

MEDLINE.RU, ТОМ 21, КЛИНИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ, 19 МАЯ 2020

**ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СКАВЕНДЖЕРОВ В КАЧЕСТВЕ СРЕДСТВ
АНТИДОТНОЙ ТЕРАПИИ ОСТРЫХ ОТРАВЛЕНИЙ ВЕЩЕСТВАМИ
АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНОГО ДЕЙСТВИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

¹Свентицкая А.М., ¹Орлова А.Б., ¹Субботина С.Н., ¹Иванов И.М.,

¹Никифоров А.С., ²Цепкова Г.А.

¹ *ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт*

военной медицины» Министерства обороны РФ,

195043, г. Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая, д. 4, +7(812)527-77-15, gniiivm_15@mil.ru

² *ФГБВОУВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова»,*

194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6, +7(812)292-32-01,

Резюме. В обзоре рассмотрены подходы к профилактике и лечению отравлений веществам с антихолинэстеразным действием фосфорорганической структуры (ФОС), связанные с применением биомолекул, связывающих или гидролизующих токсикант. Охарактеризован текущий уровень разработок в области создания стехиометрических скавенджеров, из которых наиболее эффективными и изученными являются рекомбинантные формы ацетил- и бутирилхолинэстеразы (АХЭ и БУХЭ). Стехиометрические скавенджеры на основе холинэстераз в опытах на животных характеризуются уровнем эффективных доз около 60 мг/кг, в которых они обеспечивают защиту от отравления ФОС в смертельных дозах. Оценены перспективы ингаляционного применения БУХЭ в качестве средства профилактики ингаляционных отравлений ФОС. Представлены данные по эффективности химических скавенджеров на основе циклодекстринов и каликсаренов, которые отличаются от белковых препаратов высокой стабильностью и доступностью производства.

В работе уделено большое внимание каталитическим и псевдокаталитическим скавенджерам. В качестве наиболее перспективных каталитических систем обоснованы ферменты параоксоназа-1 человека и бактериальная фосфотриэстераза. Приведены данные по эффективности этих средств на моделях отравления животных ФОС, которые указывают на то, что каталитические скавенджеры при в/в введении в диапазоне эффективных доз около 2-5 мг/кг обеспечивают защиту при смертельных отравлениях.

Приведен анализ проблем, связанных с биотехнологической наработкой и медицинским применением белковых и ферментных препаратов, предполагаемых в качестве скавенджеров, а также определены направления для улучшения их медико-тактических и фармацевтических характеристик.

Ключевые слова: ФОС, стехиометрические скавенджеры, каталитические биоскавенджеры, пептиды, экспрессия, рекомбинантные ферменты, молекулярное моделирование, химические модификации.

PROSPECTS FOR THE USE OF SCAVENGERS AS ANTIDOTE THERAPY FOR ACUTE POISONING WITH ANTICHOLINESTERASE SUBSTANCES (LITERATURE REVIEW)

¹Sventitskaya A.M., ¹Orlova A.B., ¹Subbotina S.N., ¹Ivanov I.M.,

¹Nikiforov A.S., ²Tsepkova G.A.

*¹State Scientific-research Test Institute of the Military Medicine,
Russian Federation Defense Ministry, Saint-Petersburg, Russia*

²Kirov`s Military Medical Academy, Saint-Petersburg, Russia

Abstract. The review discusses approaches to the prevention and treatment of organophosphate (OP) poisoning associated with the use of biomolecules that bind or hydrolyze a toxicant. The current level of development in the field of creating stoichiometric scavengers is described, of which the most effective and studied are the recombinant forms of acetyl- and butyryl-cholinesterase (BuChE). Cholinesterase-based stoichiometric scavengers in animals are characterized by a level of effective doses of about 60 mg / kg, in which they provide protection against poisoning of OP in lethal doses. The prospects of the use of BuChE for the prevention of inhalation poisoning of OP are evaluated. The data on the effectiveness of chemical scavengers (based on cyclodextrins and calixarenes) are presented, which have an advantage over proteins in terms of stability and availability of production. The work pays great attention to catalytic and pseudocatalytic scavengers. As the most promising catalytic systems, enzymes human paraoxonase-1 and bacterial phosphotriesterase are justified. The data on the effectiveness of these agents in animal OP poisoning models of are presented, which indicate that catalytic scavengers, given iv in the effective dose range of about 2-5 mg / kg, provide protection for fatal poisoning. A critical analysis of the problems associated with biotechnological developments and the medical use of protein and enzyme preparations, proposed as scavengers, is presented, and directions for improving their medical, tactical and pharmaceutical characteristics are identified.

Key words: stoichiometric scavengers, catalytic bioscavengers, peptides, expression, recombinant enzymes, molecular modeling, chemical modifications

Введение.

Вещества с анихолинестеразным действием фосфорорганической структуры (ФОС) включают в себя как инсектициды и пестициды так и высокотоксичные отравляющие вещества (ОВ) нервно-паралитического действия. Некоторые высокотоксичные ФОС рассматриваются в качестве потенциальных средств химического терроризма. Известны случаи их использования в локальных военных конфликтах и при террористических атаках [1, 2]. Кроме того, ФОС представляют большую опасность при авариях на химических производствах и нештатных ситуациях на объектах по уничтожению химического оружия. При этом существующие схемы антидотной профилактики и терапии отравлений эффективны при отравлениях в дозах не более 2-5ЛД₅₀. Кроме того неантихолинэстеразные эффекты ФОС, развивающиеся не зависимо от купирования холинергических симптомов и не несущие непосредственной угрозы жизни, определяют формирование инвалидизирующих осложнений со стороны центральной (ЦНС) и периферической (ПНС) нервной системы в отдаленном периоде интоксикации [62]. Таким образом, поиск и разработка новых, а также модификация и усовершенствование уже известных средств профилактики и терапии отравлений ФОС на сегодняшний день являются актуальными задачами.

Механизм действия ФОС связан с необратимым ингибированием фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ) с последующим нарушением процесса гидролиза ацетилхолина, увеличением его концентрации в холинергических синапсах периферических тканей и ЦНС и, как следствие, - перевозбуждением холинергических структур. Ингибирование родственного АХЭ фермента бутирилхолинэстеразы (БуХЭ) также может способствовать повышению уровня ацетилхолина в холинергических синапсах. Физиологическим последствием антихолинэстеразного механизма действия ФОС является гиперстимуляция нейромышечных синапсов, нарушение работы дыхательного центра, формирование холинергического криза с нарушением зрения, головной болью, диспноэ, мышечной слабостью или судорогами. При тяжелой степени отравления органофосфатами может наступить гибель вследствие дыхательной недостаточности. Часто интоксикация осложняется вторичным кардиоваскулярным компонентом (гипотензия, замедление ритма или аритмия).

Традиционный подход к антидотной терапии отравлений ФОС базируется на противодействии процессу ингибирования АХЭ и включает в себя трехкомпонентную схему лечения. В качестве средств антидотной терапии используют холинолитики (атропин, бенактизин и пр.) и реактиваторы холинэстеразы (рХЭ) (моно- и биспиридиновые оксимы: 2-РАМ-Cl (пралидоксима хлорид, пиридин-2-альдоксимметила хлорид) в США, метилсульфат 2-РАМ («Contrathion») во Франции, 2-РАМ сульфат в

Великобритании, карбоксим в Российской Федерации совместно с противосудорожными препаратами (бензодиазепины и барбитураты). В профилактических целях применяют обратимые ингибиторы АХЭ (пиридостигмин, аминостигмин, прозерин, физостигмин и пр.).

