

На правах рукописи



Звонова Елизавета Александровна

**РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПЛАТФОРМЫ БИОСИНТЕЗА
ФУНКЦИОНАЛЬНО АКТИВНОЙ ПРОЛОНГИРОВАННОЙ ФОРМЫ
ИНТЕРФЕРОНА БЕТА-1В В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ**

Специальность: 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева

- Научный руководитель:** **Голденкова-Павлова Ирина Васильевна**
доктор биологических наук, доцент, руководитель группы функциональной геномики отдела физиологических и молекулярных механизмов регуляции процессов онтогенеза и адаптации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук
- Официальные оппоненты:** **Ярыгина Елена Игоревна**
доктор биологических наук, старший научный сотрудник, профессор кафедры радиобиологии и вирусологии им. академиков А.Д. Белова и В.Н. Сюрица Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»
Дейнеко Елена Викторовна
доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биоинженерии растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»
- Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «18» апреля 2019 г. в «12-00» часов на заседании диссертационного совета Д 006.027.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), по адресу: 127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42. тел. +7(499) 976-65-44, E- mail: iab@iab.ac.ru; marat131084@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ВНИИСБ.

Автореферат разослан « » февраля 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Халилуев
Марат Рушанович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Рекомбинантный интерферон бета-1b человека представляет собой дегликозилированный белок с внесенной мутацией С17S, экспрессируемый в *E.coli*. Белок обладает иммуномодулирующим и противовирусным (за исключением ВИЧ) действием. В организме человека природный интерферон-бета выполняет функции цитокина и играет важную роль в регуляции различных форм иммунного ответа, в частности в противовирусном ответе и аутоиммунных реакциях. Несмотря на серьезный терапевтический потенциал интерферона бета, есть ряд проблем, затрудняющих его использование. Одна из них – неоптимальные фармакокинетические характеристики препарата. По причине небольшого размера (18,5 кДа), белок крайне быстро выводится из кровотока через почечный клиренс. Следствием этого является потребность в частых введениях препарата. Так препарат Бетаферон® вводят подкожно через день в дозе 8 ММЕ. Это существенно осложняет использование препарата, ухудшает переносимость пациентом и снижает эффективность терапии. В связи с этим высока потребность в получении формы, обладающей увеличенным временем экспозиции препарата в крови.

На сегодняшний день, для улучшения фармакокинетических свойств терапевтических белков предложено и разработано несколько стратегий, основанных как на модификации химической структуры конечной белковой молекулы, так и на уровне кодирующей ДНК. Принципиально можно выделить две группы: стратегии, основанные на увеличении гидродинамического объема молекулы и стратегии, основанные на взаимодействии с FcRn неонатальными рецепторами. Одним из первых подходов для получения улучшенных форм терапевтических белков явилась технология ПЭГилирования, при использовании которой успешно получен целый ряд ПЭГ-белковых препаратов. Однако, на сегодняшний день, показано несколько серьезных ограничений для данной технологии: высокая стоимость, высокий риск накопления ПЭГ при длительных курсах лечения, развитие иммуногенности к ПЭГ. В связи с этим, за последние несколько лет большое развитие получила технология ПЭГ-миметиков. Данная технология сочетает в себе все преимущества ПЭГилирования – увеличение экспозиции препарата в крови, повышение стабильности белка, но при этом лишена ее недостатков: технология получения ПЭГ-миметиков сравнительно

проста в исполнении, а сами белковые полимеры эффективно метаболизируются клетками организма. Несколько иной подход представляет гликозилирование и гипергликозилирование белков. Увеличение периода полувыведения в данном случае основано не только на увеличении гидродинамического объема, но и на появлении отрицательного заряда на поверхности молекулы. Основным ограничением данной технологии является все же небольшое увеличение периода полувыведения (как правило, 2-4 раза), а также риск снижения биологической активности целевого белка. Технологии слияния терапевтического белка с Fc-фрагментом IgG или с альбумином человека основаны на способности последних связываться с FcRn-рецепторами. Получаемые гибридные белки не только обладают большим периодом полувыведения, но и могут применяться в качестве ингаляций, что может повысить удобство их применения. Вместе с тем, в связи с большим распространением FcRn-рецепторов в тканях и органах, существует риск неоптимального биораспределения препарата. Таким образом, в настоящий момент исследователям доступен широкий набор технологических подходов для улучшения фармакокинетических свойств терапевтических белков. Это позволяет не только повысить удобство использования, но зачастую обуславливает принципиальную возможность клинического применения препаратов. Вместе с тем, каждый подход имеет свои ограничения, которые должны приниматься во внимание при выборе стратегии с учетом требований по пролонгирующему эффекту, безопасности и конечным характеристикам белковых препаратов.

Цель исследования: разработка экспериментальных подходов, перспективных для эффективного биосинтеза пролонгированной формы интерферона бета-1b в бактериальной системе экспрессии.

Основные задачи исследования:

1. Сконструировать рекомбинантные гены, в которых ген IFN β 1b слит с последовательностью ПАС, и вектора для экспрессии рекомбинантных генов в бактериях;
2. Подобрать оптимальные условия индуцибельной экспрессии рекомбинантных генов, в том числе и при масштабировании процесса биосинтеза;
3. Разработать методы выделения и очистки функционально активного целевого белка с использованием методов высокоэффективной жидкостной хроматографии;
4. Провести сравнительный анализ физико-химических свойств рекомбинантного (IFN β 1b-PAS) и нативного IFN β 1b;

5. Провести сравнительный анализ функциональной активности рекомбинантного (IFN β 1b-PAS) и нативного IFN β 1b *in vitro*;

6. Провести сравнительное исследование фармакокинетических свойств рекомбинантного (IFN β -PAS) и нативного IFN β *in vivo*.

Научная новизна. Впервые разработаны экспериментальные подходы для эффективного биосинтеза в *E.coli* рекомбинантного интерферона бета-1b, слитого с неструктурированным белковым биополимером ПАС. Показано, что добавление ПАС-полипептида размером 200 аминокислот приводит к существенному увеличению гидродинамического радиуса молекулы, улучшает его стабильность и фармакокинетические свойства, не оказывая серьезного влияния на биологическую активность *in vitro*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Созданы экспрессионные конструкции для получения в клетках *E.coli* двух вариантов IFN β -1b, слитого с белковой последовательностью ПАС размером 200 аминокислот. Серия экспериментов по экспрессии целевых белков в штаммах *E.coli* позволила отобрать оптимальный вариант присоединения ПАС полимера и отработать оптимальные условия культивации штамма-продуцента IFN β 1b-PAS, а также разработать схему выделения, позволяющую получить функционально-активный белок. Эксперименты по исследованию физико-химических свойств целевого белка, биологической активности *in vitro* и фармакокинетики в модельных животных подтверждают перспективность использования технологий на основе ПЭГ-миметиков для получения улучшенных препаратов на основе интерферона бета-1b. Предложенная схема культивации и выделения IFN β 1b-PAS может послужить основой для разработки промышленного регламента производства лекарственного препарата интерферона бета пролонгированного действия.

Методология и методы диссертационного исследования. Экспериментальная работа проводилась на хорошо изученном рекомбинантном белке: интерфероне бета-1b человека. Методологическую основу данного исследования составил системный подход с применением методов генетической инженерии, молекулярной биологии, биохимии, биотехнологии, статистики, а также анализ данных отечественной и зарубежной литературы. При проведении исследования и изложения материала применены общенаучные методы: теоретический и методологический анализ литературных источников, экспериментальные методы исследования и сравнительный анализ полученных

данных. Используемые методы и статистическая обработка экспериментального материала позволили обеспечить объективность полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Создание экспрессионных конструкций для получения в клетках *E.coli* IFN β 1b-PAS - модифицированной ПАС-последовательностью формы рекомбинантного интерферона бета-1b;
2. Разработка эффективных методов культивации и выделения IFN β 1b-PAS, позволяющие получить функционально-активный белок с чистотой более 90% и низким содержанием эндотоксинов;
3. Рекомбинантный белок IFN β 1b-PAS характеризуется существенным увеличением гидродинамического радиуса и стабильностью рекомбинантного интерферона бета-1b, без снижения его биологической активности *in vitro*, улучшенными фармакокинетическими свойствами, включая двукратное увеличение периода полувыведения;
4. Разработанные методы культивации и выделения IFN β 1b-PAS могут послужить основой для разработки промышленного регламента производства лекарственного препарата интерферона бета пролонгированного действия.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность полученных данных подтверждается достаточным количеством воспроизводимых результатов, их статистической обработкой и публикацией результатов в рецензируемых журналах.

