

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

УСЕНКО Марія Олександрівна



УДК 579.69:577.112

**СТВОРЕННЯ ГЕННО-ІНЖЕНЕРНИХ КОН'ЮГАТИВ І ЇХ ВИКОРИСТАННЯ
ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ТА ОЧИЩЕННЯ ВАЖЛИВИХ У ТЕРАПЕВТИЧНОМУ
ЗНАЧЕННІ БІЛКІВ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

Науковий керівник:

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України,
академік НАМН України

Кордюм Віталій Арнольдович,
Інститут молекулярної біології і генетики
НАН України, завідувач відділу
регуляторних механізмів клітини.

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор,
Гарманчук Людмила Василівна,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка,
ННЦ «Інститут біології та медицини»,
професор кафедри екології та зоології;

кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник,
Чернишенко Володимир Олександрович,
Інститут біохімії імені О.В. Палладіна
НАН України, завідувач відділу структури
і функції білка.

Захист відбудеться 27 квітня 2021 року о 10³⁰ на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150.

Автореферат розіслано « » березня 2021 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук, с.н.с.

І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Антитіла широко застосовуються в сучасних фундаментальних і прикладних медико-діагностичних дослідженнях, що потребує розробки нових ефективних методів їх отримання в препаративній кількості з високим ступенем чистоти та специфічності. Так, для очищення моноклональних антитіл застосовують афінні сорбенти на основі білка A *Staphylococcus aureus* та білка G *Streptococcus* sp. (Darcy *et al.*, 2016). Однак, у випадку поліклональних сироваток, відсоток цільових антитіл в яких може коливатися в широких межах, зазначеними методами не можливо виділити високоспецифічні антитіла. Це, в подальшому, критично впливає на проведення імуноферментних аналізів. Застосування інших хроматографічних підходів, що базуються на фізико-хімічних властивостях антитіл, також не забезпечує необхідного ступеня чистоти, що зумовлює необхідність розробки ефективних методів виділення специфічних антитіл. Ефективним є очищення антитіл на антигені, який іммобілізується через послідовність білка-партнера або афінної мітки, що дозволяє уникнути етапу хімічної модифікації матриці та антигену. Отже, актуальним завданням сучасних біотехнологічних досліджень є створення генно-інженерних кон'югатів на основі цільового антигену та маркерної молекули для іммобілізації на матриці з метою очищення специфічних поліклональних антитіл. Також, привабливим є отримання одноланцюгових антитіл scFv (single-chain fragment variable antibodies) (Reader *et al.*, 2019; Ahmad *et al.*, 2012). Такі молекули менші за розмірами і легко піддаються генно-інженерним маніпуляціям. Селекція комбінаторних бібліотек кДНК V-генів імуноглобулінів *in vitro* є критичним етапом їх отримання. Тому актуальним є створення кон'югатів на основі цільового антигену для проведення відбору високоспецифічних та високоафінних scFv. Перспективним є отримання антитіл до інтерлейкіну-7 людини (hIL-7) – терапевтично важливого імунного цитокіну, визначення рівня якого має прогностичне значення для оцінки перебігу вірусних (ВІЛ, цитомегаловірусна інфекція, вірусний гепатит С), аутоімунних (розсіяний склероз, ревматоїдний артрит, діабет 1 типу) та інших захворювань (Varata *et al.*, 2019; Lundström *et al.*, 2012).

Одним з шляхів вповільнення розвитку рецидивно-ремітуючої форми розсіяного склерозу є терапія рекомбінантним інтерфероном IFN β -1b (Zettl *et al.*, 2018; Plosker, 2011). Для терапевтичних та діагностичних досліджень важливим є швидкий моніторинг його концентрації. Застосування scFv(IFN β 1b), злитого з ферментною міткою, дозволить проводити моніторинг концентрації IFN β -1b. Використання химерних молекул як імунологічних зондів значно здешевлює проведення імунологічних досліджень порівняно з використанням комерційно доступних моноклональних антитіл, хімічно кон'югованих з ферментом. Це дозволяє говорити про їх перспективність для застосування як у класичних типах імунодіагностики, так і в нових напрямках досліджень молекулярних процесів *in vivo* та *in vitro*.

Однією з протеїнкіназ, що залучена до розвитку розсіяного склерозу, є протеїнкіназа ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) (Ogier *et al.*, 2020; Takenaka *et al.*, 2020). Актуальним є отримання її рекомбінантного аналога для розробки нових інгібіторів ASK1 людини, які можуть бути використані для дослідження ролі цієї

протеїнкінази в патогенезі аутоімунних захворювань і, як далекоглядна перспектива, в комплексній терапії цих патологічних станів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Дисертація виконана в рамках наукових проектів відділу регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України: «Отримання генно-інженерних імунокон'югатів і їх застосування для імуноафінної хроматографії та виявлення цільових антигенів», державна реєстрація № 0115U005022, 2015-2019 рр; «Вивчення біологічних особливостей альтернативних станів МСК желе Вартона пуповини людини», державна реєстрація № 0117U3913, 2018-2022 рр.

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи є створення біфункціональних генно-інженерних кон'югатів на основі цільових білків та маркерних молекул, визначення можливості їх практичного застосування для виявлення та очищення специфічних антитіл, перевірка ефективності отриманих злитих білків для проведення імунологічних досліджень.

Відповідно до мети було поставлено такі завдання:

1. Сконструювати гени біфункціональних білків rhIL7-His, rhIL7-CBD, плазмідні вектори на їх основі та штами-продуценти *E. coli*, оптимізувати методи отримання злитих білків у розчинній функціонально-активній формі ренатурацією *in vitro*.

2. Показати можливість афінного очищення специфічних антитіл із сироваток імунованих тварин на сорбентах з іммобілізованими rhIL7-His та rhIL7-CBD.

3. Сконструювати ген біфункціонального білка rhIL7-VAPmut, плазмідний вектор на його основі та штам-продуцент *E. coli*, оптимізувати метод отримання злитого білка та проаналізувати можливість застосування rhIL7-VAPmut для скринінгу імунних комбінаторних бібліотек кДНК варіабельних генів імуноглобулінів.

4. Отримати біфункціональний білок scFv(IFN β 1b)-VAPmut та встановити можливість його застосування для виявлення інтерферону бета-1b людини.

5. Розробити схему отримання рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1 людини в біологічно активній формі для подальшого підбору її ефективних низькомолекулярних інгібіторів *in vitro*.

6. Провести дослідження варіабельності індивідуальних реакцій мононуклеарних клітин периферичної крові людини на rhIL7, як важливого прогностичного показника стану імунної системи для подальших імунологічних досліджень.

Об'єкт дослідження – рекомбінантні злиті білки, отримані синтезом в *E. coli*.

Предмет дослідження – розробка методів очищення та ренатурації рекомбінантних білків rhIL7-His, rhIL7-CBD, rhIL7-VAPmut, scFv(IFN β 1b)-VAPmut, ASK1 для їх отримання у функціонально-активній формі, їх застосування для створення імуноафінних сорбентів, скринінгу імунних комбінаторних бібліотек та для проведення імунологічних досліджень.

Методи дослідження – мікробіологічні (наращування і культивування бактерій, трансформація бактерій), генно-інженерні (полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), виділення і рестрикційний аналіз плазмідної ДНК, конструювання рекомбінантних ДНК, електрофорез ДНК, секвенування ДНК), молекулярно-біологічні (експресія рекомбінантних білків), імунохімічні (ферментний імуносорбентний аналіз (ELISA), імуноблотинг), біохімічні (виділення і хроматографічне очищення білків,

електрофорез білків), біоінформаційні (аналіз послідовностей нуклеотидів та амінокислот, робота з базами даних генів).

Наукова новизна одержаних результатів. Розроблено ефективні методи отримання функціонально-активних рекомбінантних білків rhIL7-His, rhIL7-CBD, rhIL7-VAPmut, scFv(IFN β 1b)-VAPmut та ASK1. Продемонстровано можливість використання rhIL7-His та rhIL7-CBD для створення імуноафінних сорбентів. Із білком rhIL7-CBD вперше створено хроматографічний сорбент за принципом орієнтованої іммобілізації rhIL-7 через CBD на целюлозі. Сорбент на основі rhIL7-His розроблено з використанням Ni-NTA агарози як носія. Розроблені сорбенти застосовано для виділення специфічних до IL-7 антитіл з сироваток імунованих тварин із чистотою понад 95%. Отриманий вперше злитий білок rhIL7-VAPmut застосовано для скринінгу імунних комбінаторних бібліотек кДНК варіабельних генів імуноглобулінів. Вперше отримано злитий білок scFv(IFN β 1b)-VAPmut, який дозволяє виявляти інтерферон бета людини в діагностичних дослідженнях.

Практичне значення одержаних результатів. Оптимізовано методи отримання препаративної кількості рекомбінантних злитих білків rhIL7-His, rhIL7-CBD, rhIL7-VAPmut в системі синтезу *E. coli*. Для кожного з зазначених білків оптимізовано метод його ренатурації із бактерійних тілець включення. На основі rhIL7-His та rhIL7-CBD створено хроматографічні сорбенти, які використано для отримання високоспецифічних поліклональних антитіл. Застосування rhIL7-VAPmut забезпечило проведення ефективного скринінгу імунних комбінаторних бібліотек кДНК варіабельних генів імуноглобулінів для отримання scFv(IL-7) з високими показниками афінності та специфічності. Отримані білки можуть бути перспективними кандидатами для виявлення розчинної форми рецептора sIL7R α , рівень якого потребує моніторингу при багатьох патологічних станах організму. Отримано імунокон'югат scFv(IFN β 1b)-VAPmut і показано його ефективність для швидкого виявлення концентрацій інтерферона бета-1b людини в діагностичних дослідженнях. Розроблено схему отримання рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1 людини в активній формі з метою подальшого пошуку її ефективних інгібіторів. Запропоновані методичні підходи можна запроваджувати у технологію виробництва рекомбінантних білків, подібних за структурою та функціональними особливостями до описаних у роботі.

Особистий внесок здобувача. Всі представлені експерименти було виконано особисто здобувачем або за його безпосередньої участі. Зокрема, автором самостійно одержано та охарактеризовано продуценти рекомбінантних білків rhIL7-His, rhIL7-CBD, rhIL7-VAPmut та scFv(IFN β 1b)-VAPmut. Проведено роботу по очищенню і ренатурації цільових білків методами діалізу, гельфільтрації та розведенням. Очищено поліклональні антитіла на створених на основі білків rhIL7-His, rhIL7-CBD імуносорбентів. Відібрано за допомогою білка rhIL7-VAPmut фрагменти моноклональних антитіл scFv(IL-7). Отримано експресований в *E. coli* білок ASK1 людини.