Известно, что существующие схемы профилактики и антидотной терапии эффективны при отравлениях ФОС в дозах не более 2-5ЛД₅₀. Кроме того важное значение имеют инвалидизирующие осложнения со стороны центральной и периферической нервной системы, развивающиеся в отдаленном периоде интоксикации ФОС и обусловленные их неантихолинэстеразными эффектами [62].

В этой связи одним из приоритетных направлений совершенствования антидотной терапии острых отравлений ФОС является разработка новых ферментных лечебно-профилактических антидотов, защищающих ХЭ от необратимого фосфорилирования. Представления о патогенезе отравления позволяют предположить, что профилактический подход, основанный на снижении концентрации токсиканта в крови путем его нейтрализации за счет иммобилизации или каталитического расщепления до того, как он достигнет физиологических мишеней, может обладать высокой эффективностью. В частности, применение ферментных препаратов способствует инаktivации ФОС и позволяет избежать развития токсического эффекта. В результате исследований, проведенных за рубежом, продемонстрирована возможность получения перспективных биоскавенджеров на основе широкого круга нативных (АХЭ, БуХЭ, карбоксилэстеразы (каЭ), фосфотриэстеразы, ФОС-гидролазы, параоксоназы и пр.) и рекомбинантных ферментов (получаемых при использовании прокариотных и эукариотных экспрессирующих систем, трансгенных животных и растений, а также бесклеточных биосинтетических систем) [3].

Цель исследования. Провести анализ перспектив применения скавенджеров в качестве средств антидотной терапии острых отравлений ФОС.

Материалы и методы. В исследовании выполнен обзор публикаций, посвященных оценке современного уровня разработок соединений, связывающих и гидролизующих токсиканты, а также возможности их использования в качестве лечебно-профилактических средств при отравлении ФОС.

Результаты и их обсуждение.

Целый ряд эндогенных белков и ферментов крови и тканей обеспечивают нейтрализацию ФОС при поступлении токсиканта в низких дозах. В первую очередь ФОС, поступающие в плазму крови, вступают в быструю реакцию с БуХЭ [4]. Содержащийся в большом количестве в плазме и в лимфе альбумин также участвует в детоксикации ФОС,

однако реакция связывания токсиканта происходит медленно [5]. Параоксоназа плазмы (PON-1) способна гидролизовать различные антихолинэстеразные соединения, но взаимодействует в первую очередь с менее токсичными изомерами. Карбоксилэстераза (каЭ), локализованная в барьерных тканях (кожа, легкие, ЖКТ, печень, почки), также способна вступать в реакцию с органофосфатами и снижать их токсичность. В экспериментах на животных было установлено, что каЭ, содержащаяся в плазме, действует как эффективный эндогенный биоскавенджер, однако в плазме человека каЭ отсутствует [6, 7]. Количество других эндогенных скавенджеров слишком незначительно для обеспечения эффективной защиты, особенно при поступлении токсиканта в высоких дозах. Таким образом, на сегодняшний день актуальным направлением исследований является разработка и изучение экзогенных биоскавенджеров. Требования к «идеальному» скавенджеру включают быстрое, необратимое и специфичное связывание ФОС при условии длительного сохранения в системном кровотоке после введения. При этом скавенджеры не должны обладать собственными биологическими эффектами и антигенными свойствами. В качестве дополнительных требований к препаратам, получаемым биотехнологическим путем или выделением из плазмы крови, рассматривают отсутствие контаминации побочными продуктами микробного синтеза и возбудителями гемотрансмиссивных инфекций. ПЭГилирование или включение рекомбинантных ферментов в нано-конструкции может предотвращать или минимизировать иммуногенность и повышать их стабильность и период полувыведения [5, 6, 8].

Существующие в настоящее время биоскавенджеры различаются по механизму инактивации ФОС. Выделяют стехиометрические биоскавенджеры (связывают и секвестрируют токсикант в молярном соотношении 1:1) и каталитические биоскавенджеры (расщепляют органофосфат до биологически инертных продуктов). Применение методов генной инженерии, в частности точечные мутации аминокислот в области связывания, позволяют на основе эндогенных ферментов разрабатывать псевдокаталитические скавенджеры (системы фермент+реактиватор) варьируя их связывающую и каталитическую способности, а также устойчивость к старению (рисунок 1).

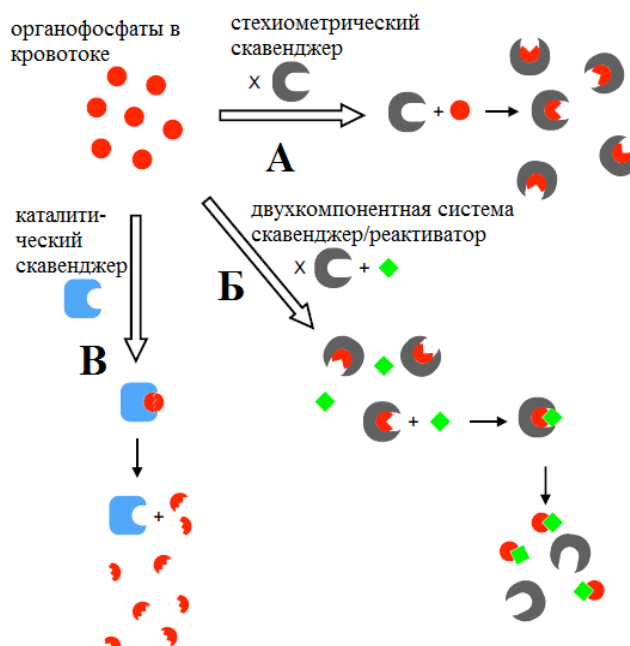


Рисунок 1 - Биоскавенджеры с различными механизмами действия.
А. Стехиометрический скавенджер. **Б.** Псевдокаталитический скавенджер **В.** Каталитический скавенджер

Стехиометрические скавенджеры. К стехиометрическим скавенджерам относят эндогенные белки и специфические антитела против гаптен ФОС. Молекулы этих белков необратимо (в молярном соотношении 1:1) связывают органофосфаты в крови, предотвращая их поступление в периферические органы и ЦНС. Каждая молекула такого скавенджера способна связывать одну-две молекулы токсиканта. Следовательно, степень эффективности стехиометрических скавенджеров прямо пропорциональна концентрации свободного скавенджера в крови в момент поступления ФОС. Учитывая небольшие размеры молекул ФОС в сравнении с белками, соотношение массовых концентраций белкового скавенджера и органофосфата может быть значительным и составлять до 500:1. Очевидно, что для защиты от ФОС в летальных дозах требуется поддержание высокой концентрации скавенджера в крови.