Результаты исследований представлены на конгрессе FEBS 2013 (Санкт Петербург, 2013), на молодежном научном форуме «Open Science 2016» (Москва, 2016), на XXX зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2018), на 18-й научной конференции молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (г. Москва, 2018).

Личный вклад автора в проведенные исследования. Личное участие автора состоит в непосредственном планировании и выполнении экспериментов, анализе полученных данных и их оформлении для публикации. Автор самостоятельно проводил все работы, связанные с созданием генно-инженерных конструкций, получением штаммов-продуцентов и отработкой условий их

культивации. Анализ полученных результатов автор проводил совместно с научным руководителем диссертационной работы.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа «Разработка биотехнологической платформы биосинтеза функционально активной пролонгированной формы интерферона бета-1b в бактериальной системе» соответствует формуле специальности 03.01.06 — Биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и охватывает исследования в области технологии рекомбинантных ДНК, а также разработки методов выращивания микроорганизмов-продуцентов для направленного биосинтеза биологически активных соединений, в частности, рекомбинантного интерферона бета-1b, его выделения, фракционирования, очистки, и характеристики. В ходе диссертационного исследования сконструирована модифицированная ПАС-последовательностью форма рекомбинантного интерферона бета-1b (IFN β 1b-PAS), разработаны эффективные методы его культивации и выделения, позволяющие получить функционально-активный белок с чистотой более 90% и низким содержанием эндотоксинов, который характеризуется существенным увеличением гидродинамического радиуса и стабильностью рекомбинантного интерферона бета-1b, без снижения его биологической активности *in vitro*, улучшенными фармакокинетическими свойствами, включая двукратное увеличение периода полувыведения.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ в том числе 3 статьи в журналах, рекомендуемых ВАК МОН РФ, индексируемых в базе данных Web of Science и/или Scopus. Результаты исследования представлены в материалах 4 отечественных и международных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследований, результатов исследований и их обсуждения, выводов и списка используемой литературы. Работа изложена на 128 страницах машинописного текста, содержит 8 таблиц, 20 рисунков и приложения. Библиографический список включает 182 источника, из них 179 на иностранном языке.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Компьютерное моделирование целевых молекул. Третичная структура IFN- β 1b-PAS и PAS-IFN- β 1b предсказана с использованием сервера I-TASSER; растворимость белка предсказана с использованием следующих инструментов: Espresso (Estimation of protein Expression and Solution), PROSOII, Recombinant Protein Solubility Prediction и SPpred, Soluble Protein prediction. Экспрессия белка *Escherichia coli* предсказана с использованием Espresso. 3D-структуры белков сконструированы в YASARA (www.yasara.org) и POVRay (www.povray.org). Программное обеспечение, использованное для расчетов, является бесплатным и доступно онлайн.

Получение генно-инженерных конструкций. На основе анализа *in silico*, сконструировано два варианта модифицированного IFN β 1b с присоединением PAS-полипептида в N- и C-концевую область целевого белка. Для конструирования целевых плазмид pETm-PAS-IFN β 1b и pETm-IFN β 1b-PAS использованы стандартные методы молекулярной биологии. В качестве основы был использован вектор pET32+ (Novagen, США). Последовательность IFN β 1b (Genbank ABS89222.1) синтезирована с учетом оптимизации кодонного состава для экспрессии в *E.coli*. Последовательность кДНК, кодирующая PAS размером 200 аминокислот, предоставлена XL-Protein GmbH (ФРГ).

Разработка условий экспрессии целевого белка. В экспериментах использованы бактериальные штаммы BL21(DE3), Origami(DE3) (Sigma Aldrich, ФРГ) и Shuffle(T7) (NEB, Великобритания), трансформированные целевыми плазмидами. Культуры стандартно растили в культуральных колбах на среде LB с добавлением ампициллина 100 мг/л. Экспрессию целевых белков индуцировали добавлением 0,4 mM ИПТГ. Для определения локализации целевого белка бактериальную биомассу подвергали фракционированию, в результате получали периплазматическую, растворимую цитоплазматическую и нерастворимую (тельца включения) фракции.

Выделение целевого белка проводили из телец включения с последующей их солюбилизацией и рефолдингом. Препарат целевого белка после ренатурации очищали путем комбинации методов ВЭЖХ: tandemная хроматография на носителе Q-SP Sepharose (GE Healthcare, США), на сорбенте Zn-IMAC-Sepharose (GE Healthcare, США) и гель-эксклюзионная хроматография на Superdex 200 (GE

Healthcare, США). Очищенный белок концентрировали путем ультрафильтрации с использованием Amicon Ultra centrifugal filter units (Millipore, США) до концентрации 1 мг/мл. Содержание эндотоксинов в образцах анализировали с помощью набора Endosafe-PTS (Charles River Laboratories, США), используя картриджи с чувствительностью 0.03 ЕЭ/мл (Charles River Laboratories, США).

Физико-химическая характеристика целевого белка. ДСН-ПААГ проводили в 12% акриламидном геле с окраской Кумасси R-250 (Sigma Aldrich, США). Концентрацию белка определяли по Бредфорд, используя сывороточный альбумин быка для построения калибровочной кривой. Для Вестерн блот-гибридизации в качестве первичных антител использовали антитела козы anti-huIFN- β (ab10740, Abcam, Великобритания) и в качестве вторичных антител - антитела кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, к иммуноглобулинам козы (ab6741, Abcam, Великобритания). После промывки, PVDF мембрану (Bio-Rad, США) окрашивали ECL (GE, США). Хемилюминесценцию детектировали на Fusion FX5 (Vilber Lourmat, Франция). Гель-эксклюзионную хроматографию проводили на носителе TSK gel G3000SWXL (Sigma Aldrich, ФРГ) с использованием системы ВЭЖХ Alliance e2695 (Waters, США), с детектором UV/Visible Detector 2489 (Waters, США). В качестве подвижной фазы использован PBS (Sigma Aldrich, ФРГ). Молекулярную массу целевого белка определяли масс-спектрометрически методом nanoLC-MS с ионизацией в электроспрее с использованием масс-спектрометра Agilent 6550 QTOF с nanoHPLC и капиллярной системой 1260 Infinity (Agilent, США).

Анализ биологической активности *in vitro* проводили при использовании клеточной линии лимфомы Биркитт человека (Daudi, ATCC# CCL-213, ATCC, США). Кратко, клетки рассеивали в планшеты в концентрации 10000 клеток/лунку, добавляли исследуемые образцы или стандарт интерферона бета (NIBSC code 00/574, NIBSC, США), далее растили 102 часа, после чего добавляли краситель ПрестоБлю (Thermo Fisher Scientific, США) и оценивали интенсивность флуоресценции с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan Spectrum (Thermo Fisher Scientific, США), используя длины волн 560нм (возб.) и 590нм (исп.). Полученные данные концентрационно-зависимого падения сигнала флуоресценции использовали для подсчета антипролиферативной активности исследуемых образцов в сравнении со стандартом.

