.L. (2008) *J. Mol. Biol.* V375, P1189.
- James, R.W., and Deakin, S.P. (2004) *Free Rad. Biol. Med.* V37, P1986.
- Josse, D., Xie, W., Renault, F., Rochu, D., Schopfer, L.M., Masson, P., and Lockridge, O. (1999) *Biochemistry* V38, P2816.
- Jovic, F., Louise, L., Mioskowski, C., and Renard, P.Y. (2005) *Tetrahedron Lett.* V46, P6809.
- Jun, D., Kuca K., Bajgar, J., Hruby, M., Kucka, J., Renault, F., and Masson, P. (2007) *Toxicology*, V233, P235.
- Jun, D., Musilova, L., Nachon, F., Rochu, D., Renault, F., Masson, P. (2008) *Bioscience Review Meeting 2008*, Hunt Valley, MA, USA, 1-6 June 2008.
- Kaliste-Korhonen, E., Tuovinen, K., and Hänenen, O. (1996) *Hum. Exp. Toxicol.* V15, P92.
- Karnati, C., Du, H., Ji, H.-F., Xu, X., Lvov, Y., Mulchandani, A., Mulchandani, P., and Chen, W. (2007) *Biosens. Bioelectron.* V22, P2636.
- Katsemi, V., Lücke, C., Koepke, J., Löhr, F., Maurer, S., Fritzsche, G., and Rüterjans, H. (2005) *Biochemistry* V44, P9022.
- Khersonsky, O., and Tawfik, D.S. (2005) *Biochemistry* V44, P6371.
- Khersonsky, O., and Tawfik, D.S. (2006) *J. Biol. Chem.* V281, P7649.

- 86.Kovarik, Z., Radic, Z., Berman, H.A., and Taylor, P. (2007) *Toxicology* V233, P79.
- 87.Kovarik, Z., Calić, M., Sinko, G., Bosak, A., Berend, S., Vrdoljak, A.L., and Radić, B. (2008) *Chem.-Biol. Interact.* V175, P173.
- 88.Kronman, C., Velan, B., Marcus, D., Ordentlich, A., Reuveny, S., and Shafferman, A. (1995) *Biochem. J.* V311, P959.
- 89.Kronman, C., Chitlaru, T., Elhanany, E., Velan, B., and Shafferman, A. (2000) *J. Biol. Chem.* V275, P29488.
- 90.Kronman, C., Cohen, O., Raveh, L., Mazor, O., Ordentlich, A., and Shafferman, A. (2007) *Toxicology* V233, P40.
- 91.Kuo, J.N., Chae, M.Y., and Raushel, F.M. (1997) *Biochemistry* V36, P1982.
- 92.La Du, B.N. (1996) *Nature Med.* V2, P1186.
- 93.Lai, K., Stolowich, N.J., and Wild, J.R. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* V318, P59.
- 94.Landry, D.W., Zhao, K., Yang, G. X. Q., Glickman, M. and Georgiadis, T.M. (1993) *Science*, V259, P1899.
- 95.Landry, D.W., and Deng, S.X. (2006) United States Patent N° 20060216778.
- 96.Larsen, N.A., de Prada, P., Deng, S.X., Mittal, A., Braskett, M., Zhu, X., Wilson, I.A. and Landry, D.W. (2004) *Biochemistry*, V43, P8067.
- 97.Létant, S.E., Kane, S.R., Hart, B.R., Hadi, M.Z., Cheng, T.-C., Rastogi, V.K., and Reynolds, J.G. (2005) *Chem. Commun.* V7, P851.
- 98.Lejeune, K.E., and Russell, A. J. (1999) *Biotechnol. Bioengn.* V62, P659.
- 99.Lenz, D.E., Broomfield, C.A., Yeung, D.T., Masson, P., Maxwell, D.M., and Cerasoli, D.M. (2007) in "Chemical warfare agents: chemistry, pharmacology and therapeutics" (J.A. Romano, B. Luckey, and H. Salem Eds), CRC Press, Boca Raton, P175.