Наиболее изученными стехиометрическими скавенджерами являются АХЭ и БуХЭ. АХЭ является эффективным биоскавенджером первого поколения. АХЭ стереоизбирательна к хиральным органофосфатам, особенно к V-агентам, что обеспечивает эффективную защиту от отравления Vx. АХЭ человека вступает в реакцию с самым токсичным стереоизомером зомана в 4 раза быстрее, чем БуХЭ плазмы [9]. Показано, что увеличение уровня экспрессии АХЭ при введении гена мышам на аденовирусном векторе защищает животных, нокаутных по гену АХЭ, от воздействия диизопропилфторфосфата в токсических дозах [10].

Фермент АХЭ по сравнению с БуХЭ менее устойчив в кровотоке из-за низкого уровня его сиапирования (который определяется его ролью как мембран-связанного, а не секретируемого фермента), в связи с чем исследуются подходы к пролонгированию его фармакокинетики. Один из подходов связан с формированием инженерных частиц на основе биополимерного ядра, окруженного мембранами эритроцитов. Применение таких частиц, обладающих высокой стабильностью в кровотоке, обеспечивало выживание мышей после отравления дихлофосом в смертельных дозах [11].

БуХЭ человека – сериновая эстераза, состоящая из 4-х идентичных субъединиц (молекулярный вес одной субъединицы – 85 кДа), которые содержат 574 аминокислотных остатка, соединенных между собой нековалентными связями, и 36 углеводных цепей, составляющих 23,9 % от общего веса [12]. Первоначально БуХЭ человека получали из просроченной плазмы [5]. Такой тетрамерный фермент не обладал иммуногенностью и был стабилен в кровотоке больше недели [6]. Однако из-за ограниченной доступности просроченной плазмы были проведены исследования для получения возможности недорогого масштабного производства рекомбинантной БуХЭ человека. Экспрессию фермента успешно проводили в различных эукариотических системах: клетки яичников китайского хомячка (СНО), молоко трансгенных коз и кроликов, гусеницы тутового шелкопряда, растения и дрожжи [13]. На сегодняшний день не удалось провести эффективную экспрессию БуХЭ человека в бактериальных клетках, однако с применением методов компьютерного моделирования предложены мутантные варианты фермента, стабильно и эффективно экспрессирующиеся в *E. coli* [14].

Рекомбинантная БуХЭ уступает эндогенной по длительности циркуляции в крови, что связывают с особенностями гликозилирования в бактериальных экспрессирующих системах [61]. В этой связи исследованы различные подходы к повышению периода полувыведения рекомбинантной БуХЭ человека, к числу наиболее эффективных относят такие модификации, как соединение фермента с альбумином, пегилирование и полисиапирование, а также формирование катионных кополимерных комплексов [15]

Несмотря на значительный прогресс, биотехнологическое получение БуХЭ остаётся дорогостоящим и ресурсоемким, в частности ввиду высоких требований к качеству конечного продукта, введение которого в организм предполагается парентеральным путем [12]. В этой связи привлекательной альтернативой биотехнологической наработке может стать повышение уровня БуХЭ в крови за счет ее генной доставки с дальнейшим образованием в организме функциональной БуХЭ *in vivo*.

Возможность практической реализации генно-терапевтического подхода к доставке БуХЭ была подтверждена экспериментально. Установлено, что экспрессия гена БуХЭ на

аденоассоциированном вирусном векторе обеспечивает защиту мышей, отравленных VX в дозе 5 ЛД₅₀. Сопоставимые результаты были получены при отравлении мышей эхотиофатом в дозе 30 ЛД₅₀ [16]. Аденоассоциированные вирусные векторы начали проходить клинические исследования; их применение для экспрессии в организме БуХЭ человека будет способствовать включению генной терапии в арсенал средств медицинской защиты при отравлении органофосфатами [17].

Эффективность профилактического парентерального введения БуХЭ при отравлении органофосфатами продемонстрирована в целом ряде доклинических исследований на грызунах и приматах, в ходе которых показано длительное (до нескольких суток) сохранение защитного эффекта экзогенного скавенджера [13, 18, 19]. Парентеральное введение обеспечивает высокую концентрацию БуХЭ в крови в течение длительного периода, что необходимо для быстрой и эффективной детоксикации органофосфатов. Индексы защиты от отравления ФОС, достигнутые при профилактическом парентеральном применении БуХЭ у лабораторных животных, составили до 5-8 в зависимости от поражающего агента. Например, исследования на морских свинках показали, что внутримышечное и внутрибрюшинное применение БуХЭ в дозе 60 мг/кг может защищать от интоксикации 5,5 ЛД₅₀ зомана и 8 ЛД₅₀ VX [20]. Расчетными методами было установлено, что введение 200 мг БуХЭ человеку весом 70 кг защищает от отравления зоманом в дозе 2 ЛД₅₀ [21].

Следует отметить, что парентеральное (внутривенное или внутримышечное) введение экзогенной БуХЭ человеку в качестве средства профилактики отравления ФОС (например, при ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций, связанных с авариями на химическом производстве) сопряжено с определенными затруднениями. Внутривенное введение, несмотря на быстрое повышение уровня биоскавенджера в крови, сложно применять в условиях вне медицинского учреждения. Формы для внутримышечного введения фермента (например, автоинъекторы, шприц-тюбики) в настоящее время не разработаны.

Для преодоления этой проблемы был предложен альтернативный подход по созданию так называемого «биозащитного экрана БуХЭ в легких», т.е. по ингаляционному введению БуХЭ человека в легкие в количестве, достаточном для связывания молекул органофосфатов *in situ* при их аэрозольном поступлении в организм [22]. Такой подход позволяет предотвратить (или замедлить) поступление органофосфатов в системный кровоток, и, следовательно, защитить АХЭ в нервной и мышечной тканях (как критических систем для действия ФОС).

К числу преимуществ ингаляционного введения БуХЭ относятся:

- 1) путь поступления органофосфатов в организм, как правило, ингаляционный;
- 2) из-за своего большого размера молекулы БуХЭ при ингаляционном введении не могут проникнуть через гистогематический барьер и остаются в легких;
- 3) аэрозольное введение биоскавенджера в легкие позволяет сформировать высокие терапевтические концентрации, которые длительное время поддерживаются там за счет отсутствия системного метаболизма;
- 4) необходимый уровень БуХЭ в легких легко поддерживать за счет повторной ингаляции;
- 5) возможность самостоятельного применения, отсутствие необходимости привлечения медицинского персонала для введения;
- 6) потенциально биоскавенджер в ингаляционной форме может быть применен в качестве лечебного средства.

Возможность ингаляционного введения фармакологических средств технически может быть реализована в различных типах ингаляторов, таких как небулайзеры водного аэрозоля, дозированные аэрозольные баллончики, ингаляторы сухого порошка. Большая молярная масса БуХЭ определяет относительно высокие значения эффективных доз препарата, в связи с чем для эффективной доставки скавенджера целесообразно использование ингаляторов жидкого аэрозоля, среди которых для ферментных биопрепаратов наиболее оптимальными являются небулайзеры с вибрирующей сеткой (mesh-небулайзеры) [22]. Подобные устройства находят применение в доклинических исследованиях БуХЭ на средних и крупных животных. В опытах на мелких и средних лабораторных животных для доставки БуХЭ в легкие, как правило, применяют интратрахеальную инстилляцию жидкого аэрозоля.