Роботи, пов'язані із клонуванням генів рекомбінантних білків rhIL7-His, rhIL7-CBD, rhIL7-VAPmut, scFv(IFN β 1b)-VAPmut проведено спільно з к.б.н. О.В. Окуневим, розрахунок схем конструювання плазмідних векторів проведено з м.н.с. Д.М. Іродовим. Роботи, пов'язані із перевіркою активності IL7-His на МНПК

проведено спільно з к.б.н. М.В. Ковальчук та к.б.н. Т.П. Рубан. Дослідження, що стосувалися отримання рекомбінантної протеїнкінази ASK1 людини проведено спільно з к.б.н. Г.П. Волинець. Постановку та вирішення задач, аналіз і обговорення одержаних результатів досліджень проведено разом із к.б.н. О.Б. Горбатюк та науковим керівником д.б.н., проф., член-кор. НАН України, акад. НАМН України В.А. Кордюмом.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень доповідались на конференціях і з'їздах: XII Український біохімічний конгрес (Тернопіль, Україна, 2019), 20th International Summer School on Immunology “Immune System: Genes, Receptors and Regulation” (Hvar, Croatia, 2019), 43rd FEBS Congress, (Prague, Czech Republic, 2018), XI та XII Відкриті конференції молодих вчених ІМБГ НАН України (Київ, Україна, 2017, 2018), XIth Parnas Conference: Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine» (Kyiv, Ukraine, 2018), 15th Horizons in Molecular Biology: International PhD Student Symposium (Göttingen, Germany, 2018), 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, (Prague, Czech Republic, 2017), Науково-практична конференція з міжнародною участю Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині (Київ, Україна, 2017), а також на наукових семінарах відділу регуляторних механізмів клітини ІМБГ НАН України.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 15 праць, з яких 5 статей у наукових фахових журналах, 1 патент, тези 9 доповідей у збірниках матеріалів з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел, який охоплює 152 найменувань. Дисертацію викладено на 137 сторінках друкованого тексту та проілюстровано 30 рисунками і 6 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження

У роботі використовували клітини *Escherichia coli* штамів BL21(DE3) та Rosetta(DE3) («Novagen», США), TOP10 («Invitrogen», США), DH10B («Thermo Scientific», США). Для клонування і експресії генів використовували плазмідні вектори *pJET1.2*, *pET24a(+)*, *pET42a*, *pCANTAB5E*. Для проведення молекулярного клонування використовували ферменти виробництва «Thermo Scientific» (США). Генно-інженерні маніпуляції з ДНК виконували за стандартними методиками (Sambrook *et al.*, 1989) та рекомендаціями виробників відповідних ферментів. Нуклеотидні та амінокислотні послідовності аналізували з використанням програми «Vector NTI». Зв'язування антитіл з відповідними антигенами аналізували методами ELISA, дот-блот та Вестерн-блот.

Для синтезу рекомбінантних білків в *E.coli* застосовували як індуктор ПІТГ та модифікованим протоколом аутоіндукції (Studier, 2005). Для очищення та

імобілізації рекомбінантних білків використовували хроматографічні матеріали виробників «Qiagen» (Німеччина), «GE Healthcare» (США). Електрофорез білків проводили у 12% поліакриламідному гелі. Кількість білка у фракціях та ступінь його очистки оцінювали методом денситометрії електрофореграм з подальшим аналізом їх програмою «TotalLab». Ренатурацію цільових білків проводили методами діалізу, гельфільтрації, ступінчастим та плавним розведенням.

Відповідь мононуклеарних клітин периферичної крові (МНПК) на дію rhIL-7 вимірювали в тесті МТТ на життєздатність клітин, використовуючи активовані мітогеном фітогемаглютиніном (ФГА) лімфоцити. МНПК виділяли методом центрифугування в градієнті щільності фіколу (Ficoll-Нураque Plus, «GE Healthcare», США). Статистичний аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення OriginPro 7,5.

Результати досліджень та їх обговорення

Синтез рекомбінантних білків на основі hIL7 в *E. coli*. Для створення систем експресії злитих білків на основі rhIL7 з афінними та ферментними мітками, а саме rhIL7-His, rhIL7-CBD та rhIL7-ВАРmut, використовували плазмідний вектор *pET-24a(+)*. Даний плазмідний вектор дозволяє ввести послідовність олігогістидину на С-кінець ДНК-послідовності цільового білка. Задіяний у формуванні специфічних сайтів зв'язування N-кінець залишається вільним. В свою чергу His-tag, при застосуванні іммобілізуючої металоафінної хроматографії, забезпечує специфічне виділення та можливість подальшої ренатурації на сорбенті синтезованої молекули, а також запобігає «підтіканню» білка у випадку створення іммуного сорбенту.

Для отримання вектора *pET24-IL7-CBD* використовували ДНК-послідовність целюлозозв'язувального домену (CBD) із целюлозолітичного комплексу *Clostridium thermocellum*. Цей домен здатний до селективного зв'язування з целюлозою в умовах, коли інші білки денатуровані і функціонально неактивні. CBD дозволяє іммобілізувати білок на поверхні целюлозного матриксу, при цьому активні сайти білка-партнера залишаються у вільному доступі.

Для отримання вектора *pET24-IL7-ВАРmut* було введено ДНК-послідовність бактерійної лужної фосфатази (ВАРmut). ВАР є периплазматичним металопротеїном, гомодимером, в кожному мономері якого міститься два дисульфідні зв'язки. Їх формування необхідне для правильного фолдингу і активації фермента. ВАРmut, застосована для проведення дослідження, має підвищену ферментативну активність порівняно з бактерійною лужною фосфатазою *E. coli*. У роботі авторів Muller В.Н. та ін. було з'ясовано, що за рахунок двох амінокислотних замін D153G і D330N (заміна аспарагінової кислоти на аспарагін і гліцин у 153 та 330 положеннях відповідно) досягається збільшення каталітичної активності у 17–40 разів без втрати термостабільності фермента.

Для високоефективної експресії плазмідними векторами трансформували штам-реципієнт *E. coli* BL21(DE3). Клітини цього штаму мають ген РНК-полімерази фага Т7. Він експресується під транскрипційним контролем промотора лактозного оперона після індукування ІПТГ або лактозою (за протоколом аутоіндукції). Протокол забезпечує ріст культури до високої щільності, не вимагає великих об'ємів дорогих

культуральних середовищ, а пролонгований час культивування, до 24 годин, дозволяє отримувати максимальний вихід рекомбінантного білка.

Індукування синтезу рекомбінантних білків проводили двома методами – за протоколом аутоіндукції та додаванням IPTG, при +30 °C та +37 °C. Електрофоретичний аналіз лізатів бактеріальних клітин показав наявність у них продуктів очікуваної молекулярної маси.

На рис. 1 наведена електрофореграма розділення білків *E. coli* BL21(DE3) *pET24-IL7-His*. Встановлено, що за обох температур rhIL7-His синтезувався лише за умов аутоіндукції. Максимальний вихід становив 15-20% від вмісту сумарних білків клітин *E. coli*. Вихід цільового білка досягав 0,8 мг/мл вихідної культури *E. coli*. Аналіз білків клітинних фракцій після індукції експресії показав, що білок rhIL-7 накопичувався в нерозчинній формі – бактерійних тілцях включення.

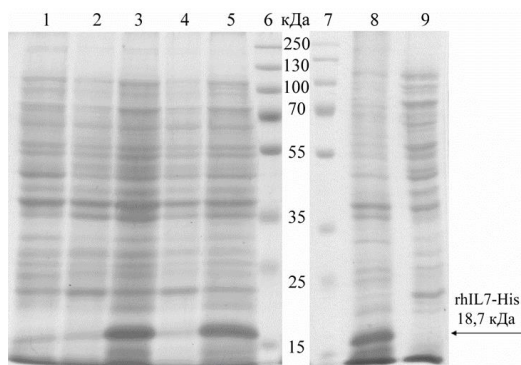


Рис. 1. Електрофореграма білків *E. coli*, отриманих в результаті індукування синтезу rhIL7-His:

- 1 – клітини без індукції;**
- 2, 4 – індукція IPTG при 30°C і 37°C, відповідно;**
- 3, 5 – аутоіндукція при 30°C і 37°C, відповідно;**
- 6, 7 – білки-маркери молекулярної маси («Thermo Scientific», США);**
- 8 – фракція нерозчинних білків клітин;**
- 9 – фракція розчинних білків клітин**

Електрофоретичний аналіз лізатів бактеріальних клітин *E. coli* BL21(DE3) *pET24-IL7-CBD* показав наявність у них білка rhIL7-CBD очікуваної молекулярної маси при застосуванні протоколу аутоіндукції, в результаті додавання IPTG синтез цільового білка був відсутній (рис. 2). Максимальний рівень накопичення цільового білка (30% від вмісту сумарних білків клітин *E. coli*) спостерігався у випадку аутоіндукції при +37°C. Цільовий білок накопичувався у вигляді бактерійних тілець включення, вихід цільового білка досягав 0,2 мг/мл вихідної культури *E. coli*.

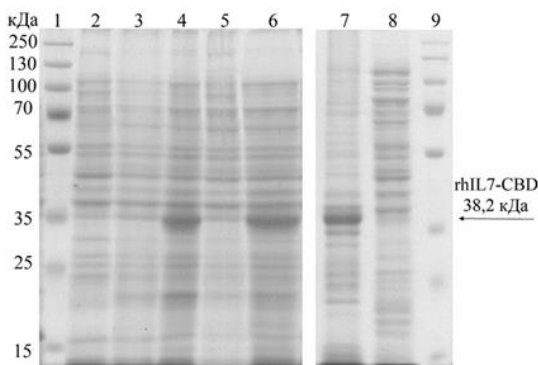


Рис. 2. Електрофореграма білків *E. coli*, отриманих в результаті індукування синтезу rhIL7-CBD:

- 1, 9 – білки-маркери молекулярної маси;**
- 2 – клітини без індукції;**
- 3, 5 – індукція IPTG при 30°C і 37°C, відповідно;**
- 4, 6 – аутоіндукція при 30°C і 37°C, відповідно;**
- 7 – фракція нерозчинних білків клітин,**
- 8 – фракція розчинних білків клітин**

Електрофореграма на рис. 3 демонструє наявність білка rhIL7-VAPmut, отриманого синтезом в *E. coli* BL21(DE3) *pET24-IL7-VAPmut*. Білок накопичувався у вигляді бактерійних тілець включення, як за умов протоколу аутоіндукції, так і індукції IPTG при +37 °C. При цьому його вихід був нижчим ніж у випадку аутоіндукції при тій самій температурі. У випадку аутоіндукції при +37 °C максимальний рівень накопичення цільового білка становив близько 30% від вмісту

сумарних білків клітин *E. coli*. Вихід цільового білка досягав 0,4 мг/мл вихідної культури *E. coli*.