- 100.Li, B., Sedlacek, M., Manoharan, I., Boopathy, R., Duysen, E.G., Masson, P. and Lockridge, O. (2005) *Biochem. Pharmacol.* V70, P1673.
- 101.Li, B., Duysen, E.G., Poluektova, L.Y., Murrin, L.C., and Lockridge, O. (2006) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* V214, P152.
- 102.Li, H., Schopfer, L.M., Nachon, F., Froment, M.-T., Masson, P., and Lockridge, O. (2007) *Toxicol. Sci.* V100, P136.
- 103.Li, B., Nachon, F., Froment, M.T., Verdier, L., Debouzy, J.C., Brasme, B., Gillon, E., Schopfer, L.M., Lockridge, O., and Masson, P. (2008) *Chem. Res. Toxicol.* V21, P421.
- 104.Lockridge, O. (1990) *Pharmac. Ther.* V47, P35.
- 105.Lockridge, O., Blong, R.M., Masson, P., Millard, C.B., and Broomfield, C.A. (1997) *Biochemistry* V36, P786.
- 106.Lockridge, O., Duysen, E. G. and Masson, P. (2009) In: *Anticholinesterase pesticides: metabolism, neurotoxicity, and epidemiology*, (Sato, T. and Gupta, R.C., Eds), Elsevier, in press.
- 107.Lundy, P.M., Raveh, L., and Amitai, G. (2006) *Toxicol. Rev.* V25, P1.
- 108.Lynch, T., Mattes, C., Singh, A., Bradley, R., Brady, R. and Dretchen, K. (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, V145, P363.
- 109.Mackness, B., Mackness, M., Aviram, M., and Paragh, G. Eds. (2008) "The paraoxonase: their role in disease development and xenobiotic metabolism". Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- 110.McKenzie, K.M., Mee, J.M., Rogers, C.J., Hixon, M.S., Kaufmann, G.F. and Janda, K.D. (2007) *J. Mol. Biol.* V365, P722.
- 111.Masson, P., Josse, D., Lockridge, O., Viguié, N., Taupin, C., and Buhler, C. (1998) *J. Physiol.* V92, P357.
- 112.Masson, P., Cléry, C., Guerra, P., Redslob, A., Albaret, C., and Fortier, P.-L. (1999) *Biochem. J.* V343, P361.
- 113.Masson, P., Froment, M.T., Gillon, E., Nachon, F., Lockridge, O., and Schopfer, L.M. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* V1774, P16.
- 114.Masson, P., Nachon, F., Broomfield, C.A., Lenz, D.E., Verdier, L., Schopfer, L.M., and Lockridge, O. (2008) *Chem.-Biol. Interact.* V175, P273.
- 115.Maturano, M.D., Bongibault, V., Willson, M., Kláčb, A., and Fournier, D. (1997) *Tetrahedron* V53, P17241.
- 116.Maxwell, D.M., Brecht, K.M., Koplovitz, I., and Sweeney, R.E. (2006) *Arch. Toxicol.* V80, P756.
- 117.Mazor, O., Cohen, O., Kronman, C., Raveh, L., Stein, D., Ordentlich, A. and Shafferman, A. (2008) *Mol. Pharmacol.* V74, P755.
- 118.McDaniel, C.S., McDaniel, J., Wales, M.E., and Wild, J.R. (2006) *Prog. Organ. Coatings* V55, P182.
- 119.Merone, L., Mandrich, L., Rossi, M., and Manco G. (2005) *Extremophiles* V9, P297.
- 120.Millard, C.B., Lockridge, O., and Broomfield, C.A. (1995) *Biochemistry* V34, P15925.
- 121.Millard, C.B., Lockridge, O., and Broomfield, C.A. (1999) *Biochemistry* V37, P237.