Например, в опытах на макаках при изучении выраженности и продолжительности защитного эффекта рекомбинантной БуХЭ человека фермент вводили при помощи mesh-небулайзера в дозе 8,5-9 мг/кг в различные сроки до ингаляционного применения параоксона в летальной дозе [23]. Отмечали сохранение защитного действия БуХЭ в течение не менее 3-х суток, которое выражалось в предотвращении ингибирования собственной АХЭ эритроцитов параоксоном. При оценке содержания цитокинов в бронхоальвеолярном лаваже макак после введения экзогенной БуХЭ не отмечали каких-либо воспалительных изменений или иммунных реакций.

Таким образом, ингаляционное профилактическое применение БуХЭ является потенциально эффективным методом профилактики ингаляционных отравлений ФОС.

Среди стехиометрических скавенджеров отдельного внимания заслуживают химические соединения относительно простой структуры [24], в частности

циклодекстрины и их производные [25, 26]. Особенностью строения циклодекстринов является сочетание гидроксильных групп и гидрофобной полости, которая позволяет образовывать комплексы включения с подходящими по размеру токсикантами из различных химических групп и изменять кинетику их спонтанного гидролиза и гидролиза в присутствии дегазирующих рецептур (например, с сочетанием с раствором 2-аминоэтанола [30]).

Наибольший интерес представляет оценка возможности циклодекстринов катализировать гидролиз ФОС в физиологических условиях. В ранних исследованиях было выявлено формирование комплекса β -циклодекстрина с зоманом в соотношении 1:1 и выраженное влияние скавенджера на скорость гидролиза токсиканта, в отличие от зарина и табуна. Отмечали, что при физиологических значениях pH скорость гидролиза токсиканта в присутствии моноаниона β -циклодекстрина увеличивалась более чем на два порядка [28]. В то же время результаты более поздних работ, выполненных с использованием S- и R-изомеров ФОС, указывали на увеличение скорости спонтанного гидролиза S-изомеров зомана, зарина и циклозарина в присутствии β -циклодекстрина в 2-3 раза, а R-изомеров в 100-1000 раз [27].

Было установлено, что каталитический гидролиз ФОС, образовавших комплекс с циклодекстринами, происходит при участии вторичных гидроксильных групп или соответствующих алкоксидных ионов [27].

В настоящее время активно исследуют модификации молекулы циклодекстринов, направленные на повышение их способности к гидролизу ФОС. Предложены гетеробифункциональные производные β -циклодекстрина с йодозобензоатной и имидазольной группой, исследования которых позволили прийти к выводам, что для оптимизации гидролиза ФОС необходимо учитывать следующее [29]:

- кинетика деградации ФОС определяется их аффинностью к полости циклодекстрина;
- α -нуклеофильные группы должны быть ковалентно связаны с макроциклом для повышения гидролитической активности скавенджера;
- эффективность гидролиза ФОС, содержащих в структуре фенильную группу, определяется длиной линкера между йодобензоатной группой и метилированным олигосахаридом в составе макроцикла;
- в случае гидролиза зомана наибольший эффект достигается при введении в молекулу циклодекстрина двух заместителей (имидазольный и 2-йодобензоатный радикалы), причем последний должен быть непосредственно присоединен к макроциклу.

Наиболее активные из гетеробифункциональных производных β -циклодекстрина обеспечивали гидролиз зарина и циклозарина в течение 1-5 мин при физиологических условиях, в то же время они мало активны в отношении табуна и не активны против VX [31]. Несмотря на успешное использование циклодекстринов в качестве детоксикантов некоторых ФОС, нервно-паралитические вещества V-серии являются непригодным субстратом для циклодекстринов из-за их протонированных аминогрупп боковой цепи и, следовательно, полярной природы при физиологических значениях pH. Вероятно, в этом случае более перспективными связывающими агентами могут быть синтетические скавенджеры - функционализированные сульфonatoкаликс[4]арены, которые способны инактивировать VX с периодом полураспада до 3 минут в водном буфере при 37°C и pH 7,4 [32].

Полученные данные по изменению кинетики гидролиза ФОС в физиологических условиях позволяют рассматривать функционализированные циклодекстрины и другие объекты супрамолекулярной химии в качестве потенциальных связывающих агентов при отравлении. В то же время существенным недостатком таких каталитических систем является их специфичность к определенным химическим структурам и вариабельность активности в ряду ФОС.

Несмотря на доказанную в опытах на животных эффективность, основным недостатком стехиометрических скавенджеров (в особенности, белковой природы) являются высокие значения эффективных доз, обусловленные природой стехиометрического взаимодействия (1:1) и большими размерами белков. Необходимость введения их в высоких дозах порождает как технические неудобства (невозможность размещения в шприц-тюбике), так и экономические затруднения (высокая стоимость биотехнологических препаратов). Активно проводимые за рубежом исследования направлены на поиск способов снижения эффективных доз ферментов. Основные подходы решения проблемы заключаются в:

- создании двухкомпонентных псевдокаталитических скавенджеров (холинэстераза+реактиватор), в том числе с использованием генно-модифицированных холинэстераз, менее подверженных старению [33];

- создании каталитических систем на основе генно-модифицированных ферментов [25];

- создании низкомолекулярных биоскавенджеров с ферментативной активностью. Например, предложены некоторые серин- и тирозинсодержащие гексапептиды, гидролизующие флуоресцентный аналог зарина [34].

Двухкомпонентные каталитические системы «биоскавенджер/реактиватор» (псевдокаталитические скавенджеры). Понизить эффективную дозу скавенджера можно при профилактическом или лечебном введении реактиватора холинэстеразы, которые по химической структуре относятся к группе оксимов. Применение оксима способствует пролонгированной реактивации биоскавенджера *in vivo* и в результате стехиометрический скавенджер превращается в псевдокаталитический.

Ферменты, фосфорилированные органофосфатами, могут проявлять свойства каталитических биоскавенджеров в присутствии реактиватора, который способен быстро высвободить ковалентно связанный органофосфат из комплекса со стехиометрическим скавенджером. Основным фактором, ограничивающим эффективность этой двухкомпонентной каталитической системы «биоскавенджер/реактиватор», является скорость реактивации. Скорость реактивации должна быть выше, чем конкурирующая реакция старения. Таким образом, комбинация стехиометрического биоскавенджера на основе холинэстеразы и оксимов может действовать как каталитическая система.

В работах [33, 35] изучали эффективность мутантной АХЭ (Y337A/F338A), которая не подвержена старению и обеспечивает более легкий доступ оксимов к фосфорилированному активному сайту. Было установлено, что при реактивации мутанта Y337A/F338A оксимом HI-6 образуется новый оксим имидазолия с более высокой скоростью инактивации токсиканта, чем у немутантного типа АХЭ. Это обеспечивало более надежную защиту организма от воздействия зомана и VX.

К реактивации способны и сериновые гидролазы (СаЕ-1 человека), но наибольший интерес вызывает изучение двухкомпонентных каталитических систем, содержащих БуХЭ человека [36]. У наиболее известных реактиваторов БуХЭ - пиридиниевых оксимов слишком низкая скорость реактивации, что обуславливает поиск специфических эффективных реактиваторов БуХЭ. В настоящее время появились новые классы реактиваторов БуХЭ: четырехкомпонентные бензальдоксими, имидазольные и гидроксипиридиновые альдоксими [13]. Для успешного применения псевдокаталитического биоскавенджера *in vivo*, помимо быстрой реакции реактивации, необходимо длительное поддержание высокой концентрации оксима в плазме крови за счет особенностей его метаболизма, либо за счет его повторного введения.