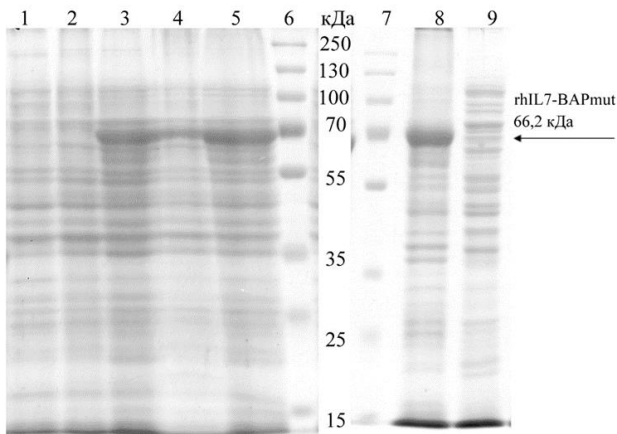


Рис. 3. Електрофореграма фракції білків *E. coli*, отриманих в результаті індукування синтезу rhIL7-BAPmut:

- 1 – клітини без індукції;
- 2, 4 – індукція ШТГ при 30°C і 37°C, відповідно;
- 3, 5 – аутоіндукція при 30°C і 37°C, відповідно;
- 6, 7 – білки-маркери молекулярної маси,
- 8 – нерозчинна фракція білків клітин,
- 9 – розчинна фракція білків клітин

Ренатурація і перевірка активності rhIL7-His. Щоб отримати очищену фракцію rhIL7-His, було проведено виділення тілець включення, які за результатом денситометрії містили в середньому 0,62 мг/мл rhIL7-His в перерахунку на вихідну культуру *E. coli*. Подальша робота була сконцентрована на очищенні та ренатурації rhIL7-His *in vitro*. Солюбілізацію тілець включення проводили в буферному розчині, що містив 7 М ГГХ та 10 мМ 2-меркаптоетанол. Очищення проводили методом металоафінної хроматографії, очищений білок ренатурували чотирма методами: ступінчастим розведенням, ренатурацією на металоафінному сорбенті, гель-фільтрацією та діалізом. Аналіз зв'язування ренатурованого за чотирма методиками rhIL7-His з антитілами до IL-7 в ELISA показав, що найвища ефективність ренатурації спостерігалась у методі діалізу (рис. 4). Так, елюйований IL7-His діалізували проти буфера для ренатурації із аргініном та окисненим/відновленим глутатіонами впродовж 72 год при 4 °C, та проти PBS впродовж 24 год при 4 °C. Для заміни буфера на калій-фосфатний з 0,1 М L-аргініном застосовували гель-фільтраційну колонку, і додавали 4 мМ GSH, 0,4 мМ GSSG для коректного формування дисульфідних зв'язків.

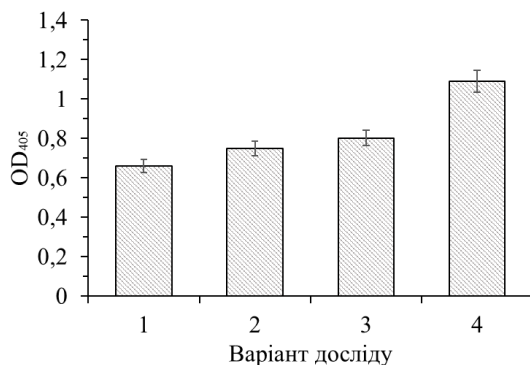


Рис. 4. Аналіз зв'язування rhIL7-His, ренатурованого за різних умов, з антитілами до IL-7 в ELISA (n=3, p<0,05). Зв'язувальну активність порівнювали при концентрації rhIL7-His 1 мкг/мл.

- 1 – ступінчасте розведення;
- 2 – ренатурація на металоафінному сорбенті;
- 3 – гель-фільтрація;
- 4 – діаліз

Нижчі, співставні між собою ефективності показали методи ренатурації на металоафінному сорбенті та гель-фільтрації. Допоміжні речовини, такі як глутатіони, аргінін забезпечили підвищення виходу функціонально-активного rhIL7-His за рахунок перешкоджання його агрегації, а також сприяли коректному формуванню

дисульфідних зв'язків. Вихід цільового білка після очистки та ренатурації становив 80%. Чистота препарату складала близько 90% (рис. 5).

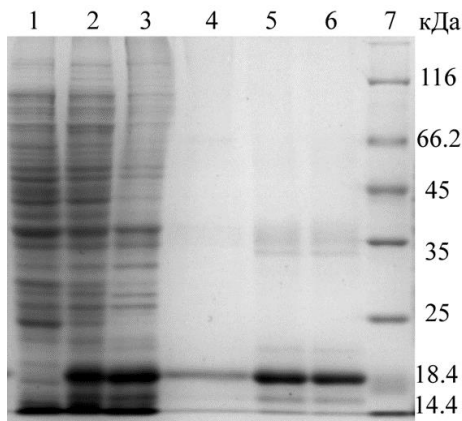


Рис. 5. Електрофореграма білків *E. coli*, отриманих в результаті ренатурації rhIL7-His:

**1 – клітини без індукції;
2, 3 – фракція бактерійних тілець включення;
4, 5, 6 – фракції очищеного ренатурованого rhIL7-His, розведенням (4), діалізом (5,6);
7 – білки-маркери молекулярної маси**

Для перевірки активності rhIL-7, ренатурованого методами діалізу та гельфільтрації, застосовували тест на мононуклеарних клітинах периферичної крові (МНПК). Відповідь МНПК на дію rhIL-7 вимірювали в тесті МТТ на життєздатність клітин, використовуючи активовані мітогеном фітогемаглютиніном (ФГА) лімфоцити периферичної крові людини. Для визначення ефективності ренатурації був поставлений наступний експеримент: клітини були розділені на дві групи, одну з яких обробляли різними концентраціями rhIL-7 («PeproTech», США), а іншу різними концентраціями ренатурованого rhIL-7. Після інкубації впродовж 72 год проводили МТТ аналіз життєздатності клітин (рис. 6).

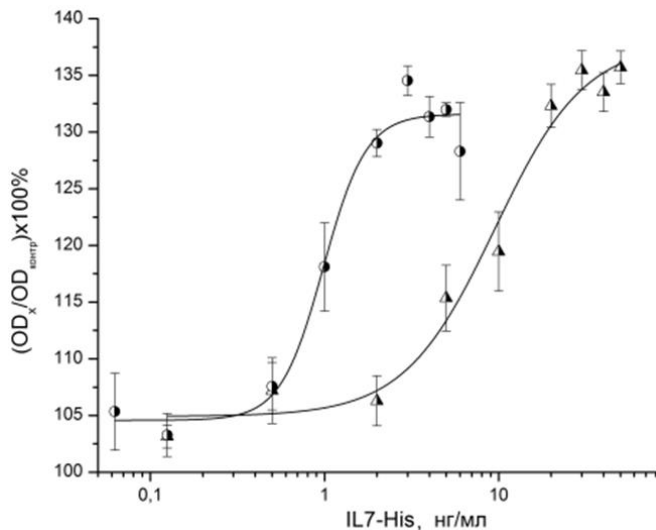


Рис. 6. Графік порівняння впливу на МНПК концентрацій rhIL7 («PeproTech», США) (○) та ренатурованого методом гельфільтрації rhIL7-His (Δ). Криві побудовані із застосуванням логістичного аналізу

Результати МТТ тесту продемонстрували вищу кількість живих клітин при внесенні до культури МНПК певних визначених концентрацій rhIL7 порівняно з контрольною групою, в яку нічого не додавали. При цьому для досягнення однакового рівня виживання клітин потрібно внести вищу концентрацію rhIL7-His, отриманого ренатурацією із застосуванням гель-фільтрації, ніж стандартного препарату rhIL7 «PeproTech» (рис. 6). Це свідчить, що активність rhIL7-His, отриманого гель-фільтрацією поступається активності стандартного препарату rhIL7. Отже, метод ренатурації гель-фільтрацією в даному випадку не можна вважати достатньо ефективним. В той же час, для препарату rhIL7, ренатурованого діалізом,

порівняльний аналіз свідчить про співставну активність і афінність до рецепторів клітин отриманого нами і стандартного препарату (рис. 7). Відповідно, можна зробити висновок про отримання білка в повністю активній функціональній формі і про ефективність ренатурації рекомбінантного білка rhIL7-His методом діалізу.

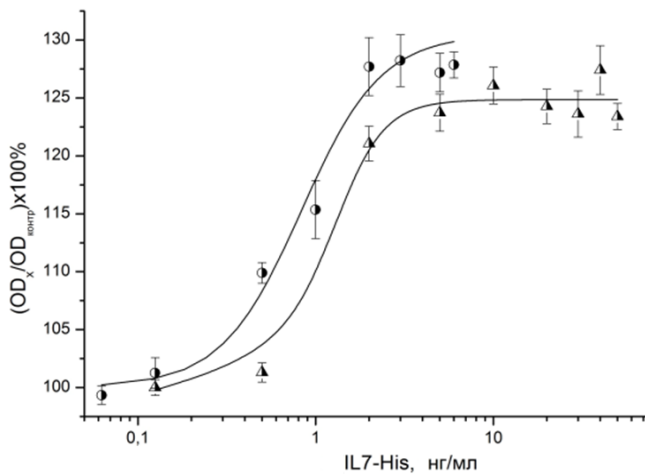


Рис. 7. Графік порівняння дозозалежного впливу на МНПК концентрацій rhIL7 («PeproTech», США) (\circ) та ренатурованого методом діалізу rhIL7-His (Δ). Криві побудовані із застосуванням логістичного аналізу

Ренатурація і перевірка активності rhIL7-CBD. Для одержання активного rhIL7-CBD було проведено його ренатурацію *in vitro* із бактерійних тілець включення. Суттєвий вплив на ефективність процесу ренатурації мають нецільові білкові домішки, що спричиняють агрегацію білка. Було проведено відпрацювання умов очищення цільового протеїна, в результаті було досягнуто чистоти препарату близько 90% (рис. 8, доріжки 1 та 6).