- 122.Miners, J.O., Knights, K.M., Houston, J.B. and Mackenzie, P.L. (2006) *Biochem. Pharmacol.* V71, P1531.
- 123.Miyoshi, M., Nakano, Y., Sakagushi, T., Ogi, H., Oda, N., Suenari, K., Kiyotani, K., Ozono, R., Oshima, T., Yoshida, T., and Chayama, K. (2007) *Hypertens. Res.* V30, P85.
- 124.Morales, R., Berna, A., Carpentier, P., Contreras-Martel, C., Renault, F., Nicodeme, M., Chesne-Seck, M.-L., Bernier, F., Schaeffer, C., Diemer, H., Van-Dorsseleer, A., Fontecilla-Camps, J.C., Masson, P., Rochu, D., and Chabrière, E. (2006) *Structure* V14, P601.
- 125.Moriarty, L.M., Lally, M.N., Carolan, C.G., Jones, M., Clancy, J.M. and Gilmer, J.F. (2008) *J. Med. Chem.* V51, P7991.
- 126.Nachon, F., Asajo, O.A., Borgstahl, G.E.O., Masson, P., and Lockridge, O. (2005) *Biochemistry* V44, P1154.
- 127.Newcomb, R.D., Campbell, P.M., Ollis, D.L., Cheah, E., Russell, R.J., and Oakeshott, J.G. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V94, P7464.
- 128.Nicolet, Y., Lockridge, O., Masson, P., Fontecilla-Camps, J.C., and Nachon, F. (2003) *J. Biol. Chem.* V278, P41141.
- 129.Nomura, D.K., Leung, D., Chiang, K.P., Quistad, G.B., Cravatt, B.F., and Casida, J.E. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V102, P6195.
- 130.Nomura, D.K., Fujioka, K., Issa, R.S., Ward, A.M., Cravatt, B.F., and Casida, J.E. (2008) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* V228, P42.
- 131.Pan, Y., Gao, D., Yang, W., Cho, H., Yang, G., Tai, Hh., and Zhan, CG. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V102, P16656.
- 132.Pan, Y., Gao, D. and Zhan, C.G. (2008) *J. Am. Chem. Soc.* V130, P5140.
- 133.Parsa, R., and Green, H. (2001) in "Proceedings of the Internal Symposium on Applications of Enzymes in Chemical and Biological Defense". Orlando, FL.
- 134.Petrikovics, I., Papahadjopoulos, D., I. Hong, K., Cheng, T.C., Baskin, S.I., Jiang, J., Jaszberenyi, J.C., Logue, B.A., Szilasi, M., McGuinn, W.D., and Way, J.L. (2004) *Toxicol. Sci.* V77, P258.
- 135.Potter, P.M. and Wadkins, R. (2006) *Curr. Med. Chem.* V11, P1045.
- 136.Poyot, T., Nachon, F., Froment, M.T., Loidice, M., Wieseler, S., Schopfer, L.M., Lockridge, O., and Masson, P. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* V1764, P1470.
- 137.Rastogi, V.K., Defranck, J.J., Cheng, T.-C., and Wild, J.R. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V241, P294.
- 138.Ray, R. Boucher, L.J., and Lenz, D.E. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* V967, P373.
- 139.Redinbo, M.R., and Potter, P.M. (2005) *Drug Discov.Today* V10, P313.
- 140.Renault, F., Chabrière, E., Andrieu, J.P., Dublet, B., Masson, P., and Rochu, D. (2006) *J. Chromatogr. B* V836, P15.
- 141.Reshetnyak, A.V., Armentano, M.F., Ponomarenko, N.A., Vizzuso, D., Durova, O.M., Ziganshin, R., Serebryakova, M., Govorum, V., Gololobov, G., Morse, H.C., Friboulet, A., Makker, S.P., Gabibov, A.G. and Tramontano, A. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, V129, P16175.