Каталитические биоскавенджеры. Принцип действия каталитических биоскавенджеров основан на идее непрерывного захвата и гидролиза ФОС в кровотоке еще до того момента, как он достигнет своих мишеней в критических органах и тканях. Биоскавенджеры разрушают органофосфаты с превращением их в нетоксичные продукты, сами при этом в результате каталитического акта остаются неизменными. Примерами

потенциальных каталитических биоскавенджеров могут служить такие ферменты, как оксидазы, лакказы, глутатионовые трансферазы, которые разрушают алкильные цепи органофосфатов, снижая таким образом их токсичность. В связи с каталитической природой реакции каждая молекула биоскавенджера способна разрушать несколько молекул ФОС. Таким образом, при введении каталитического биоскавенджера следует ожидать более высокие показатели защиты при отравлении ФОС, чем у стехиометрического скавенджера в эквимольной дозе.

Однако, ферменты с высокой эффективностью могут легко гидролизировать связь фосфора с замещающей группой (связь Р-Х), высвобождая ее, и, тем самым, усиливая токсическое действие органофосфата. Также следует отметить, что каталитические биоскавенджеры обладают узкой селективностью, поэтому в настоящее время не существует универсального скавенджера, способного гидролизовать любой органофосфат с высокой скоростью. Указанные обстоятельства позволяют предположить, что для придания рецептуре каталитического биоскавенджера широкого спектра действия в отношении структурно различных ФОС, в ее состав биоскавенджера должно входить несколько ферментов.

Немаловажным вопросом является биологическая стабильность вводимых скавенджеров, поддержание которой осуществляется либо за счет пролонгирования фармакокинетики фермента и/либо за счет увеличения частоты инъекций. В качестве одного из подходов к улучшению фармакокинетики экзогенной БУХЭ можно указать конъюганци с альбумином, что в опытах на свиньях позволило увеличить период полувыведения конъюгированного фермента до 32 ч вместо 3 ч для неконъюгированного [37].

К ферментам человека, играющим ключевую роль в гидролизе алкильных связей органофосфатов, относится кальций-зависимый гликопротеин печени – параоксоназа 1 (PON-1). Способность фермента к обезвреживанию ФОС напрямую связана с его активностью и концентрацией в сыворотке крови [38]. Показано, что присутствие PON-1 в крови обеспечивает защиту от воздействия широкого ряда токсикантов. Несмотря на то, что PON-1 гидролизует преимущественно менее токсичные оптические изомеры зомана, профилактическое введение фермента морским свинкам защищало их от 1,2 ЛД₅₀ рацемического зарина и зомана [39]. Генная модификация PON-1 привела к получению фермента, гидролизующего наиболее токсичные оптические изомеры циклозарина и другие G-агенты [25, 40]. Однако до сих пор не создан мутантный вариант PON-1, способный гидролизировать V-агенты с высокой скоростью, что препятствует разработке на ее основе биоскавенджера с широким спектром действия. Помимо биотехнологической

наработки источником PON-1 может быть плазма крови, однако особенности четвертичной структуры фермента (формирование стабильных комплексов с липопотеинами высокой плотности) существенно затрудняет его выделение и очистку [41]. Предложены способы лабораторной наработки рекомбинантной PON-1 человека и некоторых ее мутантных форм в экспрессионной системе *E.coli*, которые позволили получить функциональный фермент, демонстрирующий защиту эффективность на моделях отравления ФОС *in vitro* [42, 43]. Существенной проблемой, ограничивающей разработки скавенджеров на основе PON-1, является отсутствие экспрессирующей системы для ее наработки в линии клеток млекопитающих. Фермент, полученный в бактериальных системах, характеризуется малой стабильностью в кровотоке из-за особенностей синалирования белков в бактериальных клетках. Инкапсуляция очищенного PON-1 в липосомы стабилизирует фермент и повышает время его циркулирования в крови [44].

По аналогии БуХЭ для решения технологических вопросов производства, стабилизации и фармакокинетики рекомбинантного PON-1 были изучены подходы к генной доставке фермента. В опытах на мышах показана возможность повышение уровня экспрессии PON-1 в 5-80 раз после введения гена PON-1 на аденовирусном векторе, что обеспечивало защиту животных от отравления диазоксоном в дозах до 4 ЛД₅₀ [45].

Показано, что в инактивации ФОС наряду с PON-1 участвуют такие гидралазы, как ангидролаза органофосфорной кислоты и пролидазы. Пролидаза проявляет высокую каталитическую активность против зомана ($k_{cat}=3100\text{ с}^{-1}$), но не активна против Vx. Человеческая пролидаза была клонирована и экспрессирована в *Sacharromyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*. Предприняты попытки направленного мутагенеза структуры фермента с целью увеличения его каталитической активности и расширению спектра его действия [46]. Данный фермент рассматривается в качестве одного из наиболее перспективных средств профилактики и лечения отравления ФОС [34]. Новые варианты гидролаз обнаружены в бактериях, обитающих в термальных источниках. Главное преимущество этих ферментов в их высокой термической устойчивости, которая делает возможным их применение в полевых условиях [26, 53, 54, 55, 56].

Фосфотриэстеразы (PTE) также являются потенциальными каталитическими биоскавенджерами. Некоторые бактериальные PTE, в частности PTE *Brevundimonas* (*Pseudomonas*) *diminuta* (Br. dim.), активно исследуют в течение 25 лет [47, 48]. Новые разработанные мутантные формы PTE проявляют высокую каталитическую активность по отношению к наиболее токсичным оптическим изомерам V и G-агентов [49, 50]. Исследования *in vitro* и на животных показывают, что мутантные ферменты эффективны

как при профилактическом, так и при лечебном применении. При этом фермент при внутривенном введении в диапазоне эффективных доз около 2-5 мг/кг обеспечивал защиту животных при отравлении Vx в дозах до 2ЛД₅₀ [25, 51, 52].

Мутантные РТЕ рассматриваются в первую очередь в качестве средств для наружного применения для деконтаминации кожных покровов. Важным аспектом применения бактериальных ферментов в качестве каталитических биоскавенджеров, предназначенных для парентерального введения, является их потенциальная иммуногенность. Для преодоления этих недостатков рассматриваются подходы к инкапсулированию в липосомы, ПЭГилирование и другие химические модификации, которые предотвращают развитие иммунного ответа и повышают стабильность и продолжительность циркуляции каталитических биоскавенджеров в плазме крови [57, 58, 59].

Помимо ферментных препаратов ведется изучение каталитических свойств других систем, например, моноклональных каталитических антител, способных гидролизировать органофосфаты. Однако уровень зрелости этой технологии еще недостаточен для практического медицинского применения [60].

Заключение.