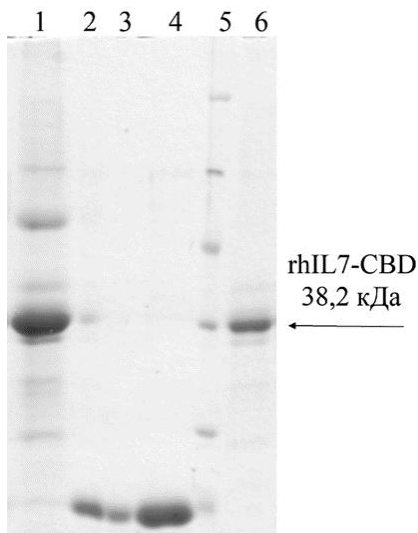


Рис. 8. Електрофореграма фракції білків, отриманих у результаті очищення rhIL7-CBD із бактерійних тілець включення:
 1 – rhIL7-CBD до оптимізації умов очищення;
 2–4 – білки-маркери концентрації;
 5 – білки-маркери молекулярної маси (116, 66, 45, 35, 25, 18,4 кДа);
 6 – rhIL7-CBD після оптимізації умов очищення

Після очистки на металоафінному сорбенті проводили ренатурацію білка методами плавного розведенням та діалізу, з додаванням аргініну, окисненого та відновленого глутатіонів, а також бета-циклодекстрину. Склад буферних розчинів для ренатурації наведено на рис. 9. Ефективність ренатурації rhIL7, у складі злитого білка rhIL7-CBD, визначали за результатами зв'язування із специфічними антитілами в ELISA. Було показано, що найвищу ефективність має метод ренатурації діалізом, який і було обрано для отримання необхідної кількості злитого білка для іммобілізації на целюлозі.

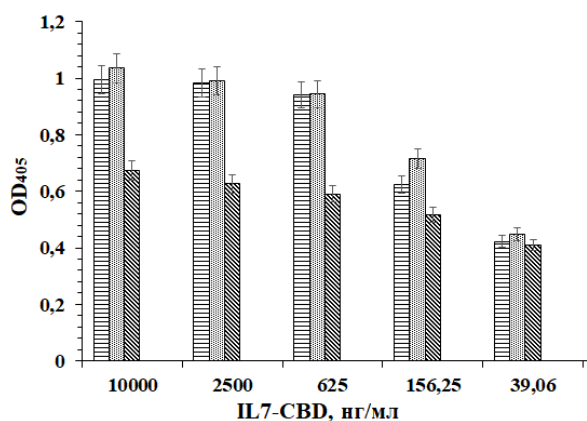


Рис. 9. Аналіз зв'язування rhIL7-CBD з антитілами до IL-7 в ELISA ($n=3$, $p<0,05$). rhIL7-CBD ренатурований методами:
 1 - плавне розведення 100 мМ Трис, 2 мМ EDTA, 0,5 М L-аргінін, 0,1 мМ GSSG (pH=8.0);
 2 - діаліз 50 мМ Трис, 50 мМ NaCl, 100 мМ L-аргінін, 0,5 мМ GSSG, 5 мМ GSH (pH=8.0);
 3 - плавне розведення 100 мМ Трис, 100 мМ NaCl, 5 мМ бета-циклодекстрин, 0,5 М L-аргінін, 0,4 мМ GSSG, 4 мМ GSH (pH=8.0)

Отриманий біоафінний сорбент в результаті іммобілізації rhIL7-CBD на мікрокристалічній целюлозі CC31 було застосовано для виділення специфічних до IL-7 поліклональних антитіла із сироваток імунізованих тварин. Перед нанесенням на афінний сорбент проводили первинне очищення тотальної фракції IgG імунізованих мишей на сорбенті із білком SPA-CBD або осадження IgG сульфатом амонію. Елюцію специфічних поліклональних антитіл проводили буфером, що містить 3,5 М MgCl₂. Такі умови забезпечують селективну десорбцію антитіл. Завдяки високій ємності сорбенту і ефективності схем іммобілізації та елюювання специфічних антитіл, цей метод дозволяє одержувати антитіла високого ступеня чистоти у препаративній кількості (рис. 10. а). Специфічність антитіл до rhIL-7 було підтверджено за допомогою методу Вестерн-блот аналізу. Показано, що отримані антитіла специфічно розпізнають rhIL-7 і не проявляють перехресного зв'язування з іншими білками, про що свідчила відсутність сигналу на доріжках 2, 4 та 5 (рис. 10. б).

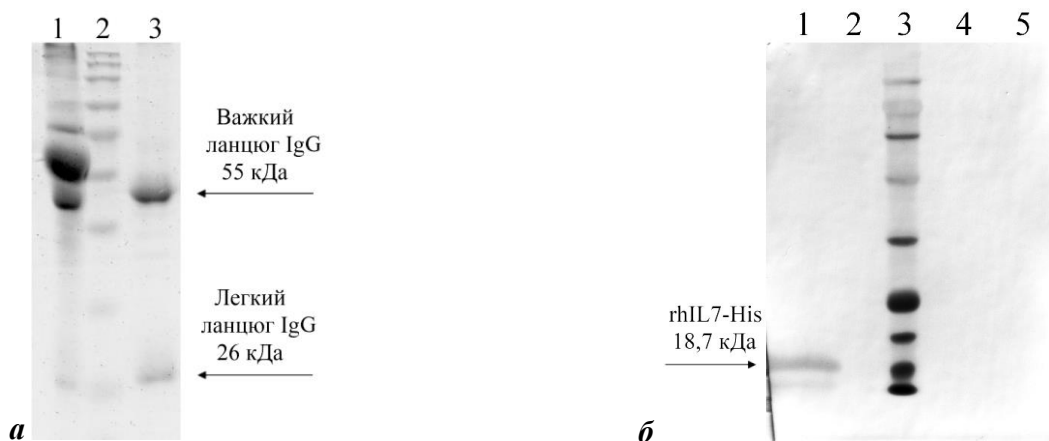


Рис. 10. Електрофореграма (а) та Вестерн-блот аналіз (б) отриманих поліклональних антитіл. (а) Електрофореграма фракцій елюції поліклональних антитіл з афінної колонки: 1 – нанесені на колонку білки сироватки імунізованих тварин; 2 – білки-маркери молекулярної маси; 3 – елюювані антитіла. (б) Вестерн-блот аналіз зв'язування очищених антитіл, специфічних до rhIL-7, з наступними білками: 1 – rhIL7-His; 2 – ASK1; 4 – IFNβ-1b; 5 – IL-10

Очищені на афінному сорбенті поліклональні антитіла, специфічні до IL-7, були використані для виявлення антигену в прямому методі ELISA. Було показано, що отримані IgG достовірно виявляють rhIL-7 в концентрації 34 нг/мл (рис. 11).

Очищення антитіл на іммобілізованому антигені – найбільш специфічний тип афінної хроматографії, що забезпечує отримання антитіл з найвищим ступенем

чистоти та найменшою кількістю молекул з перехресною реактивністю. Отримані із поліклональних сироваток афінно очищені антитіла демонструють найвищу специфічність і чутливість. Оскільки ці антиген-специфічні антитіла є поліклональними, вони можуть бути використані як для зв'язування антигену, так і його виявлення у сандвіч-методах імуноаналізу.

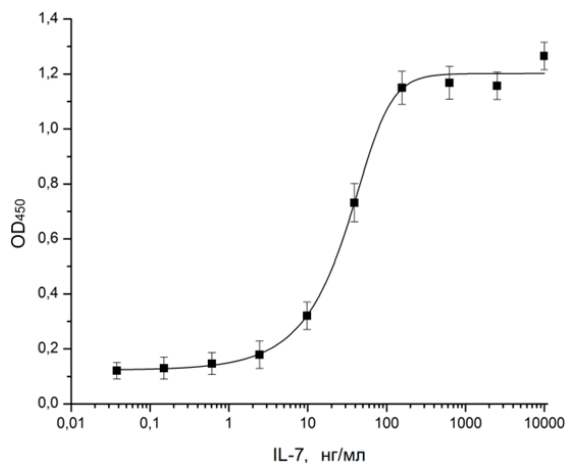


Рис. 11. Крива зв'язування очищених на біоафінному сорбенті поліклональних антитіл до IL7 в ELISA

Ренатурація і перевірка активності rhIL7-ВАРmut. Для отримання очищеної фракції rhIL7-ВАРmut виділяли бактерійні тільця включення. Вміст цільового білка досягав 30–35% від вмісту сумарних білків клітин *E. coli* (рис. 12). Отримані тільця включення містили в середньому 0,32 мг/мл rhIL7-ВАРmut в перерахунку на вихідну культуру *E. coli*.

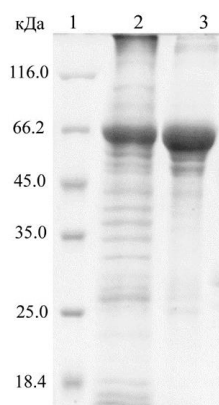


Рис. 12. Електрофореграма фракції білків бактерійних тілець включення:

**1 – білки маркери молекулярної маси;
2 – виділені та очищені тільця включення rhIL7-ВАРmut;
3 – очищений rhIL7-ВАРmut на металоафінному сорбенті та гель-фільтраційній колонці**

Очищення проводили методом металоафінної хроматографії. Оскільки імідазол, застосований для елюції білка, може впливати на активність лужної фосфатази, провели заміну буфера для елюції на буфер без імідазолу методом гель-фільтрації на сорбенті сефадекс G-25. Узагальнені дані результату синтезу, очищення та ренатурації злитого білка IL7-ВАРmut за різних умов індукування синтезу наведено в таблиці 1.

Для проведення ренатурації rhIL7-ВАРmut застосовували метод плавного розведення. Аргінін у концентрації 0,1 – 1 М дозволяє підвищити розчинність білка, адже гуанідинова група має слабкі взаємодії з ароматичними групами амінокислот, що сприяють агрегації денатурованого білка (Tsumoto *et al.*, 2004). Додавання глутатіону забезпечує ренатурацію білків, що містять дисульфідні зв'язки. Співвідношення відновленого і окисненого глутатіонів (GSH/GSSG) 10:1 – 5:1 забезпечує максимальний вихід функціонально-активного білка (Khodagholi *et al.*, 2007).