Исследование фармакокинетики целевого белка. Исследования проводили на SPF (Specific-pathogen-free) крысах-самцах Sprague-Dawley (по 5 животных в группе) в возрасте 10 недель массой 561 ± 20 г. Перед введением образец IFN β 1b-PAS200 разводили до концентрации 0,3 мг/мл, а препарат-сравнения «Инфибета» (IFN β 1b, АО Генериум) – восстанавливали, согласно инструкции производителя, после чего вводили однократно в эквимольной дозе. Забор проб крови осуществляли из хвостовой вены через 5, 15, 30 минут и через 1, 2, 3, 4, 8 и 24 часа после введения. Зависимость концентрации соединений от времени оценивали в плазме крови, которую получали центрифугированием при 600 g в течение 15 мин. Концентрацию целевого белка в образцах определяли методом ИФА при использовании набора VeriKine™ human IFN β ELISA kit (Thermo Fisher Scientific, США), согласно рекомендациям производителя.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты проведены как минимум в трех биологических и пяти аналитических повторностях. При анализе данных фармакокинетических исследований для каждой временной точки рассчитывались медианные внутригрупповые значения концентрации препарата (внутригрупповой разброс значений оценивался по межквартильному расстоянию); фармакокинетические параметры рассчитаны с использованием ПО PKSolver на базе MS Excel 2010 на основе некомпартментной модели распределения.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Гибридный белок, с присоединением ПАС-полипептида размером 200 аминокислот в С-концевую область интерферона бета-1b, может быть эффективно наработан в штаммах *E.coli*

При планировании дизайна модификации рекомбинантного интерферона бета-1b построены 3-D модели молекул с использованием сервера I-TASSER (Yang J et al, 2015) и 1AU1 в качестве матрицы. Анализ 3D структуры молекулы IFN- β 1b, показал, что N- и С-концевые области белка сближены (рис.1, А), и доступны для добавления ПАС-полипептида. Для построения ПАСилированных вариантов молекулы использована последовательность, содержащая 200 остатков Pro, Ala, и Ser (Schlapschy et al, 2013). Моделирование 3D структур последовательностей слитых белков PAS-IFN β 1b и IFN β 1b-PAS, у которых ПАС полипептид локализован в N- и С-концевой области, соответственно, показало возможность формирования молекул, в целом, сохраняющих структурные мотивы нативного IFN β -1b (рис. 1, Б и В).

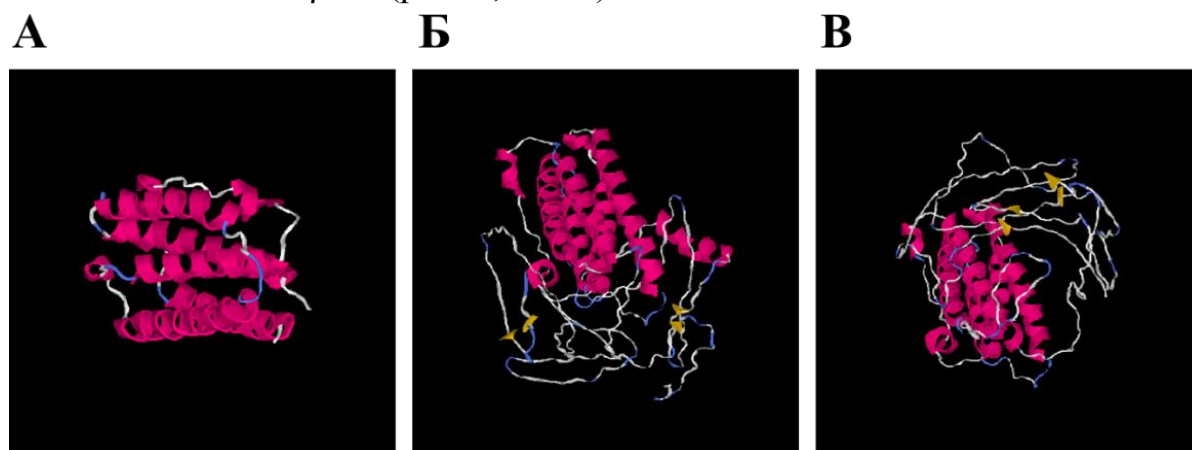


Рисунок 1. Предсказанные 3D структуры нативного IFN β 1b (А), PAS-IFN β 1b (Б) и IFN β 1b-PAS (В), полученные с использованием сервера I-TASSER.

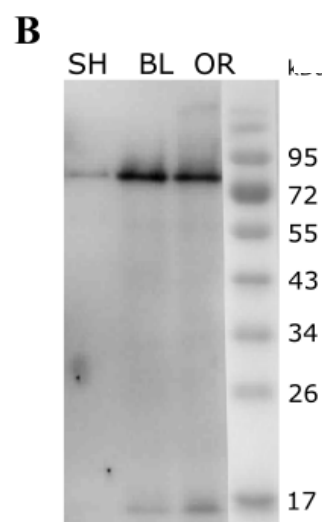
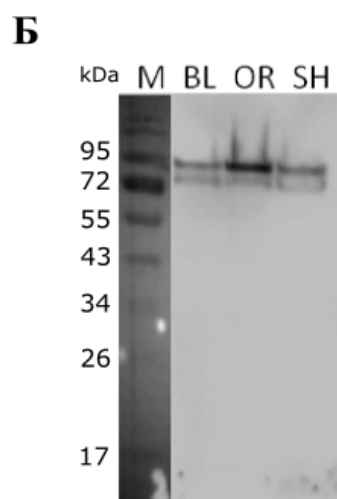
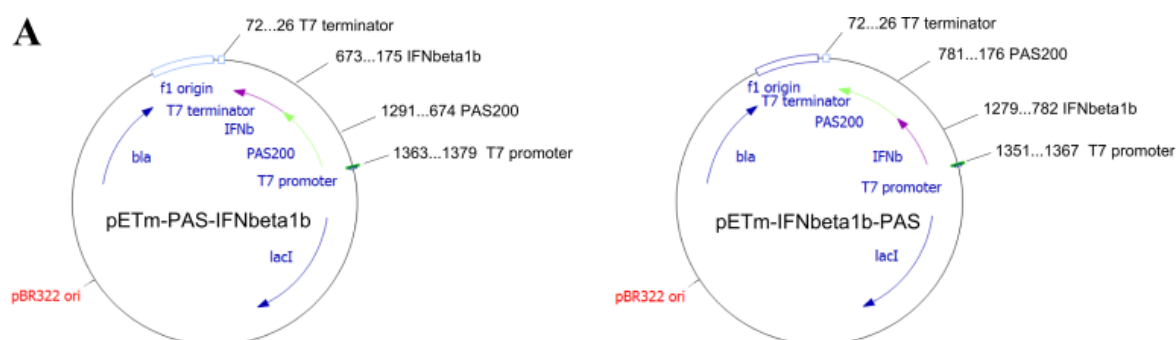
На основании проведенного анализа, получены две генно-инженерные конструкции (ГИК) для экспрессии модифицированного IFN β 1b с присоединением ПАС-полипептида размером 200 аминокислот в N- и С-концевую область целевой молекулы, соответственно рЕТm-PAS-IFN β 1b и рЕТm-IFN β 1b-PAS (рис.2, А).

Первоначально, для экспрессии PAS-IFN β 1b и IFN β 1b-PAS в *E.coli* апробировано три штамма, которые широко применяются для экспрессии

рекомбинантных белков под контролем промотора T7 - BL21(DE3), Origami(DE3) и SHuffle T7. Следует отметить, что выбранные штаммы признаны эффективными для продукции в *E. coli* рекомбинантных интерферонов, в том числе и для IFN β -1b. Вестерн блот-гибридизация с использованием моноклональных антител, специфичных к IFN β -1b человека, позволила детектировать накопление гибридных PAS-IFN β 1b и IFN β 1b-PAS полипептидов в бактериальных лизатах (Рис.2, Б и В). Необходимо отметить, что для ПАСилированных вариантов IFN β -1b характерно изменение электрофоретической подвижности, вызванное слабым взаимодействием гидрофильной ПАС-последовательности с ДСН. За счет этого белок мигрирует в ДСН-ПААГ значительно медленней, чем ожидается, исходя из его расчетной молярной массы: кажущийся размер белка соответствует ~75 кДа, а теоретически рассчитанная молярная масса составляет 36,6 кДа. Данный феномен характерен, в том числе, и для других гибридных белков, слитых с ПАС-последовательностью (Skerra et al., 2007, Mandler et al., 2015).