Разработка новых ферментных лечебно-профилактических антидотов при отравлении ФОС продолжает оставаться актуальной задачей. Перспективными с точки зрения биофармацевтического применения являются, главным образом, рекомбинантные ферменты. Эти ферменты могут быть получены в прокариотических и эукариотических системах экспрессии, в трансгенных животных и растениях, а также в бесклеточных биосинтетических системах. На сегодняшний день получены значимые результаты по улучшению термодинамической и функциональной стабильности *in vivo*, иммунологической толерантности и биодоступности биоскавенджеров. Молекулярное моделирование, подходы с использованием направленного мутагенеза в комбинации с химической модификацией успешно используются для усиления каталитической активности скавенджеров и улучшения их фармакокинетики. Многое сделано в области разработки и оптимизации способов эффективной доставки больших молекул ферментов. Инкапсулирование, доставка в наноконтейнерах, различные векторы генной доставки доказывают возможность практической реализации генно-терапевтического подхода. Активно развивается направление, связанное с созданием лекарственных форм для ингаляционного введения ферментов на примере БуХЭ. Определенные перспективы

связывают с применением синтетических пептидов. Их использование в качестве низкомолекулярных скавенджеров могло бы стать экономичной альтернативой стехиометрическим скавенджерам на основе ферментов. Стехиометрические и каталитические скавенджеры обеспечивают защиту животных от отравления ФОС в летальных дозах, что позволяет рассматривать эти соединения в качестве перспективных средств для практического медицинского применения.

Литература

1. John H., van der Schans M. J., Koller M., Spruit H.E. T., Worek F., Thiermann H., Noort D. Fatal sarin poisoning in Syria 2013: forensic verification within an international laboratory network // *Forensic toxicology*. 2017. Vol. 36. №1. P. 61–71. doi: 10.1007/s11419-017-0376-7.
2. Tu A.T. Aum Shinrikyo's Chemical and Biological Weapons: More Than Sarin // *Forensic. Sci. Rev.* 2014. Vol. 26, №2. P. 115-120.
3. Концептуальные подходы к развитию системы антидотного обеспечения Российской Федерации / под ред. Уйба В.В., Назарова В.Б., Гладких В.Д. М.: ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА России. 2013. С. 155-156.
4. Lockridge O., Norgren R.B., Johnson R.C., Blake T.A. Naturally occurring genetic variants of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and their potential impact on the risk of toxicity from cholinesterase inhibitors // *Chem. Res. Toxicol.* 2016. Vol. 29, №9. P. 1381–1392. doi: 10.1021/acs.chemrestox.6b00228.
5. Rosenberg Y.J., Saxena A., Sun W., Jiang X., Chilukuri N., Luo C., Doctor B.P., Lee K.D. Demonstration of in vivo stability and lack of immunogenicity of a polyethyleneglycolconjugated recombinant CHO-derived butyrylcholinesterase bioscavenger using a homologous macaque model // *Chem. Biol. Interact.* 2010. Vol. 187, №1-3. P. 279–286. doi: 10.1016/j.cbi.2010.02.042.
6. Genovese R.F., Sun W., Johnson C.C., Ditargiani R.C., Doctor B.P., Saxena A. Safety of administration of human butyrylcholinesterase and its conjugates with soman or VX in rats // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2010. Vol. 106, №5. P. 428–434. doi: 10.1111/j.1742-7843.2009.00508.x.
7. Maxwell D.M., Brecht K.M. Carboxylesterase: specificity and spontaneous reactivation of an endogenous scavenger for organophosphorus compounds // *J. Appl. Toxicol.* 2001. Vol. 21. P. 103–107. doi: 10.1002/jat.833.
8. Tsai P.C., Bigley A., Li Y., Ghanem E., Cadieux C.L., Kasten S.A., Reeves T.E., Cerasoli D.M., Raushel F.M. Stereoselective hydrolysis of organophosphate nerve agents by the

bacterial phosphotriesterase // *Biochemistry*. 2010. Vol. 49, №37. P. 7978–7987. doi: 10.1021/bi101056m.

9. Ordentlich A., Barak D., Kronman C., Benschop H.P., De Jong L.P., Ariel N., Barak R., Segall Y., Velan B., Shafferman A. Exploring the active center of human acetylcholinesterase with stereoisomers of an organophosphorus inhibitor with two chiral centers // *Biochemistry*. 1999. Vol. 38, №10. P. 3055–3066. doi.org/10.1021/bi982261f.

10. Li B., Duysen E.G., Poluektova L.Y., Murrin L.C., Lockridge O. Protection from the toxicity of diisopropylfluorophosphate by adeno-associated virus expressing acetylcholinesterase // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006. Vol. 214, №2. P. 152–165. doi: 10.1016/j.taap.2005.12.008.

11. Pang Z., Hu C.M., Fang R.H. [et al] Detoxification of Organophosphate Poisoning Using Nanoparticle Bioscavengers. // *ACS Nano*. 2015 Vol. 9, № 6 P.6450-6458. doi: 10.1021/acsnano.5b02132.

12. Lockridge O., David E., Schopfer L.M., Masson P., Brazzolotto X., Nachon F. Purification of recombinant human butyrylcholinesterase on Hupresin® // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2018. №1102-1103. P. 109-115. doi: 10.1016/j.jchromb.2018.10.026.

13. Masson P., Nachon F. Cholinesterase reactivators and bioscavengers for pre- and post-exposure treatments of organophosphorus poisoning // *J Neurochem*. 2017. Vol. 142, №2. P. 26-40. doi: 10.1111/jnc.14026.

14. Goldenzweig A., Goldsmith M., Hill S.E., Gertman O., Laurino P., Ashani Y., Dym O., Unger T., Albeck S., Prilusky J., Lieberman R.L., Aharoni A., Silman I., Sussman J.L., Tawfik D.S., Fleishman S.J. Automated structure- and sequence-based design of proteins for high bacterial expression and stability // *Mol. Cell*. 2016. Vol. 63, №2. P. 337–346. doi: 10.1016/j.molcel.2016.06.012.

15. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Bobik T.V., Ilyushin D.G., Murashev A.N., Dyachenko I.A., Palikov V.A., Knorre V.D., Belogurov A.A., Ponomarenko N.A., Kuzina E.S., Genkin D.D., Masson P., Gabibov A.G. Chemical polysialylation and in vivo tetramerization improve pharmacokinetic characteristics of recombinant human butyrylcholinesterase-based bioscavengers // *Acta Naturae*. 2015. Vol.7, №4. P. 136–141. doi: 10.32607/20758251-2015-7-4-136-141.

16. Parikh K., Duysen E.G., Snow B., Jensen N.S., Manne V., Lockridge O., Chilukuri N. Gene-delivered butyrylcholinesterase is prophylactic against the toxicity of chemical warfare nerve agents and organophosphorus compounds // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011. Vol. 337, №1. P. 92–101. doi: 10.1124/jpet.110.175646.