Порівняння результатів синтезу, очищення та ренатурації рекомбінантного злитого білка IL7-VARmut за умов індукування синтезу додаванням ШТГ та за протоколом аутоіндукції при температурі + 37°C

	Аутоіндукція	Індукція ШТГ
Вихід цільового білка, після індукування його синтезу (мг/л <i>E. coli</i>)	390	100
Рівень накопичення цільового білка від сумарних білків <i>E. coli</i> , %	30	23
Значення OD ₆₀₀ бактерійної культури після індукування синтезу	15.3	9.1
Вихід* IL7-VARmut після виділення та очищення тілець включення, %	80	–
Чистота IL7-VARmut після очищення та ренатурації, %	90	–
Вихід* IL7-VARmut після очищення та ренатурації (мг/л <i>E. coli</i>)	70	–

Примітка: * - вихід rhIL7-VARmut розраховували як відсоток отриманого білка від його загальної кількості після індукування синтезу

У нашому випадку компонентом злитого білка є металопротеїн – лужна фосфатаза, що містить в складі активного центру два іони Zn²⁺, необхідні для реалізації каталітичної функції і термодинамічної стабільності, а також іон Mg²⁺ необхідний для структурної стабілізації фермента (Dirnbach *et al.*, 2001). Іони Mg²⁺ запобігають агрегації і збільшують активність ренатурації фосфатази на 50% вже за присутності в концентрації 5 мМ. Таке підвищення ефективності ренатурації не досягалося при додаванні Zn²⁺ навіть за більших концентрацій (20 мМ). Mg²⁺ стабілізує інтермедіати на ранній стадії ренатурації VAR, зменшуючи агрегацію денатурованих молекул. Тому в роботі було застосовано лише іони Mg²⁺. Допоміжні речовини, які додавали під час ренатурації плавним розведенням (табл. 2), забезпечили підвищення виходу функціонально-активного rhIL7-VARmut за рахунок перешкоджання його агрегації, а також сприяли коректному формуванню дисульфідних зв'язків.

Варіанти ренатурації rhIL7-VARmut

№	Метод ренатурації	Склад буфера для ренатурації
1	плавне розведення	100 мМ Tris-HCl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 500 мМ аргінін, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 5 мМ MgSO ₄
2	плавне розведення	100 мМ Tris-HCl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 5 мМ β- циклодекстрин, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 5 мМ MgSO ₄
3	плавне розведення	100 мМ Tris-HCl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 0,1% Triton X-100
4	на металоафінному сорбенті	100 мМ Tris-HCl pH 8.0, 150 мМ NaCl, 100 мМ аргінін, 5 мМ GSH/1 мМ GSSG, 5 мМ MgSO ₄

Оскільки ренатурація розведенням не завжди є технологічною, а rhIL7-ВАРmut містить генетично введену послідовність His-tag, привабливим було використання останньої для проведення його одностадійного очищення та ренатурації на металоафінному сорбенті. Однак, було встановлено, що у випадку rhIL7-ВАРmut стеричні обмеження не дозволяють білку набути нативної конформації. Відтак, для rhIL7-ВАРmut метод плавного розведення, що не має стеричних обмежень, виявився більш ефективним у порівнянні з ренатурацією на колонці (рис. 13). Додавання до ренатуруючого буфера L-аргініну і глутатіонів для формування дисульфідних зв'язків забезпечило найвищий вихід активного rhIL7-ВАРmut.

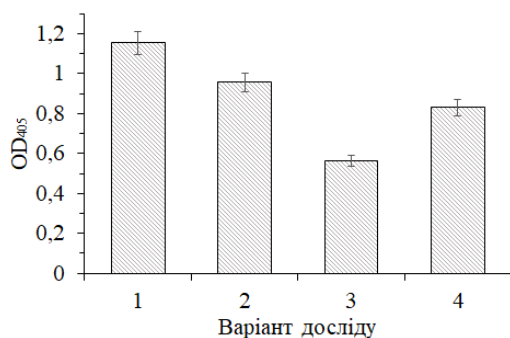


Рис. 13. Аналіз зв'язування rhIL7-ВАРmut, ренатурованого за присутності різних реагентів і їх співвідношень, з антитілами до ІЛ-7 в ELISA (n=3, p<0,05). Умови ренатурації наведено у таблиці 3.3. Зв'язувальну активність порівнювали при концентрації rhIL7-ВАРmut 1 мкг/мл

Перевірку біологічної активності rhIL-7 у складі злитого білка проводили шляхом зв'язування зі специфічними до rhIL-7 полі- та моноклональними антитілами. Для візуалізації імунних комплексів застосовували нерозчинний субстрат для лужної фосфатази NBT/BCIP-T («Sigma», США). rhIL7-ВАРmut давав чіткий сигнал у випадку обох антитіл, що є свідченням специфічності реакції та підтвердженням його біфункціональної активності (рис. 14).

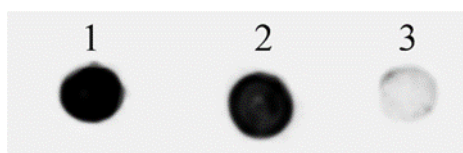


Рис. 14. Дот-блот аналіз зв'язування rhIL7-ВАРmut з антитілами, специфічними до ІЛ7.

1 – поліклональні антитіла кроля, специфічні до ІЛ7;
2 – моноклональні антитіла миші, специфічні до ІЛ7;
3 – негативний контроль

Також проводилося визначення оптимальних умов функціонування ВАРmut. В результаті імуноферментного аналізу було встановлено, що при використанні буферних систем на основі Трис або CAPS при значенні рН 9,5 – 10,0 спостерігалась найвища активність фермента (рис. 15).

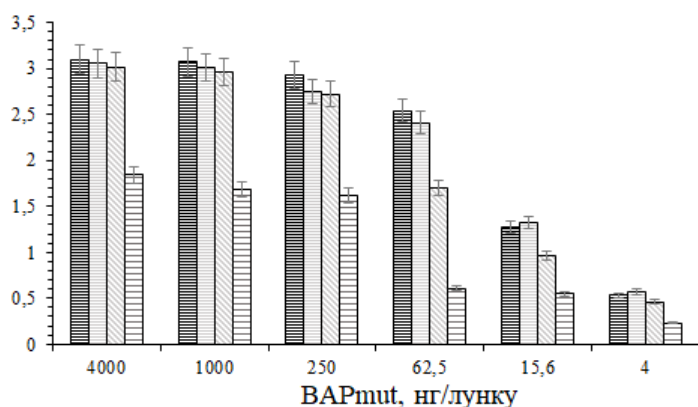


Рис. 15. Визначення оптимальних умов для функціонування ВАРmut в ELISA.

Буфер 1 – 100 мМ Tris-HCl, 140 мМ NaCl, 15 мМ MgSO₄ (рН=9,5);
буфер 2 – 50 мМ CAPS, 400 мМ NaCl, 10 мМ MgSO₄ (рН=10,0);
буфер 3 – 100 мМ Tris-HCl, 15 мМ MgSO₄ (рН=9,0);
буфер 4 – 50 мМ гліцин, 15 мМ MgSO₄, (рН=9,2)

Отриманий злитий білок rhIL7-ВАРmut було застосовано для скринінгу імунної комбінаторної бібліотеки кДНК варіабельних генів імуноглобулінів миші шляхом аналізу реплік бактерійних колоній (клонів-продуцентів одноланцюгових антитіл, специфічних до ІL7). В результаті було виділено клони, що продукують специфічні scFv (рис. 16).

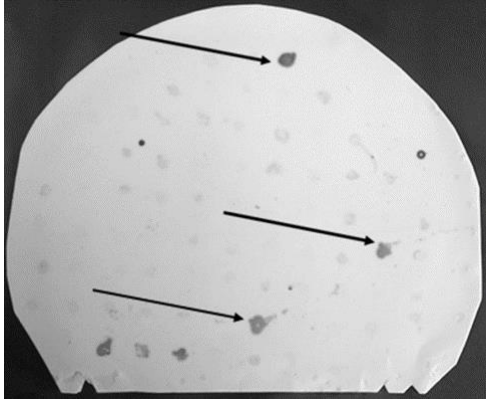


Рис. 16. Імуноблот реплік бактерійних колоній, одержаних в результаті скринування клонів, отриманих після декількох циклів афінної селекції фагової бібліотеки проти rhIL7. Візуалізацію клонів-продуцентів проводили із застосуванням rhIL7-ВАРmut. Стрілками вказано клони, що продукують специфічні антитіла

Отриманий злитий білок rhIL7-ВАРmut також може бути використаний для одностадійного виявлення специфічних до ІL7 антитіл. Схема проведення класичного імуноферментного аналізу із застосуванням кон'югату антигену з маркерною молекулою наведено на рис. 17.

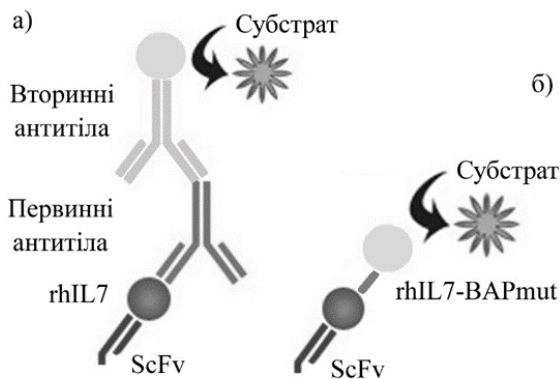


Рис. 17. Схематичне зображення проведення ELISA для детекції scFv(IL7): а) виявлення імунних комплексів scFv-rhIL7 відбувається в результаті послідовного додавання специфічних первинних і вторинних антитіл; б) виявлення scFv(IL7) проводиться в результаті взаємодії злитого білка rhIL7-ВАРmut

Застосування rhIL7-ВАРmut дозволяє суттєво скоротити час проведення імуноферментного аналізу та зменшити витрати на імунореагенти.

Отримання рекомбінантного білка scFv(IFNβ1b)-ВАРmut. Терапія рекомбінантним інтерфероном наразі є одним з широковикористовуваних шляхів вповільнення розвитку рецидивно-ремітуючої форми розсіяного склерозу. Для детального вивчення механізмів розвитку РС, розробки ефективних шляхів терапії захворювання актуальним є ґрунтовне вивчення профілів зміни концентрацій IFNβ в різних пробах. Для встановлення концентрацій вдалим інструментом є одноланцюгові рекомбінантні антитіла, що складаються з варіабельних доменів легкого та важкого ланцюгів імуноглобулінів. На відміну від повнорозмірних моноклональних і поліклональних, комерційно доступних антитіл, технологія отримання scFv набагато дешевша для впровадження та менш трудомістка. scFv антитіла можуть бути отримані у високих концентраціях в бактеріальних системах

синтезу, можуть бути стабільними і характеризуватися високими значеннями констант афінності, високою специфічністю. А також можуть бути модифіковані, злиті з флуоресцентними чи ензимними мітками.