Сравнение уровня продукции PAS-IFN β 1b и IFN β 1b-PAS в разных штаммах показало следующее: (i) во всех штаммах продукция PAS-IFN β 1b значительно ниже, чем IFN β 1b-PAS (рис.2, Г). Следует отметить, что белковые продукты PAS-IFN β 1b выявлены исключительно методом вестерн блот анализа, который характеризуется высокой чувствительностью, анализ методом электрофореза в ДСН-ПААГ с окраской Кумасси бриллиантовым синим не позволил выявить накопление целевого продукта; (ii) в штамме Origami (DE3) продукция PAS-IFN β 1b достоверно выше, по сравнению со штаммами BL21 (DE3) и SHuffle T7 (рис.2, Б и Г); (iii) штаммы BL21(DE3) и Origami(DE3), но не SHuffle T7, обеспечивают высокий уровень экспрессии IFN β 1b-PAS (рис.2, В и Г).

Мы сделали попытки увеличить уровень продукции PAS-IFN β 1b в штамме Origami(DE3) за счет варьирования состава питательной среды, времени индукции и температуры инкубации, однако ни один из подходов не позволил достоверно повысить продукцию целевого белка PAS-IFN β 1b. В связи с этим, для дальнейшей работы было решено отобрать вариант IFN β 1b-PAS как наиболее перспективный.



Г

Экспрессия ПАСилированных вариантов IFN β 1b*			
	BL	OR	SH
PAS-IFN	18 $\pm$ 2,1%	29 $\pm$ 2,3%	17 $\pm$ 2,2%
IFN-PAS	100 $\pm$ 2,9%	80 $\pm$ 2,6%	25 $\pm$ 2,3%

Рисунок 2. Генно-инженерные конструкции двух вариантов ПАСилированного IFN β -1b и их экспрессия в штаммах BL21(DE3) (BL), Origami2(DE3) (OR) и Shuffle(T7) (SH). А – схематическое изображение экспрессионных векторов pETm-PASIFN β 1b (PAS-IFN) и pETm-IFN β 1b-PAS (IFN-PAS); Б и В – данные вестерн блот анализа экспрессии PAS-IFN (нанесено по 25 мкг клеточных лизатов на лунку) и IFN-PAS (нанесено по 1 мкг клеточных лизатов на лунку); Г – сравнение уровня экспрессии PAS-IFN и IFN-PAS в различных штаммах *E.coli* (определены по уровню сигнала, полученного с использованием моноклональных антител козы к IFN β -1b человека; за 100% принято максимальное накопление IFN β 1b-PAS); * - представлены усредненные значения уровня экспрессии (%) по четырем экспериментам со стандартным отклонением (%).

Температура культивации является ключевой характеристикой, влияющей на эффективность экспрессии рекомбинантных белков в бактериальных культурах. Стандартно, штаммы *E. coli* культивируют при 37°C, однако данная

температура не является оптимальной для экспрессии ПАСилированных белков (Schlapschy M et al, 2013). В связи с этим, для отработки условий наиболее эффективной продукции IFN β 1b-PAS штаммы BL21(DE3) и Origami2(DE3), трансформированные рЕТm-IFN β 1b-PAS, растили при разных температурах: 30°C, 25°C и 22°C и оценивали продукцию целевого белка в разных клеточных фракциях (периплазма, растворимая и нерастворимая). Для этого переплазматическая фракция, а также растворимую и нерастворимую фракции клеточных лизатов проанализировали методами электрофореза в ДСН ПААГ с окраской Кумасси бриллиантовым синим и вестерн блот для определения процентного распределения экспрессируемого IFN β 1b-PAS белка в различных компартментах клетки.

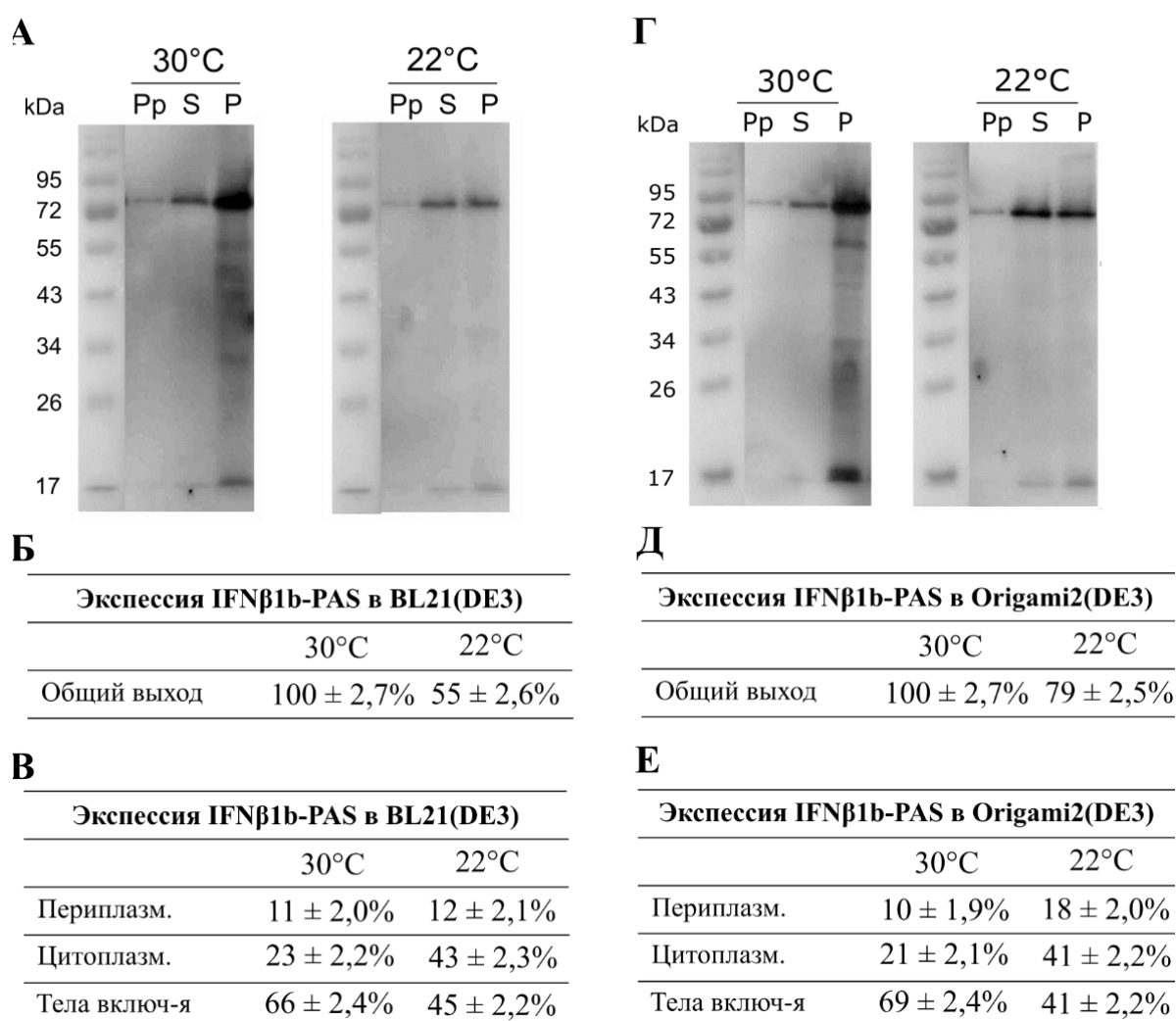


Рисунок 3. Накопление IFN β 1b-PAS в различных фракциях *E.coli* при различных температурных условиях. А – данные вестерн блот образцов периплазматической (Pp), цитоплазматической (растворимой; S) и нерастворимой (P) фракций, полученные в результате экспрессии IFN β 1b-PAS в штамме BL21(DE3) при 22° и 30° С; Б – уровень экспрессии IFN β 1b-

PAS в штамме BL21(DE3) при экспрессии при 22° и 30°C (определен по уровню сигнала, полученного с использованием моноклональных антител козы к IFN β -1b человека; за 100% принято максимальное накопление IFN β 1b-PAS); В – накопление IFN β 1b-PAS в различных фракциях BL21(DE3); Г-Е – аналогично для Origami2(DE3).