17. Tretiakova A. Engineering AAV vector for the delivery of human bChE to protect against exposure to organophosphates // 20th Biennial USA Medical Defense Bioscience Review. 2016. P. 87.
18. Rosenberg Y.J., Adams R.J., Hernandez-Abanto S., Jiang X., Sun W., Mao L., Lee K.D. Pharmacokinetics and immunogenicity of a recombinant human butyrylcholinesterase bioscavenger in macaques following intravenous and pulmonary delivery // Chem. Biol. Interact. 2015. №242. P. 219–226. doi: 10.1016/j.cbi.2015.09.021
19. Myers T.M. Human plasma-derived butyrylcholinesterase is behaviorally safe and effective in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) challenged
20. Saxena A., Sun W., Fedorko J.M., Koplovitz I., Doctor B.P. Prophylaxis with human serum butyrylcholinesterase protects guinea pigs exposed to multiple lethal doses of soman or VX // Biochem. Pharmacol. 2011. Vol. 81, №1. P. 164–169. doi: 10.1016/j.bcp.2010.09.007.
21. Ashani Y., Pistinner S. Estimation of the upper limit of human butyrylcholinesterase dose required for protection against organophosphates toxicity: a mathematically based toxicokinetic model // Toxicol. Sci. 2004. Vol. 77, №2. P. 358–367. doi: 10.1093/toxsci/kfh012.
22. Rosenberg Y.J., James B. Creation of a protective pulmonary bioshield against inhaled organophosphates using an aerosolized bioscavenger // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2016. Vol. 1374, №1. P. 151–158. doi: 10.1111/nyas.13106.
23. Rosenberg Y.J., Laube B., Mao L., Jiang X., Hernandez-Abanto S., Lee K.D., Adams R. Pulmonary delivery of an aerosolized recombinant butyrylcholinesterase pretreatment protects against aerosolized paraoxon in macaques // Chem. Biol. Interact. 2013. Vol. 203, №1. P. 167–171. doi: 10.1016/j.cbi.2012.11.004.
24. Amitai G., Gez R., Raveh L., Bar-Ner N., Grauer E., Chapman S. Novel bifunctional hybrid small molecule scavengers for mitigating nerve agents toxicity // Chem. Biol. Interact. 2016. Vol. 259. P. 187–204. doi: 10.1016/j.cbi.2016.04.036.
25. Ashani Y., Leader H., Aggarwal N., Silman I., Worek F., Sussman J.L., Goldsmith M. In vitro evaluation of the catalytic activity of paraoxonases and phosphotriesterases predicts the enzyme circulatory levels required for in vivo protection against organophosphate intoxications // Chem. Biol. Interact. 2016. №259. P. 252–256. doi: 10.1016/j.cbi.2016.04.039.
26. Jacquet P., Daudé D., Bzdrenga J., Masson P., Elias M., Chabrière E. Current and emerging strategies for organophosphate decontamination: special focus on hyperstable enzymes

// Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2016. Vol. 23, №9. P. 8200–8218. doi: 10.1007/s11356-016-6143-1.

27. Letort S., Balieu S., Erb W., Gouhier G., Estour F. Interactions of cyclodextrins and their derivatives with toxic organophosphorus compounds // Beilstein J. Org. Chem. 2016. №12. P. 204–228. doi: 10.3762/bjoc.12.23.

28. Desire B., Saint-Andre S. Interaction of soman with beta-cyclodextrin // Fundam Appl Toxicol. 1986. Vol. 7, №4. P. 646-657. doi.org/10.1016/0272-0590(86)90114-4.

29. Letort S., Mathiron D, Grel T, Albaret C, Daulon S, Djedaïni-Pilard F, Gouhier G, Estour F. The first 2(IB),3(IA)-heterodifunctionalized β -cyclodextrin derivatives as artificial enzymes // Chem Commun (Camb). 2015. Vol. 51, №13. P. 2601-2604. doi: 10.1039/c4cc09189b.

30. Cabal J., Kuca K., Sevelova-Bartosova L., Dohnal V. Cyclodextrines as functional agents for decontamination of the skin contaminated by nerve agents // Acta Medica (Hradec Kralove). 2004. Vol. 47, № 2. P. 115-118. doi: 10.14712/18059694.2018.75

31. Wille T., Tenberken O., Reiter G., Müller S., Le Provost R., Lafont O., Estour F., Thiermann H., Worek F. Detoxification of nerve agents by a substituted beta-cyclodextrin: application of a modified biological assay // Toxicology. 2009. Vol. 265, № 3. P. 96 -100. doi: 10.1016/j.tox.2009.09.018.

32. Schneider C., Bierwisch A., Koller M., Worek F., Kubik S. Detoxification of VX and Other V-Type Nerve Agents in Water at 37 °C and pH 7.4 by Substituted Sulfonatocalix[4]arenes // Angew Chem Int Ed Engl. 2016. Vol. 55, № 41. P. 12668-12672. doi: 10.1002/anie.201606881.

33. Maček Hrvat N., Žunec S., Taylor P., Radić Z., Kovarik Z. HI-6 assisted catalytic scavenging of VX by acetylcholinesterase choline binding site mutants // Chem. Biol. Interact. 2016. №259. P. 148–153. doi: 10.1016/j.cbi.2016.04.023.

34. Masson P., Rochu D. Catalytic bioscavengers against toxic esters, an alternative approach for prophylaxis and treatments of poisonings // Acta Naturae. 2009. Vol. 1, №1. P. 68-79. doi: 10.32607/20758251-2009-1-1-68-78.

35. Kovarik Z., Maček Hrvat N., Katalinić M., Sit R.K., Paradyse A., Žunec S., Musilek K., Fokin V.V., Taylor P., Radić Z. Catalytic soman scavenging by the Y337A/F338A acetylcholinesterase mutant assisted with novel site-directed aldoximes // Chem. Res. Toxicol. 2015. Vol. 28, №5. P. 1036–1044. doi: 10.1021/acs.chemrestox.5b00060.

36. Hatfield M.J., Umans R.A., Hyatt J.L., Edwards C.C., Wierdl M., Tsurkan L., Taylor M.R., Potter P.M. Carboxylesterases: general detoxifying enzymes // Chem. Biol. Interact. 2016. №259. P. 327–331. doi: 10.1016/j.cbi.2016.02.011.