За допомогою такого методу селекції комбінаторних бібліотек як фаговий дисплей було отримано scFv до IFN β -1b з імунної комбінаторної бібліотеки кДНК варіабельних генів імуноглобулінів. ScFv(IFN β 1b) та VAPmut поєднувались лінкерною послідовністю з трьох залишків аланіну, що сприяло просторовому розділенню білків-партнерів і забезпечувало збереження їх структури та функціональної активності. N-кінець молекули scFv приймає участь у формуванні активного центру антитіла, тому для уникнення втрати антигензв'язувальної активності молекула VAPmut приєднувалась до C-кінця scFv(IFN β 1b).

Створеним плазмідним вектором *pCANTAB-scFv(IFN β 1b)-VAPmut* трансформували клітини *E. coli* BL21(DE3). Ключовою особливістю системи експресії, яка була обрана нами для досліджень, є можливість отримання scFv у функціонально активній формі, що досягається секрецією scFv у бактеріальну периплазму. У периплазмі формуються дисульфідні містки, необхідні для підтримання нативної структури варіабельних доменів і проходження правильного фолдингу молекул scFv. Так забезпечується накопичення цільового білка у біологічно активному та розчинному стані. Після завершення фолдингу одноланцюгових антитіл у периплазмі відбувається також протеолітичне відщеплення їх лідерного пептида.

На основі п'яти scFv(IFN β 1b) були створені п'ять клонів продуцентів із плазмідними векторами *pCANTAB-scFv(IFN β 1b)-VAP*. Виділяли периплазматичну фракцію білків із scFv(IFN β 1b)-VAP і досліджували функціональну активність злитих антитіл методами дот-блот та імунферментного аналізу. Активність фосфатази спостерігали в усіх п'яти білках. Клони продемонстрували високу специфічність до IFN β 1b людини (рис. 18).

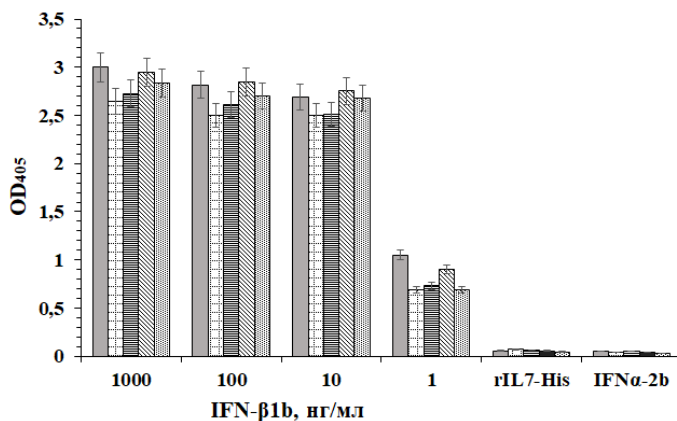


Рис. 18. Підтвердження функціональної активності п'яти клонів scFv(IFN β 1b)-VAP у складі рекомбінантного імунокон'югату із застосуванням імунферментного аналізу

Отримання рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1 людини. Протеїнкіназа ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) відіграє суттєву роль у патогенезі таких аутоімунних хвороб, як розсіяний склероз та ревматоїдний артрит, та є однією з валідованих молекулярних мішеней у канцерогенезі. Вона активує сигнальні шляхи клітини у відповідь на різні типи стресу. Створення продуцента рекомбінантного аналога протеїнкінази дозволяє отримати білок для проведення пошуку низькомолекулярних інгібіторів ASK1.

Каталітичний домен ASK1 ампліфікували з кДНК та клонували в експресійний вектор *pET-42a*, яким трансформували *E. coli* Rosetta. Злитий білок ASK1 містив N-кінцеву послідовність GST та C-кінцевий His-tag. Синтез ASK1 індукували за допомогою ПТГ та методу аутоіндукції. Молекулярна маса отриманого протеїну відповідала передбаченій (60 кДа). Рівень продукції рекомбінантного аналога ASK1 становив приблизно 0,47 г/л культури *E. coli* за використання протоколу аутоіндукції та 0,3 г/л після індукції ПТГ.

З використанням аутоіндукції було отримано більше цільового білка, але значно менше розчинної форми, ніж за індукцією ПТГ. Злитий білок ASK1-GST, отриманий за протоколом аутоіндукції, накопичувався, в основному, у формі бактерійних тілець включення. Індукція за допомогою ПТГ є кращим методом для продукції злитого протеїну ASK1-GST у розчинній формі. Порівняння рівнів експресії при індукції ПТГ та аутоіндукції наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Порівняльна характеристика експресії ASK1 за умов індукування синтезу ПТГ та за протоколом аутоіндукції та його очищення на метало афінному сорбенті

Характеристика	індукція ПТГ	аутоіндукція
Вихід цільового продукту (мг/л культури <i>E. coli</i>)	300	470
Рівень експресії цільового протеїну відносно тотальних протеїнів <i>E. coli</i> , %	27	34
Вихід ASK1 у розчинній формі (мг/л культури <i>E. coli</i>)	190	130
Кінцевий показник OD600 для бактеріальної культури після індукції	14,2	17,8
Вихід ASK1 після очистки із розчинної фракції протеїнів <i>E. coli</i> на колонці Ni-NTA, %	92	92
Вихід ASK1 після очистки на колонці HiPrep 26/10 Desalting column, %	84	83
Чистота, %	94	94
Вихід ASK1 у розчинній формі, %	49	21
Вихід ASK1 у розчинній формі, (мг/л культури <i>E. coli</i>)	147	99

Для отримання протеїна з високим ступенем чистоти використовували швидкий і ефективний метод металоафінної хроматографії (рис. 19).

Ензиматичну активність рекомбінантної протеїнкінази ASK1 визначали за допомогою люциферазного методу – Kinase-Glo Plus Luminescent Kinase Assay. Цей метод є непрямим методом детекції протеїнкіназної активності, що ґрунтується на кількісному визначенні АТФ, що залишається в розчині після кіназної реакції. Люмінесцентний сигнал люциферази прямо-пропорційно залежить від кількості АТФ у середовищі і обернено-пропорційно від активності протеїнкінази.

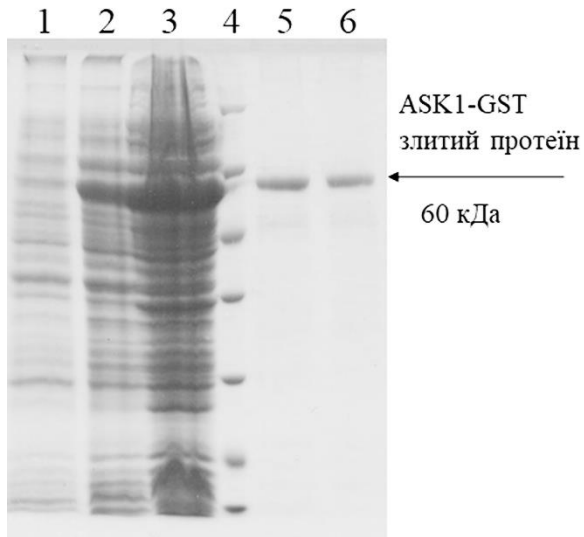


Рис. 19. Електрофореграма лізатів *E. coli* після індукування синтезу рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1 та його хроматографічного очищення.

1 – тотальний лізат клітин *E. coli* без індукції експресії,

2 – тотальні протеїни клітин *E. coli*, після індукування синтезу ASK1 0,5 мМ IPTG,

3 – тотальні протеїни клітин *E. coli*, після індукування синтезу ASK1 за протоколом аутоіндукції,

4 – молекулярні маркери (116.0, 60.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4, 14.4 кДа),

5, 6 – ASK1 після очищення на Ni-NTA агарозі

Графіки ензиматичної активності для каталітичних субодиниць ASK1, що були отримані різними методами індукції синтезу – за використання ПТГ та аутоіндукції – наведено на рис. 20. Оптимальна кількість протеїнкінази для використання в експериментах зі скринінгу інгібувальної активності сполук знаходиться в лінійному діапазоні титрувальної кривої.

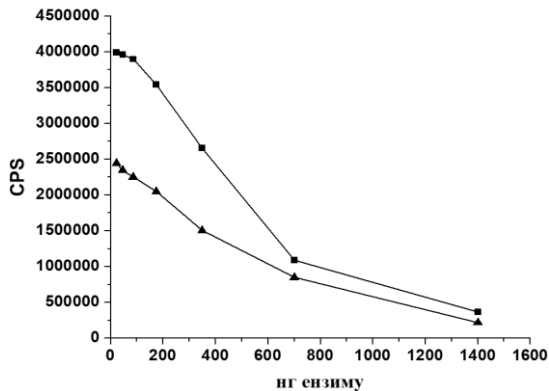


Рис. 20. Графіки активності рекомбінантної каталітичної субодиниці ASK1, що була отримана за використання ПТГ індукції (■) та протоколу аутоіндукції (▲)

Таким чином, для дослідження інгібувальної активності сполук оптимальна концентрація рекомбінантної протеїнкінази ASK1 знаходиться в діапазоні від 200 до 700 нг.

Застосування індукції ПТГ та аутоіндукції для отримання ASK1 є вдалою альтернативою коштовній бакуловірუსній системі синтезу білків. Наш підхід забезпечує стабільне отримання достатньої кількості рекомбінантної ASK1 для пошуку її інгібіторів.

Персоналізована відповідь мононуклеарних клітин периферичної крові людини на дію ІЛ-7. В даний час препарати ІЛ-7 проходять ряд клінічних випробувань. Персональна характеристика імунних клітин із урахуванням сприйнятливості цитокіну та варіативності імунних реакцій серед людей може надати цінну прогностичну інформацію для практичного використання. На сьогоднішній день не проводилося системного вивчення індивідуальних відмінностей у реакції МНПК на ІЛ-7. Метою цієї частини дослідження було оцінити *in vitro*

персоналізовану реакцію МНПК на збільшення доз rhIL-7 та міжіндивідуальну мінливість реакцій клітин у здорових людей.

Для оцінки виживання клітин, яке є результатом активації IL-7R, часто використовуються функціональні аналізи на відповідних популяціях. Для оцінки варіативності реакцій МНПК серед здорових людей було перевірено випадкову вибірку зразків клітин крові на їх здатність відповідати на стимуляцію IL-7. У цьому дослідженні брали участь 18 здорових людей з кількістю лейкоцитів, що потрапляє в нормальний діапазон $(4,0-10,0) \times 10^6$ клітин/мл.