Как показано на рисунке 3, при 30°C основная фракция IFN β 1b-PAS в BL21(DE3) продуцируется в нерастворимой форме (рис.3, А). Мы определили, что от 66% до 45% слитого белка IFN β 1b-PAS экспрессируется в нерастворимой фракции, от 23% до 43% - в растворимой цитоплазматической фракции и только от 11% до 14% - в периплазме, в зависимости от температуры инкубации (рис.3, Б). Следует отметить, что снижение температуры инкубации до 25°C или 22°C приводит к увеличению процента накопления белка в растворимой фракции (рис.3, В), но при этом снижается общий выход IFN β 1b-PAS (рис.3, Б).

Варьирование температурой инкубации имеет меньший эффект на экспрессию IFN β 1b-PAS продуцируемого в штамме Origami2(DE3) (рис.3, Г) и сравнимый уровень экспрессируемого белка продуцируется при 30°C и 22°C (рис.3, Д). Однако, отмечено, что при снижении температуры увеличивается выход IFN β 1b-PAS в периплазматической фракции с 10% до 18% (рис.3, Е).

Сравнение уровня продукции IFN β 1b-PAS в штаммах BL21(DE3) и Origami2(DE3) показало, что наиболее эффективная продукция IFN β 1b-PAS проходит в штамме BL21(DE3) при 30°C инкубации (рис.3, А).

Используя наработанную биомассу, была разработана методика выделения и очистки IFN β 1b-PAS включала получение и солюбилизацию телец включения из клеточных лизатов, рефолдинг и последующую очистку целевого белка за счет комбинации методов хроматографии.

Следует отметить, что ПАСилированный IFN β -1b значительно отличается по физико-химическим характеристикам от нативного интерферона, что не позволило применить при его очистке методы хроматографии, используемые для очистки немодифицированного рекомбинантного IFN β -1b. В частности, отмечено отсутствие заметной сорбции белка на Blue Sepharose, на макропористых стеклах и Butyl Sepharose даже при использовании разных вариантов солюбилизирующих растворов и рефолдинга. Максимальная сорбция целевого белка IFN β 1b-PAS отмечена на SP Sepharose с предколонкой Q Sepharose в ацетатном буфере (pH 5,0) в присутствии 30-40 mM NaCl. Известно, что эффективное удаление большинства бактериальных эндотоксинов достигается на стадии металлхелатной

хроматографии при промывке сорбента со связанным целевым белком буфером, содержащим тритон X-100. Для этого, проведена хроматография на Zn-IMAC-Sepharese. А последующая гель-фильтрация на Superdex 200 позволила удалить высокомолекулярные агрегаты, минорные низкомолекулярные примеси и получить очищенный препарат белка в PBS буфере. На рисунке 4А показан электрофоретический профиль образца IFN β 1b-PAS после очистки. Показано, что очищенный препарат белка IFN β 1b-PAS200 характеризуется более, чем 90% чистотой. При этом содержание эндотоксинов в очищенном препарате по данным системы Endosafe-PTS с использованием картриджей чувствительностью 0,03 EU/мл составило лишь 4 EU/мг белка, что является допустимым для проведения фармакокинетических исследований IFN β 1b *in vivo* (Mark and Lin, 1990; Basu et al., 2006). Выход очищенного IFN β 1b-PAS составил 789 мкг на 1 г телец включения, как определено методом Bradford.

2. Присоединение ПАС-полипептида к IFN β 1b приводит к значительному увеличению гидродинамического радиуса финальной молекулы

Как отмечено ранее, для IFN β 1b-PAS характерно изменение электрофоретической подвижности. Белок мигрирует значительно медленней, чем ожидается, исходя из его расчетной молярной массы (рис.4А): кажущийся размер белка соответствует ~75 кДа, а расчетная молярная масса составляет 36.6 кДа. Похожие свойства описаны и для других ПАСилированных белков: интерферона альфа (IFN α 2b), гормона роста и лептина. Причиной этого является слабое взаимодействие гидрофильного полимера ПАС с ДСН (Schlapschy M et al, 2013). Дальнейший анализ рекомбинантного IFN β 1b-PAS методом аналитической гель-эксклюзионной хроматографии (SEC) на носителе TSKgel G3000 показал существенное увеличение гидродинамического радиуса молекулы. Время удерживания основного пика IFN β 1b-PAS соответствует времени удерживания глобулярного белка с молекулярной массой около 140 кДа (рис.4, Б).

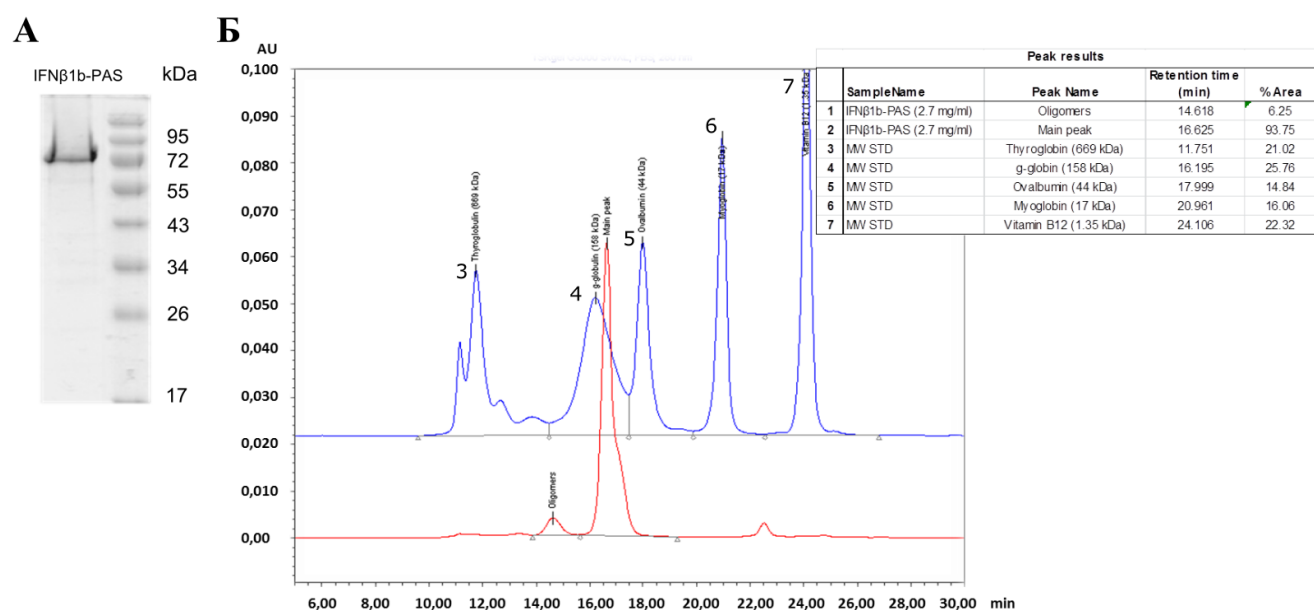


Рисунок 4. Физико-химическая характеристика IFN β 1b-PAS методами ПААГ-электрофореза с окраской Куммасси бриллиантовым синим (А) и гель-эксклюзионной хроматографии на носителе TSK gel (Б).

Одновременно с этим, корректность молекулярной массы и монодисперсный состав белка подтверждены хромото-масс спектрометрическим методом nanoLC-MS (рис.5): молекулярная масса составила 36599 Да.