37. Huang Y.J., Lundy P.M., Lazaris A., Huang Y., Baldassarre H., Wang B., Turcotte C., Côté M., Bellemare A., Bilodeau A.S., Brouillard S., Touati M., Herskovits P., Bégin I., Neveu N., Brochu E., Pierson J., Hockley D.K., Cerasoli D.M., Lenz D.E., Wilgus H., Karatzas C.N., Langermann S. Substantially improved pharmacokinetics of recombinant human butyrylcholinesterase by fusion to human serum albumin // *BMC Biotechnol.* 2008. №8. P. 50. doi: 10.1186/1472-6750-8-50.
38. Разгильдина Н.Д., Мирошникова В.В., Фомичев А.В., Малышева Е.В., Пантелеева А.А., Пчелина С.Н. Исследование активности параоксоназы 1 у работников предприятий, длительно контактирующих с фосфорорганическими соединениями // *Экологическая генетика.* 2017. Т.15, №1. С. 57-63. doi: 10.17816/ecogen15157-63.
39. Valiyaveetil M., Alamneh Y., Rezk P., Biggemann L., Perkins M.W., Sciuto A.M., Doctor B.P., Nambiar M.P. Protective efficacy of catalytic bioscavenger, paraoxonase 1 against sarin and soman exposure in guinea pigs // *Biochem. Pharmacol.* 2011. Vol. 81, №6. P. 800–809. doi: 10.1016/j.bcp.2010.12.024.
40. Worek F., Seeger T. Goldsmith M. Ashani Y., Leader H., Sussman J.S., Tawfik D., Thiermann H., Wille T. Efficacy of the rePON1 mutant IIG1 to prevent cyclosarin toxicity in vivo and to detoxify structurally different nerve agents in vitro // *Arch. Toxicol.* 2014. Vol. 88, №6. P. 1257–1266. doi: 10.1007/s00204-014-1204-z.
41. Renault F., Carus T., Cléry-Barraud C., Elias M., Chabrière E., Masson P., Rochu D. Integrative analytical approach by capillary electrophoresis and kinetics under high pressure optimized for deciphering intrinsic and extrinsic cofactors that modulate activity and stability of human paraoxonase (PON1) // *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2010. Vol. 878, №17-18. P. 1346–1355. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.11.027.
42. Bajaj P., Tripathy R.K., Aggarwal G., Datusalia A.K., Sharma S.S., Pande A.H. Refolded recombinant human paraoxonase 1 variant exhibits prophylactic activity against organophosphate poisoning // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2016. Vol. 180, №1. P. 165–176. doi: 10.1007/s12010-016-2091-y.
43. Boado R.J., Hui E.K., Lu J.Z., Pardridge W.M. CHO cell expression, long-term stability, and primate pharmacokinetics and brain uptake of an IgG-paroxonase-1 fusion protein // *Biotechnol. Bioeng.* 2011. Vol. 108, №1. P. 186–196. doi: 10.1002/bit.22907.
44. Han Z.K., Liu Z.N., Yuan L., Zhang P.S., Zhao M. Preparation of paraoxonase-1 liposomes and studies on their in vivo pharmacokinetics in rats // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2014. Vol. 41, №10. P. 825–829. doi: 10.1111/1440-1681.12275.
45. Duysen E.G., Parikh K., Aleti V., Manne V., Lockridge O., Chilukuri N. Adenovirus-mediated human paraoxonase1 gene transfer to provide protection against the

toxicity of the organophosphorus pesticide toxicant diazoxon // *Gene Ther.* 2011. Vol. 18, №3. P. 250–257. doi: 10.1038/gt.2010.136.

46. Kirby S.D., Norris J., Sweeney R., Bahnson B.J., Cerasoli D.M. A rationally designed mutant of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase hydrolyzes the organophosphorus nerve agent soman // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. Vol. 1854, №12. P. 1809–1815. doi: 10.1016/j.bbapap.2015.09.001.

47. Ghanem E., Raushel F.M. Detoxification of organophosphate nerve agents by bacterial phosphotriesterase // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005. №207. P. 459–470. doi.org/10.1016/j.taap.2005.02.025.

48. Masson P. Catalytic bioscavengers: the new generation of bioscavenger-based medical countermeasure // *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents.* 2015. P. 1107–1123. doi: 10.1016/B978-0-12-800159-2.00075-0.

49. Bigley A.N., Mabanglo M.F., Harvey S.P., Raushel F.M. Variants of phosphotriesterase for the enhanced detoxification of the chemical warfare agent VR // *Biochemistry.* 2015. Vol. 54, №35. P. 5502–5512. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00629.

50. Goldsmith M., Eckstein S., Ashani Y., Greisen P.Jr., Leader H., Sussman J.L., Aggarwal N., Ovchinnikov S., Tawfik D.S., Baker D., Thiermann H., Worek F. Catalytic efficiencies of directly evolved phosphotriesterase variants with structurally different organophosphorus compounds in vitro // *Arch. Toxicol.* 2016. Vol. 90, №11. P. 2711–2724. doi: 10.1007/s00204-015-1626-2.

51. Worek F., Seeger T., Reiter G., Goldsmith M., Ashani Y., Leader H., Sussman J.L., Aggarwal N., Thiermann H., Tawfik D.S. Post-exposure treatment of VX poisoned guinea pigs with the engineered phosphotriesterase mutant C23: a proof-of-concept study // *Toxicol. Lett.* 2014. Vol. 231, №1. P. 45–54. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.09.003.

52. Wille T., Neumaier K., Koller M., Ehinger C., Aggarwal N., Ashani Y., Goldsmith M., Sussman J.L., Tawfik D.S., Thiermann H., Worek F. Single treatment of VX poisoned guinea pigs with the phosphotriesterase mutant C23AL: intraosseous versus intravenous injection // *Toxicol. Lett.* 2016. №258. P. 198–206. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.07.004.

53. Del Giudice I., Coppolecchia R., Merone L., Porzio E., Carusone T.M., Mandrich L., Worek F., Manco G. An efficient thermostable organophosphate hydrolase and its application in pesticide decontamination // *Biotechnol. Bioeng.* 2016. Vol. 113, №4. P. 724–734. doi: 10.1002/bit.25843.

54. Gotthard G., Hiblot J., Gonzalez D., Chabrière E., Elias M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the organophosphorus hydrolase OPHC2 from

Pseudomonas pseudoalcaligenes // *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2013. №69. P. 73–76. doi: 10.1107/S174430911205049X.

55. Hiblot J., Gotthard G., Chabriere E., Elias M. Characterisation of the organophosphate hydrolase catalytic activity of SsoPox // *Sci. Rep.* 2012. №2. P. 779. doi: 10.1038/srep00779.

56. Hiblot J., Bzdrenga J., Champion C., Chabriere E., Elias M. Crystal structure of VmoLac, a tentative quorum quenching lactonase from the extremophilic crenarchaeon *Vulcanisaeta moutnovskia* // *Sci. Rep.* 2015. №5. P. 8372. doi: 10.1038/srep08372.

57. Pang Z., Hu C.M., Fang R.H., Luk B.T., Gao W., Wang F., Chuluun E., Angsantikul P., Thamphiwatana S., Lu W., Jiang X., Zhang L. Detoxification of organophosphate poisoning using nanoparticle bioscavengers // *ACS Nano*. 2015. Vol. 9, №6. P. 6450–6458. doi: 10.1021/acsnano.5b02132.

58. Szilasi M1, Budai M, Budai L, Petrikovics I. Nanoencapsulated and microencapsulated enzymes in drug antidotal therapy // *Toxicol. Ind. Health*. 2012. Vol. 28, №6. P. 522–531. doi: 10.1177/0748233711416946.

59. Trovaslet-Leroy M., Musilova L., Renault F., Brazzolotto X., Misik J., Novotny L., Froment M.T., Gillon E., Loiodice M., Verdier L., Masson P., Rochu D., Jun D., Nachon F. Organophosphate hydrolases as catalytic bioscavengers of organophosphorus nerve agents // *Toxicol. Lett.* 2011. Vol. 206, №1. P. 14–23. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.05.1041.

60. Smirnov I., Belogurov A.Jr., Friboulet A., Masson P., Gabibov A., Renard P.Y. Strategies for the selection of catalytic antibodies against organophosphorus nerve agents // *Chem. Biol. Interact.* 2013. Vol. 203, №1. P. 196–201. doi: 10.1016/j.cbi.2012.10.011.

61. Braid L.R., Wood C.A., Ford B.N. Human umbilical cord perivascular cells: A novel source of the organophosphate antidote butyrylcholinesterase. // *Chem Biol Interact.* 2019 May 25;305:66-78. doi: 10.1016/j.cbi.2019.03.022.

62. Филатов Б.Н. Медико-санитарные проблемы уничтожения химического оружия // *Токсикологический вестник*. 2007. №3. С. 2 - 6.