Для оцінки ефекту IL-7 була обрана двоетапна схема стимуляції МНПК. Спочатку клітини стимулювали ФГА для збільшення кількості клітин, що входять в клітинний цикл *in vitro*. Після промивання у середовищі, що не містить цитокінів, клітини культивували у середовищі з rhIL-7. Були визначені оптимальні періоди між обробкою клітин та припиненням відповіді на ФГА, а також між додаванням IL-7 та МТТ-тестуванням. Вплив ФГА припиняли на 3, 5 і 6 день з подальшою підготовкою клітин до обробки IL-7. Використання ФГА-активованих МНПК, які культивували з ФГА протягом 5 днів, дозволило отримати кращі результати для побудови сигмоїдної кривої. Було встановлено, що діапазон концентрацій IL-7 в межах 62,5-6000 пг/мл був оптимальним для побудови кривої залежності відповіді клітин на концентрацію IL-7. Для кожного зразка клітин збільшення життєздатності МНПК за присутності IL-7 вимірювали через 72 та 144 год експозиції з IL-7. Ефект для МНПК в залежності від дози IL-7 показаний на графіках двох експериментів (рис. 21). Значення EC_{50} для культури, яка витримувалась 144 год, становило $0,643 \pm 0,055$ нг/мл, в той час як для культури з часом витримки 72 години аналогічне значення було $0,943 \pm 0,117$ нг/мл для тих самих МНПК. Оскільки важливою є тривалість аналізу, а зміщення значення EC_{50} відносно невелике, було вирішено зупинитися на обробці клітин IL-7 протягом 72 год.

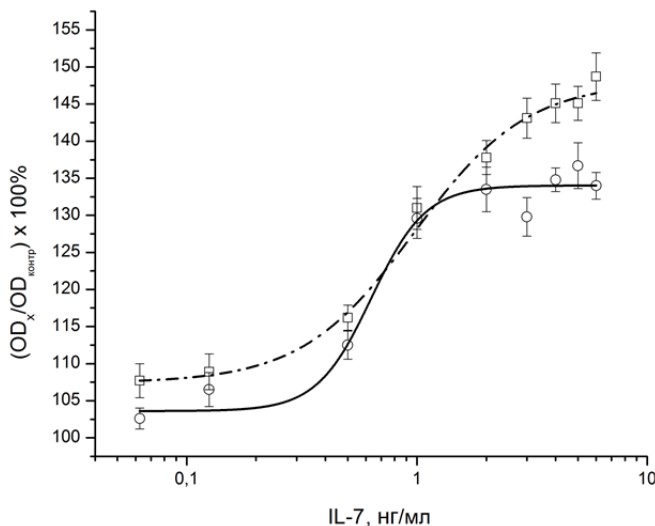


Рис. 21. Графік залежності впливу доз rhIL-7 на культивовані протягом 72 (□) і 144 (○) годин МНПК *in vitro*. Клітини стимулювали rhIL-7 у концентраціях 0,0625, 0,125, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 і 6 нг/мл. Наведені дані щодо виживання клітин з кривими логістичного аналізу. Кожна точка представляє середнє значення $(OD_x/OD_{контр}) \times 100\% \pm$ стандартне відхилення (σ). Вісь x представлена як логарифмічна шкала

Для кожного окремого зразка МНПК визначали життєздатність клітин та отримували криві реакції на IL-7. Всі графіки давали сигмоїдні криві при збільшенні концентрації rhIL-7. Для кожного зразка МНПК визначали концентрацію IL-7, яка призводить до 50% збільшення виживання клітин (EC_{50}), вона знаходилась у діапазоні 420–1540 пг/мл.

Реакція МНПК на ІЛ-7 для різних зразків була неоднорідною. Значення EC_{50} показали значний рівень міжіндивідуальної мінливості. Генотиповий коефіцієнт варіації CV_G становив 38%. Виходячи із значень EC_{50} різниця в чутливості до ІЛ-7 серед осіб відрізнялась майже в 3 рази. Варіабельність EC_{50} представлена на рис. 22.

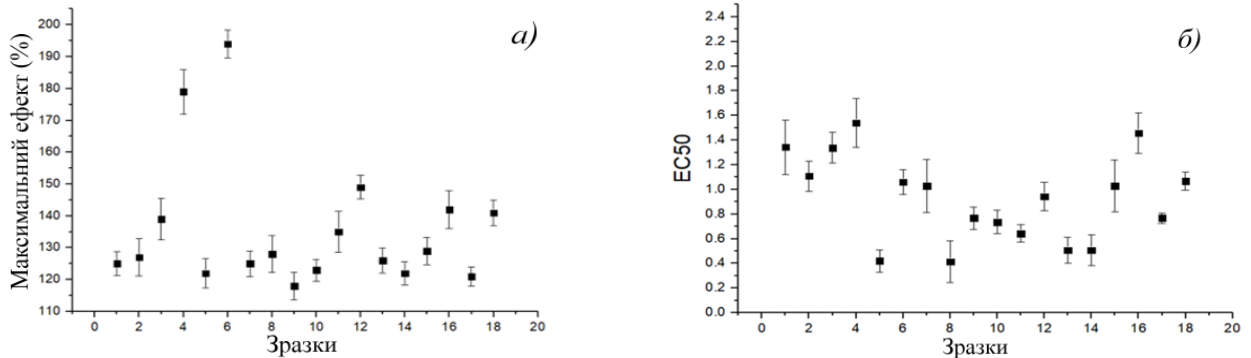


Рис. 22. Міжіндивідуальна варіабельність відповідей МНПК на rhIL-7 *in vitro* (n = 18).

а) Відсотки максимальних ефектів впливу rhIL-7 на МНПК ($CV_G=15\%$).

б) EC_{50} варіабельність ($CV_G=38\%$). Кожен символ відображає середнє значення \pm стандартне відхилення для окремого зразка МНПК

Відсоткове збільшення життєздатності клітин стало максимальним після 72 год інкубації клітин із ІЛ-7 у концентрації 3 нг/мл і більше. Кількість життєздатних МНПК внаслідок обробки ІЛ-7 суттєво збільшувалась у порівнянні з необробленими клітинами, для різних донорів збільшення варіювало в межах від 18% до 94%. Максимальний відсоток збільшення виживання клітин під час інкубації з ІЛ-7 для більшості зразків МНПК відрізнявся не суттєво. CV_G дорівнює 15%. Гетерогенність величини реакції Т-клітин на ІЛ-7 серед різних зразків була представлена як $(OD_{\max} / OD_{\text{контр}}) \times 100\%$. На основі отриманих результатів можна стверджувати, що екзогенний ІЛ-7 підтримує регуляцію апоптозу частини Т-клітин, активованих 5-денним культивуванням з ФГА. Ті самі клітини також можуть бути більш чутливими до низьких концентрацій ІЛ-7.

ВИСНОВКИ

У результаті виконання дисертаційної роботи створено біфункціональні генно-інженерні кон'югати та підтверджено їх функціональну активність. Показано ефективність їхнього застосування для виявлення та очищення антитіл, а також для проведення імунодіагностичних досліджень.

1. Сконструйовано гени та штами-продуценти *E. coli* для отримання злитих рекомбінантних білків rhIL7-His та rhIL7-CBD. Оптимізовано методи їх виділення у розчинній функціонально-активній формі ренатурацією *in vitro*.

2. Злитий білок rhIL7-CBD, після іммобілізації на мікрокристалічній целюлозі CC31, та rhIL7-His, після іммобілізації на металоафінному сорбенті, було застосовано для отримання поліклональних антитіл, специфічних до інтерлейкіну 7 людини з чистотою понад 95 %.

3. Сконструйовано злитий білок rhIL7-ВАРmut та забезпечено його отримання синтезом в клітинах *E. coli*. Встановлено можливість застосування rhIL7-ВАРmut для скринінгу комбінаторної бібліотеки кДНК варіабельних генів імуноглобулінів.

4. Отримано злитий білок scFv(IFN β 1b)–ВАРmut у біологічно-активній формі шляхом накопичення у периплазматичний простір клітин *E. coli*, встановлено можливість його застосування для виявлення інтерферону бета-1b людини. Плазмідний вектор *pCANTAB-scFv(IFN β 1b)-ВАРmut* в подальшому може бути використаний як основа для отримання scFv різної специфічності кон'югованих з лужною фосфатазою.

5. Сконструйовано штам-продуцент *E. coli* для отримання рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1 людини, встановлено умови його біосинтезу, які забезпечили отримання препаративної кількості функціонально-активного ферменту для проведення подальшого скринінгу інгібіторів зазначеної кінази.

6. Проаналізовано вплив ІЛ-7 на МНПК, показано, що спостерігаються значні варіації реакції на ІЛ-7 для МНПК від різних донорів. Індивідуальна реакція МНПК людини на ІЛ-7 може бути цінним прогностичним показником стану імунної системи для проведення подальшого широкомасштабного дослідження відповіді підгруп Т-клітин на терапію на основі ІЛ-7.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Усенко М.О.**, Горбатюк О.Б., Окунєв О.В., Іродов Д.М., Ковальчук М.В., Кордюм В.А. Отримання рекомбінантного злитого білка rhIL7-CBD. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2020. Т. 26. С. 282-286. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v26.1280>. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, підбір умов синтезу, виділення та очищення білка, перевірка активності, обробка результатів, написання статті та підготування її до друку).

2. Kovalchuk M.V., Ruban T.A., **Usenko M.O.**, Kordium V.A. Personalized responsiveness of human PBMCs to the action of IL-7. *Biopolymers and Cell*. 2020. Vol. 36. N 4. P. 304–312. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A33>. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, участь у підготовці експериментів, участь у написанні статті та підготовці її до друку).

3. **Усенко М.О.**, Окунєв О.В., Бенціонова К.І., Горбатюк О.Б., Іродов Д.М., Кордюм В.А. Отримання рекомбінантного злитого білка rhIL7-ВАРmut та його функціональна характеристика. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. Т. 25. С. 321-326. DOI: <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1185>. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, підбір умов синтезу, виділення та очищення білка, перевірка активності, обробка результатів, написання статті та підготування її до друку).

4. **Усенко М.О.**, Окунєв О.В., Бенціонова К.І., Горбатюк О.Б., Іродов Д.М., Ковальчук М.В., Кордюм В.А. Оптимізація умов ренатурації злитого білка rhIL7-ВАРmut із тілець включення *Escherichia coli* та його практичне застосування. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2019. Т. 17. № 1. С. 39-45. DOI: <https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.17.1.1199>. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, підбір умов очищення та ренатурації білка, перевірка активності, обробка результатів, написання статті та підготування її до друку).