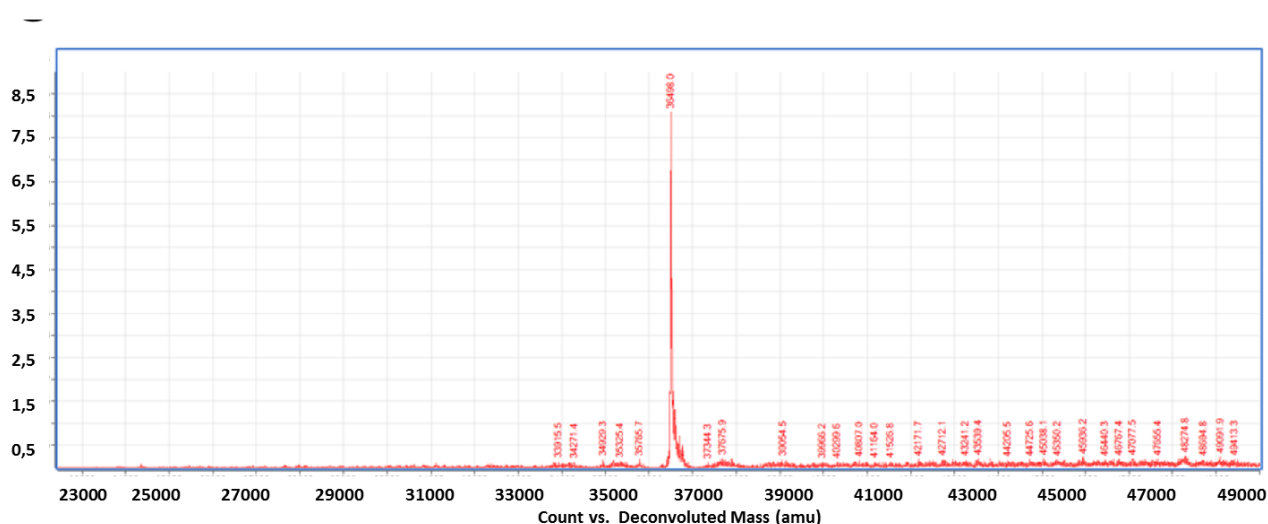


Рисунок 5. Определение молекулярной массы образца очищенного IFN β 1b-PAS методом nanoLC-MS.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что присоединение PAS200-фрагмента к IFN β 1b значительно увеличивает гидродинамический радиус белковой молекулы.

3. IFN β 1b-PAS сохраняет биологическую активность *in vitro*, в том числе и при длительном хранении

Оценка биологической активности IFN β 1b-PAS *in vitro* проведена в антипролиферативном дозозависимом тесте с использованием клеточной линии лимфомы Биркитт человека (Daudi). В данном эксперименте была определена зависимость ингибирования роста клеток от концентрации IFN β 1b-PAS, по сравнению с коммерческим препаратом IFN β -1b (Betaferon, Bayer Schering Pharma AG, ФРГ), который использовали как стандарт для количественной оценки биологической активности IFN β 1b-PAS (рис.6). Кривые зависимости ингибирования роста клеток от концентрации образцов использовали для расчета IC50 (концентрация образца, ингибирующая рост 50% клеток). Как видно из полученных данных, IFN β 1b-PAS вызывает 50% ингибирование роста клеток в концентрации 0,271 нг/мл. Примечательно, полученное значение IC50 в два раза ниже, в сравнении с коммерческим препаратом IFN β -1b (0,524 нг/мл). Полученные данные свидетельствуют об отсутствии значимого негативного влияния PAS-мотива на биологическую активность IFN β 1b.

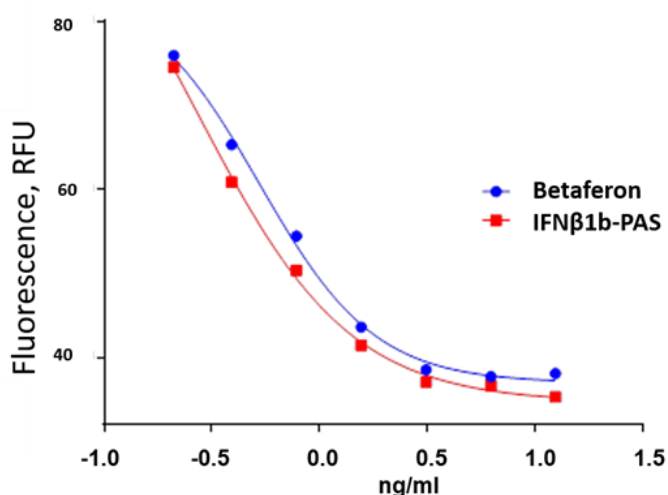


Рисунок 6. Исследование антипролиферативной биологической активности IFN β 1b-PAS в сравнении с немодифицированным интерфероном бета-1b (Бетаферон®) *in vitro*.

	Betaferon	IFN β 1b-PAS
IC50	0.5240	0.2710
R square	0.9972	0.9982

IFN β -1b - гидрофобный белок, который, как и ряд других гидрофобных белков, подвержен агрегации в растворе (Lin LS et al, 1996). В связи с этим готовые лекарственные формы препаратов на основе интерферона- β (Бетаферон, Авонекс, Ребиф) содержат сывороточный альбумин человека для поддержания стабильности. В сравнительных исследованиях нативного и ПАСилированного IFN β -1b отмечено, что нативный IFN β -1b в буфере PBS в отсутствии ПАВ, такого как Zwittergent 3-14, быстро осаждается в виде нерастворимых агрегатов, в то время как IFN β 1b-PAS сохраняет растворимость. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что IFN β 1b-PAS может проявлять высокую стабильность и растворимость, в отличие от нативного IFN β -1b. Следует отметить, что в сравнительных исследованиях экспрессии IFN β 1b-PAS варианта также отмечен высокий процент продукции IFN β 1b-PAS в растворимой фракции при экспрессии в *E.coli* (рис. 3).

Для оценки стабильности IFN β 1b-PAS мы провели сравнительные исследования двух образцов IFN β 1b-PAS (после хранения в PBS буфере, pH 7.4 в течение 22 месяцев при -20°C и сразу же после экспрессии, выделения и очистки из рекомбинантного штамма BL21(DE3) методом гель – фильтрации на Superdex 200 16/600 (рис. 7, А), а также оценили его биологическую активность *in vitro* (рис. 7, Б). Обнаружено, что образцы IFN β 1b-PAS до и после хранения имеют сходный хроматографический профиль и сохраняют первоначальную биологическую активность. Так, IFN β 1b-PAS после хранения индуцирует 50% ингибирование роста клеток в концентрации 0,3350 нг/мл, в то время как аналогичное значение для международного стандарта IFN β -1b (NIBSC 00/574) составляет 0,6413 нг/мл (рис. 7, Б).