- 142.Richardt, A., and Blum, M.M. (2008) Decontamination of warfare agents: enzymatic methods for the removal of B/C weapons, Wiley-VCH, Berlin, 311 pages.
- 143.Rochu, D., Chabrière, E., and Masson, P. (2007a) *Toxicology* V233, P47.
- 144.Rochu D., Renault, F., Cléry-Barraud, C., Chabrière, E., and Masson P. (2007b) *Biochim. Biophys. Acta* V1774, P874.
- 145.Rochu D., Chabrière, E., Renault, F., Elias, M., Cléry-Barraud, C., and Masson P. (2007c) *Biochem. Soc. Trans.* V35, P1616.
- 146.Russel, A.J., Berberich, J.A., Drevon, G.F., and Koepsel, R.R. (2003) *Annu. Rev. Biomed. Engrn.* V5, P1.
- 147.Samples, C.R., Raushel, F.M., and DeRose, V.J. (2007) *Biochemistry* V46, P3435.
- 148.Sato, T. and Hosokawa, M. (2006) *Chem.-Biol. Interact.* V162, P195.
- 149.Saxena, A., Ashani, Y., Raveh, L., Stevenson, D., Patel, T., and Doctor, B.P. (1998) *Mol. Pharmacol.* V53, P112.
- 150.Saxena, A., Sun, W., Luo, C., Myers, T.M., Koplovitz, Lenz, D.E., and Doctor, B.P. (2006) *J. Mol. Neurosci.* V30, P145.
- 151.Saxena, A., Luo, C., Chilukuri, N., Maxwell, D.M. and Doctor, B.P. (2007) In: *Chemical Warfare Agents Chemistry, Pharmacology, Toxicology and Therapeutics*, (Romano, J.A., Luckey, B.J. and Salem, H., Eds), CRC Press, Boca Raton, FL, P145.
- 152.Schallreuter, K.U., Gibbons, N.C.J., Elwary, S.M., Parkin, S.M., and Wood, J.M. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V355, P1069.
- 153.Schopfer, L.M., Tieu-Boeck, A., Broomfield, C.A., and Lockridge, O. (2004) *J. Med. Chem. Def.* V2, P1.
- 154.Seibert, C.M., and F.M. Raushel, (2005) *Biochemistry* V44, P6383.
- 155.Shafferman, A., Ordentlich, A., Barak, D., Stein, D., Ariel, N., and Velan, B. (1996) *Biochem. J.* V318, P833.
- 156.Shih, D.M., Gu, L., Xia, Y.R., Navab, M., Lili, W.F., Hama, S., Castellani, L.W., Furlong, C.E., Costa, L.G., Fogelman, A.M., and Lusia, A.J. (1998) *Nature* V394, P284.
- 157.Smolen, A., Eckreson, H.W., Gan, K.N., Hailat, N., and La Du, B.N. (1991) *Drug Metab. Dispos.* V19, P107.
- 158.Sogorb, M.A., Alvarez-Escalante, Carrera, V., and Vilanova, E. (2007) *Arch. Toxicol.* V81, P113.
- 159.Sogorb, M.A., Garcia-Arquelles, S., Carrera, V. and Vilanova, E. (2008) *Chem. Res. Toxicol.* V21, P1524.
- 160.Stevens, R.C., Suzuki, S.M., Cole, T.B., Park, S.S., Richter, R.J., and Furlong, C.E. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V105, P12780.
- 161.Sun, H., Pang, Y.P., Lockridge, O. and Brimjoin, S. (2002) *Mol. Pharmacol.*, V62, P220.
- 162.Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Tokar, L., and Silman, I. (1991) *Science* V253, P872.
- 163.Tahroni, M.H., Carter, W.G., and Ray, D.E. (2007) *Toxicology* V240, P173.
- 164.Tavori, H., Khatib, S., Aviram, M., and Vaya, J. (2008) *Bioorg. Med. Chem.* V16, P7504.