5. Volynets G.P., Gorbatiuk O.B., Kukharenko O.P., **Usenko M.O.**, Yarmoluk S.M. Production of recombinant human apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 2016. V. 126. P. 89-92. DOI: 10.1016/j.pep.2016.05.016. (*Особистий внесок здобувача: підбір умов синтезу, виділення та очищення білка, перевірка активності, обробка результатів*).
6. Патент на корисну модель № 132794 Україна. МПК (2019.01) C12N 15/00. Опубл. 11.03.2019, Бюл. № 5. Модифікований генно-інженерний злитий білок scFv(IFN β 1b)-VAP, продукований бактеріями *E. coli*. Горбатюк О.Б., **Усенко М.О.**, Іродов Д.М., Кордюм В.А. (*Особистий внесок здобувача: підбір умов виділення та активності білка, обробка результатів, участь у написанні патенту*).
7. Gorbatiuk O.B., **Usenko M.O.**, Okunev O.V., Bentsionova K. I., Irodov D.M. Optimization of renaturation method of the IL7-VAPmut fusion protein, its characterization and application. Матеріали XII Українського біохімічного конгресу. м. Тернопіль, 2019. *Медицина та клінічна хімія*. Т. 21. № 3 (додаток). С. 266.
8. **Usenko M.**, Gorbatiuk O., Okunev O., Kordium V. High-throughput purification method of the recombinant human IL7. 20th International Summer School on Immunology “Immune System: Genes, Receptors and Regulation”, Hvar, Croatia, 2019. Book of abstracts P. 107.
9. **Usenko M.**, Gorbatiuk O., Okunev O., Kordium V. Obtaining and characterization of a singlechain variable fragment alkaline phosphatase fusion proteins and specific polyclonal antibodies for detection of IFNbeta and interleukin10. 43rd FEBS Congress, Prague, Czech Republic 2018. *FEBS Open Bio*. Vol. 8, N 1. P. 186.
10. **Usenko M.O.**, O.B. Gorbatiuk, O.V. Okunev, V.A. Kordium. Obtaining and characterization of the IL-7-CBD fusion protein. Materials of XII annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2018. *Biopolym. Cell*. Vol. 34, N 2. P. 163.
11. **Usenko M.O.**, O.B. Gorbatiuk, O.V. Okunev, V.A. Kordium. Production of IL7-His recombinant protein for purification of polyclonal antibodies. XIth Parnas Conference: Young Scientists Forum «Biochemistry and Molecular Biology for Innovative Medicine», Kyiv, Ukraine, 2018. *Ukr. Biochem. J.* Vol. 90, Special Issue. P. 70.
12. **Usenko M.O.**, Gorbatiuk O.B., Okunev O.V., Kordium V.A. Production of IL7-fusion recombinant proteins and their application for affinity chromatography resin creation. 15th Horizons in Molecular Biology: International PhD Student Symposium. Göttingen, Germany, 2018. Abs. book. P.124.
13. Gorbatiuk O., Volynets G., **Usenko M.**, Yarmoluk S. Efficient method for the obtaining of Recombinant Human Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) in *Escherichia coli*. 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, Prague, Czech Republic, 2017. Abs. book. P. 113.
14. **Usenko M.**, Gorbatiuk O., Filipenkova N., Okunev O., Kordium V. Production and characterization of single-chain variable fragment antibodies against interferon beta-1b and interleukin-10. Materials of XI annual Conference of Young Scientists Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, 2017. *Biopolym. Cell*. Vol. 33, N 3. P. 236.

15. **Усенко М.О.**, Горбатюк О.Б., Іродов Д.М., Кордюм В.А. Отримання та характеристика одноланцюгових антитіл специфічних до інтерферону- β 1b та інтерлейкіну-10 людини, злитих з бактерійною лужною фосфатазою. Науково-практична конференція з міжнародною участю Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині, Київ, 2017 р. *Клітинна та органна трансплантологія*. Т. 5, № 2. С. 246.

АНОТАЦІЯ

Усенко М.О. Створення генно-інженерних кон'югатів і їх використання для виявлення та очищення важливих у терапевтичному значенні білків. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 – «Біотехнологія». – Інститут молекулярної біології і генетики Національної Академії Наук України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена розробці методів отримання біфункціональних кон'югатів на основі цільових білків та маркерних молекул в *E.coli*. Було отримано штами-продуценти білків rhIL7-His, rhIL7-CBD та rhIL7-VAPmut. Оптимізовано методи отримання протеїнів у розчинній функціонально-активній формі ренатурацією *in vitro*. Злитий білок rhIL7-CBD, після іммобілізації на мікрокристалічній целюлозі СС31, та rhIL7-His, після іммобілізації на металоафінному сорбенті, було застосовано для отримання поліклональних антитіл, специфічних до інтерлейкіну 7 людини з чистотою понад 95 %. Із застосуванням rhIL7-VAPmut проведено скринінг комбінаторної бібліотеки кДНК варіабельних генів імуноглобулінів. Отримано штами-продуценти *E. coli* злитого білка scFv(IFN β 1b)-VAPmut та рекомбінантного аналога протеїнкінази ASK1 людини. Показано можливість застосування імунокон'югату scFv(IFN β 1b)-VAPmut для виявлення інтерферону бета-1b людини. Визначено умови біосинтезу протеїнкінази ASK1, які забезпечили отримання у препаративній кількості ферменту з функціональною активністю, співставною з комерційно доступними аналогами. Проаналізовано варіабельність індивідуальних реакцій мононуклеарних клітин периферичної крові людини на rhIL7 як важливого прогностичного показника стану імунної системи для подальших імунологічних досліджень.

Ключові слова: рекомбінантні білки, ренатурація, імуносорбенти, антитіла, афінна хроматографія, інтерлейкін 7 людини (rhIL7), одноланцюгові антитіла (scFv), ASK1.

SUMMARY

Usenko M.O. Development of genetically engineered conjugates and their use for detection and purification of the therapeutically important proteins. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

Thesis for obtaining the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, specialty 03.00.20 – Biotechnology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

Present Ph.D. thesis highlights the issues of the development of recombinant proteins based on which it is possible to create affinity chromatography media, to obtain monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of target proteins. Antibodies are widely used in modern fundamental and applied biological and medical diagnostic researches. New approaches are being developed to increase the efficiency of antibody production and purification. To obtain monoclonal antibodies one can use affinity sorbents based on proteins A and G. In the case of obtaining polyclonal antibodies, this approach does not allow to obtain highly specific antibodies that can critically affect the results of enzyme-linked immunosorbent assays. The use of other chromatographic approaches based on the physicochemical properties of antibodies cannot provide the required degree of purity. In turn, purification of antibodies using an antigen immobilized on the sorbent through a partner protein or affinity tag does not require a chemical modification of the matrix and antigen.

Human interleukin-7 (hIL-7) is a therapeutically important immune cytokine that significantly affects the maturation and homeostasis of T and B lymphocytes. It was selected as the primary target to obtain recombinant proteins in our studies. Numerous studies of IL-7 have shown that its level substantially varies in various diseases, such as viral infections (HIV, cytomegalovirus infection), multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, and others. A valuable prognostic indicator for such diseases is the level of one of the chains of the IL-7R receptor sCD127 in blood plasma. Monitoring of IL-7 concentration has predictive value for a detailed study of the mechanisms of its influence on the effectiveness of viral and autoimmune disease treatment. Thus, antibodies with high specificity that distinguish between different isoforms of a single protein are necessary for effective diagnosis.

Therefore, the first part of this study concerns the issues of obtaining recombinant fusion proteins rhIL7-His and rhIL-7-CBD. We have developed their producer strains and have demonstrated the production of target proteins in the bacterial inclusion bodies form in *E. coli* cells. Besides, the methods of their production in soluble functionally active form by *in vitro* renaturation were optimized. The rhIL7-CBD fusion protein, after immobilization on microcrystalline cellulose CC31, and rhIL7-His, after immobilization on a metal-affinity sorbent, were used to obtain polyclonal antibodies with specificity for human interleukin 7, with a purity of more than 95 %. The rhIL-7 activity was tested using peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

We have also performed a study of the effect of IL-7 on PBMC and have shown that the response to IL-7 differs for PBMC from different donors. The individual response of

human PBMC to IL-7 gives valuable information for the immune system state prediction. This information is necessary for a further large-scale study of the T-cell subgroups' response to IL-7 therapy.

Chemical conjugation for obtaining antibody immunoconjugates with enzymes, fluorescent or affinity labels is costly and inefficient. The actual task is to find methods to reduce the cost of immunoconjugates production. Nowadays, it is possible to create analogs of natural antibodies – recombinant antibodies that can be used as selective immunoreagents. A comprehensive approach has been developed for this purpose, which includes methods of creating and selecting large combinatorial cDNA libraries of V-genes of immunoglobulins *in vitro*. This approach allows obtaining specific immunoreagents against a wide range of antigens. Molecules obtained by fusion of recombinant scFv antibodies with enzymes, fluorescent proteins, or affinity tags are promising.

The development of chimeric molecules significantly reduces the cost of immunological studies compared to the use of commercially available monoclonal antibodies chemically conjugated to an enzyme or fluorophore. In this work, a bifunctional scFv(IFN β 1b)–BAP fusion protein was obtained. Such a recombinant analog of monoclonal antibodies as scFv(IFN β 1b) fused with an enzyme protein allows rapid detection of the presence of IFN β -1b and determination of its concentration in ELISA.

Screening of immunoglobulin variable genes is an important step in working with immune combinatorial cDNA libraries. The specificity of the obtained recombinant single-chain antibodies depends on screening efficiency. Therefore, the use of fusion proteins based on the target antigen and marker molecule provides selective isolation of target proteins and reduces the time of the screening. In this work, the gene for bifunctional fusion protein rhIL7-BAPmut, the plasmid vector and a producer strain of *E. coli* were constructed. RhIL7-BAPmut was obtained, the method of its purification and renaturation was optimized. The functional activity of both components of the protein was established and the possibility of its use for screening the combinatorial cDNA library of immunoglobulin variable genes was demonstrated.

In the case of autoimmune diseases, such as multiple sclerosis and rheumatoid arthritis, ASK1 protein kinase is currently being actively investigated. It activates cell signaling pathways in response to various types of stress. Numerous studies have shown the important role of this enzyme in carcinogenesis. ASK1 is also a target for the weakening of neuroinflammation in autoimmune diseases. Low molecular weight ASK1 inhibitors are important compounds for the pharmaceutical industry. Creating a producer of a recombinant protein kinase analog allows obtaining a protein for the search for ASK1 inhibitors.

We have developed protocols for the production of *E. coli* producing strain for the human ASK1 protein kinase. As a result, a recombinant analog of ASK1 was obtained in preparative amounts. Its functional activity has been determined depending on synthesis induction conditions.

Key words: recombinant proteins, renaturation, immunosorbents, antibodies, affinity chromatography, human interleukin 7 (rhIL7), single-chain variable fragment (scFv), ASK1.