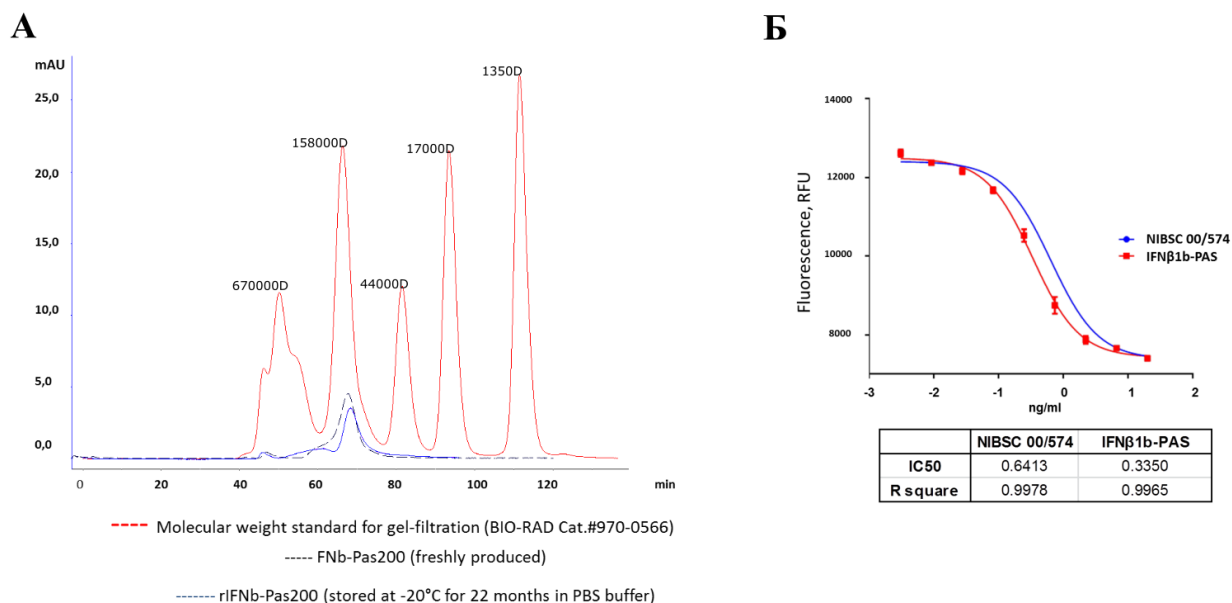


Рисунок 7. Анализ стабильности IFNβ1b-PAS при длительном хранении при использовании метода аналитической гель-экслюзионной хроматографии (А) и в результате определения биологической активности *in vitro* (Б).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ПАС200-полипептид в составе IFNβ1b-PAS не оказывает негативного влияния на функциональную активность интерферона бета и оказывает стабилизирующий эффект на структуру целевого белка, значительно расширяя возможности для его формуляции и хранения.

4. Добавление ПАС-полипептида приводит к улучшению фармакокинетических свойств IFNβ1b *in vivo*

Первоначально, для оценки основных фармакокинетических параметров проведено сравнительное исследование двух рекомбинантных препаратов: IFNβ-1b (Инфибета, АО «Генериум») и IFNβ1b-PAS200 при их внутривенном введении. Медианные фармакокинетические профили зависимости концентрации препарата в плазме крови крыс от времени представлены на рисунке 8.

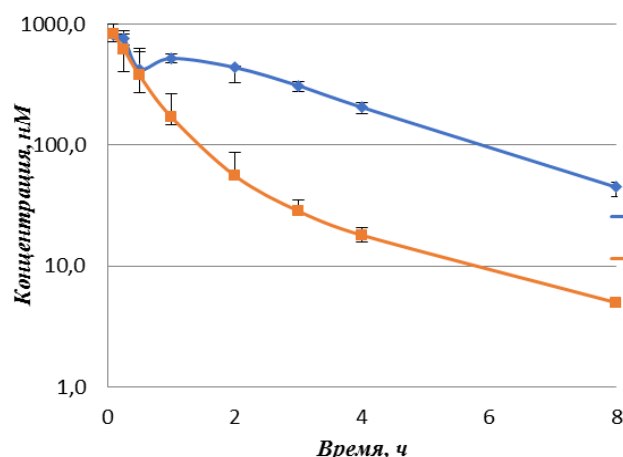


Рисунок 8. Динамика изменения концентрации препарата IFNβ1b-PAS200 (1) и Инфибета (2) в плазме крови крыс при внутривенном введении (график построен по медианным значениям в полулогарифмической форме; качество погрешности указан межквартильные интервалы).

На основании полученных данных рассчитаны основные фармакокинетические параметры с использованием модели некомпартментного распределения по медианным значениям концентрации (табл. 1), включающие: константу элиминации (K_{el}); период полувыведения ($t_{1/2}$); максимальную концентрацию препаратов в системном кровотоке (C_{max}); площадь под кривой от времени дозирования до последней измеряемой концентрации (AUC_{last}) и с экстраполяцией к бесконечности (AUC_{inf}), а также системный клиренс (Cl).

Таблица 1. Фармакокинетические параметры IFNβ1b-PAS200 и Инфибета при однократном внутривенном введении модельным животным.

Параметр	Единицы измерения	IFNβ-PAS200	Инфибета
K_{el}	1/ч	0,341	0,643
$t_{1/2}$	ч	2,03	1,08
C_{max}	нМ	808	820
AUC_{last}	нМ×ч	2192	679
AUC_{inf}	нМ×ч	2324	687
AUC_{last}/AUC_{inf}	%	94,3%	98,9%
Cl	(л/ч)/кг	0,0071	0,0291

Как следует из данных, представленных в таблице 1, добавление ПАС-последовательности достоверно увеличивает экспозицию целевого белка в системном кровотоке, а именно, приводит к 2-кратному увеличению периода полувыведения ($t_{1/2}$) с 1,08ч до 2,03ч, к 3-кратному увеличению AUC_{last} – с 679 нМ×ч до 2192 нМ×ч, а также к 4-кратному уменьшению системного клиренса (Cl) с 0,0291 (л/ч)/кг до 0,0071 (л/ч)/кг. Следует отметить, что полученные значения для немодифицированного интерферона бета согласуются с данными литературы

(Basu et al., 2006). Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что ПАС фрагмент позволяет значительно улучшить фармакокинетические свойства интерферона бета *in vivo*.

Сравнительное исследование фармакокинетики IFN β 1b-PAS200 и препарата рекомбинантного IFN β 1b (Инфибета) при однократном подкожном и внутримышечном введении в организм крыс.

Стандартным способом введения препаратов на основе IFN β -1b является внутримышечный (например, Ребиф) или подкожный (например, Бетаферон). Ранее методом аналитической гель-эксклюзионной хроматографии (SEC) на носителе TSKgel G3000, мы показали, что время удерживания основного пика IFN β 1b-PAS соответствует времени удерживания глобулярного белка с молекулярной массой около 140 кДа (см. рис. 4, Б). Эти данные свидетельствуют о том, что добавление ПАС-последовательности к IFN β 1b приводит к увеличению гидродинамического радиуса молекулы, что, в свою очередь, может повлиять на фармакокинетические параметры, в том числе и на биодоступность препарата при подкожном и внутримышечном введении. Для оценки биодоступности IFN β 1b-PAS200 при внутримышечном и подкожном способах введения проведено пилотное сравнительное исследование с использованием препарата Инфибета в качестве препарата сравнения.

В результате проведенного исследования были получены усредненные фармакокинетические профили зависимости концентрации препаратов в плазме крови крыс от времени, представленные на рисунке 9. На основе полученных данных были рассчитаны фармакокинетические параметры, включающие максимальную концентрацию препаратов в системном кровотоке (C_{max}), время достижения максимальной концентрации (T_{max}), площадь под кривой от времени дозирования до последней измеряемой концентрации (AUC_{last}). При экстравазальном (внутримышечном и подкожном) введении препаратов также вычислялась абсолютная биодоступность (F), равная отношению значений AUC_{last} при экстравазальном и внутривенном введении, соответственно (Таб. 2 и 3).

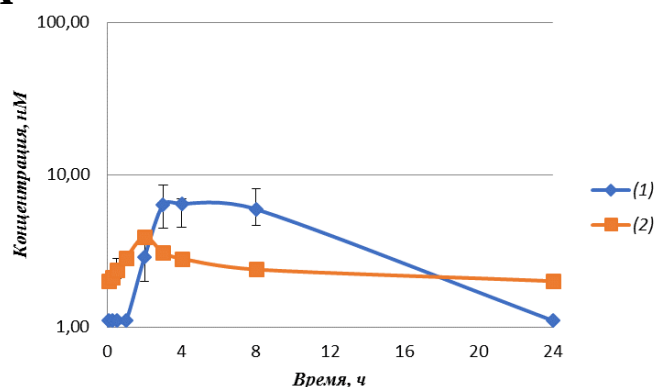
А

Рисунок 9. Динамика изменения концентрации препарата IFNβ1b-PAS200 (1) и Инфибета (2) в плазме крови крыс при подкожном (А) и внутримышечном (В) введении (график построен по медианным значениям в полулогарифмической форме; в качестве погрешности указаны межквартильные интервалы).