- 165.Taylor, P., Reiner, E., Kovarik, Z., and Radić, Z. (2007) *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* V58, P239.
- 166.Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P., Felgenhauer, N., Zilker, T., and Worek, F. (2007) *Toxicology* V233, P145.
- 167.Vaisar, T., Pennathur, S., Green, P.S., Gharib, S.A., Hoofnagle, A.N., Cheung, M.C., Byun, J., Vuletic, S., Kassim, S., Singh, P., Chea, H., Knopp, R.H., Brunzell, J., Geary, R., Chait, A., Zhao, X.Q., Elkou, K., Marcovina, S., Ridker, P., Oram, J.F., Heinecke, J.W. (2007) *J. Clin. Invest* V117, P746.
- 168.Vayron, P., Renard, P.Y., Tarant, F., Crémion, C., Frobort, Y., Grassi, J., and Mioskowski, C. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* V97, P7058.
- 169.Viragh, C., Akhmetshin, R., and Kovach, I. (1997) *Biochemistry* V36, P8243.
- 170.Wang, Q.D., Sun, M.J., Zhang, H., and Huang, C.F. (1998) *J. Biochem. Mol. Toxicol.* V12, P213.
- 171.Wang, S.H., Zhi, Q.W. and Sun, M.J. (2005) *Arch. Toxicol.* V79, P253.
- 172.Wang, S.H., Zhi, Q.W., and Sun, M.J. (2006) *Toxicol. In Vitro* V20, P71.
- 173.Wang X, Wu N, Guo J, Chu X, Tian J, Yao B, Fan Y. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V365, P453.
- 174.Wang, Y., Boeck, A.T., Duysen, E.G., van Keuren, M., Saunders, T.L., and Lockridge, O. (2004) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* V196, P356.
- 175.Watson, A.D., Berliner, J.A., Hama, S.Y., and La Du, B.N. (1995) *J. Clin. Invest.* V96, P2882.
- 176.Wetherell, J., Price, M., Munford, H., Armstrong, and S. Scott, L. (2007) *Toxicology* V233, P120.
- 177.Wolfe, A.D., Rush, R.S., Doctor, B.P., Koplovitz, I., and Jones, D. (1987) *Fundam. Appl. Toxicol.* V9, P266.
- 178.Wong, K.-Y., and Gao, J. (2007) *Biochemistry* V46, P13352.
- 179.Worek, F., Eyer, P., Aurbek, N., Szinicz, L., and Thiermann, H. (2007) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* V219, P226.
- 180.Xie W., Varkey-Altamirano, C., Bartels, C.F., Speirs, R.J., Cashman, J.R. and Lockridge, O. (1999) *Mol. Pharmacol.*, V55, P83.
- 181.Simo, Y., Butnaro, O., Eisenkraft, A., Shrot, S., Rosman, Y., Dushnitsky, T. and Krivoy, A. (2008) *Crit. Rev. Biotechnol.* V28, P265.
- 182.Yeung, D.T., Josse, D., Nicholson, J.D., Khanal, A., McAndrew, C.W., Bahnson, B.J., Lenz, D.E., and Cerasoli, D.M. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* V1702, P67.
- 183.Yeung, D.T., Smith, J., Sweeney, R., Lenz, D., and Cerasoli, D. (2008) *J. Anal.Toxicol.* V32, 86.
- 184.Zhang, C., Peng, W., Jiang, X., Chen, B., Zhu, J., Zang, Y., Zhang, J., Zhu, T., and Qin, J. (2008) *J. Gene Med.* V10, P94.
- 185.Zheng, F., and Zhang, C.-G. (2008) *Org. Biomol. Chem.* V6, P836.
- 186.Zheng, F., Yang, W., Ko, M.-C., Liu, J., Cho, H., Gao, D., Tong, M., Tai, H.-H., Woods, J.H. and Zhan, C-G. (2008) *J. Am. Chem. Soc.*, V130, P12148.