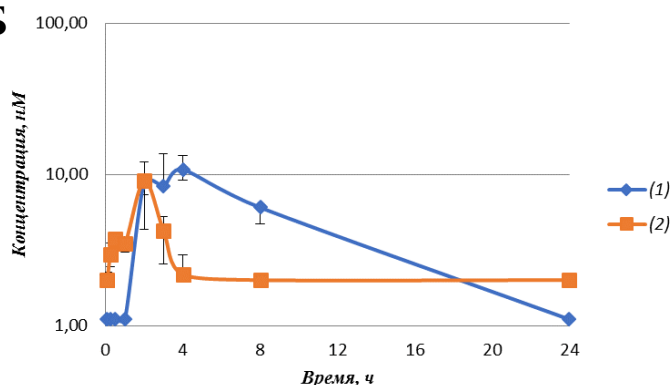
Б

Таблица 2. Фармакокинетические параметры препаратов IFNβ1b-PAS200 и Инфибета при однократном подкожном введении в организм крыс.

Параметр	Единицы измерения	IFNβ-PAS200	Инфибета
Tmax	ч	4	2
Cmax	нМ	6,44	3,91
AUClast	нМ×ч	95	22
F	%	4,3	3,3

Таблица 3. Фармакокинетические параметры препаратов IFNβ1b-PAS200 и Инфибета при однократном внутримышечном введении в организм крыс.

Параметр	Единицы измерения	IFNβ-PAS200	Инфибета
Tmax	ч	4	2
Cmax	нМ	10,77	9,05
AUClast	нМ×ч	115	19
F	%	5,2	2,8

При подкожном введении препаратов максимальная концентрация IFNβ1b-PAS200 наблюдалась через 4 ч после введения и составила 6,44 нМ, для Инфибета - через 2 ч и составила 3,91 нМ. При внутримышечном введении

препаратов максимальная концентрация для IFN β 1b-PAS200 наблюдалась через 4ч после введения препарата и составила 10,77 нМ, для Инфибета - через 2ч и составила 9,05 нМ. Примечательно, что биодоступность препаратов, как при подкожном, так и при внутримышечном способах введения сопоставима и составила 4,3% и 3,3% при подкожном введении для IFN β 1b-PAS200 и Инфибета, соответственно, и 5,2% и 2,8 % при внутримышечном введении для IFN β 1b-PAS200 и Инфибета, соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что несмотря на увеличение гидродинамического радиуса, добавление ПАС-полипептида не оказывает серьезного негативного влияния на биодоступность интерферона бета.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что использование технологии ПАСилирования позволяет улучшить как биотехнологические, так и терапевтически важные характеристики IFN β -1b. Добавление ПАС-последовательности (200 а.о.) к IFN β 1b не только увеличивает растворимость, стабильность и биологическую активность IFN β -1b, но и положительным образом сказывается на ключевых фармакокинетических характеристиках, в частности, на времени экспозиции белка в системном кровотоке. Позитивный эффект применения технологии ПАСилирования с целью улучшения фармакокинетических свойств терапевтических белков продемонстрирован также для интерферона α -2b человека (Binder et al., 2017) и лептина мыши (Mendler et al., 2015), для которых присоединение ПАС привело к 4-кратному и 6-кратному увеличению периода полувыведения, соответственно. Помимо этого, показано, что увеличение длины PAS-фрагмента до 600 аминокислот приводит к еще более значительному эффекту пролонгирования. Так, добавление ПАС-последовательности (600 а.о.) к IFN α 2b или Fab-фрагменту приводит к 30-кратному и 20-кратному увеличению периода полувыведения, соответственно. При этом, биополимер не оказывает серьезного влияния на аффинность терапевтического белка к своей мишени, как для Fab, так и для IFN α 2b человека (Binder et al., 2017). Все отмеченное выше, выгодно отличает технологию ПАСилирования от большинства других подходов, направленных на улучшение биотехнологических и фармакокинетических характеристик белков. Согласно имеющемуся опыту и данным литературы, есть основания полагать, что добавление PAS-фрагмента большего размера, приведет к еще большему улучшению фармакокинетических характеристик.

ВЫВОДЫ

1. Впервые получена модифицированная ПАС-последовательностью форма рекомбинантного интерферона бета-1b. Установлено, что при присоединении ПАС-последовательности в С-концевую область интерферона бета полученный белок может быть эффективно наработан в штаммах *E.coli*.
2. Отработаны оптимальные условия культивации штамма-продуцента IFN β 1b-PAS, а также разработана схема выделения, позволяющая получить функционально-активный образец белка с чистотой более 90% и низким содержанием эндотоксинов (3-6 ед/мг белка).
3. Методами гель-эксклюзионной хроматографии, ПААГ-электрофореза и nanoLCMS установлено, что добавление ПАС-последовательности приводит к существенному увеличению гидродинамического радиуса IFN β 1b-PAS.
4. В экспериментах *in vitro* показано, что добавление ПАС полипептида не приводит к снижению биологической активности интерферона бета *in vitro* и положительно сказывается на стабильности белка.
5. В экспериментах *in vivo* продемонстрировано положительное влияние ПАС-биополимера на фармакокинетические свойства интерферона бета-1b, включая двукратное увеличение периода полувыведения.
6. Разработанные методы культивации и выделения IFN β 1b-PAS могут послужить основой для разработки промышленного регламента производства лекарственного препарата интерферона бета пролонгированного действия.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. **Zvonova, E.A.** PASylation technology improves recombinant interferon- β 1b solubility, stability and biological activity. / E.A. Zvonova, A.V. Ershov, O.A. Ershova, M.A. Sudomoina, M.B. Degterev, G.N. Poroshin, A.V. Eremeev, A.P. Karpov, A.Yu. Vishnevsky, I.V. Goldenkova-Pavlova, A.V. Petrov, S.V. Ruchko, A.M. Shuster // Appl. Microbiol. and Biotech. – 2017. - №101(5) – DOI: 10.1007/s00253-016-7944-3
2. **Звонова, Е.А.** Стратегии модуляции фармакокинетики рекомбинантных терапевтических белков. / Е.А. Звонова, А.А. Тюрин, А.А. Соловьев, И.В. Голденкова-Павлова // Успехи современной биологии. - 2017. – №137(4). - С. 415-436.
3. **Звонова, Е.А.** Технология PASYLATION® позволяет улучшить фармакокинетические свойства рекомбинантного интерферона β -1b человека *in vivo*. / Е.А. Звонова, О.А. Ершова, А.В. Ершов, А.А. Казаров, Е.С. Белянина, М.В. Лыков, А.Ю. Вишневский, А.П. Карпов, С.В. Ручко, А.М. Шустер, А.А. Соловьев, И.В. Голденкова-Павлова // Биотехнология. - 2018. - №34(2). - С.37-46

Работы, опубликованные в других изданиях:

4. **Berkovich, E.A.** Biotherapeutics with improved pharmacokinetic properties. / E.A. Berkovich, A.P. Karpov, U. Binder, A. Skerra, A.V. Petrov. // 38th FEBS Congress. - г.Санкт-Петербург - 2013. - С. 606;
5. **Звонова, Е.А.** Получение модифицированной формы рекомбинантного интерферона бета-1b с улучшенными физико-химическими и биологическими свойствами при использовании технологии PASylation®. / Е.А. Звонова, А.В. Ершов, О.А. Ершова, М.А. Судомоина, М.Б. Дегтерев, Г. Н. Порошин, А.В. Еремеев, А.П. Карпов, А.Ю. Вишневский, И.В. Голденкова-Павлова, А.В. Петров, С.В. Ручко, А.М. Шустер // Сборник тезисов молодежного научного форума «OPEN SCIENCE». -Гатчина. - 2016. - С. 31.
6. **Звонова, Е.А.** Использование технологии PASylation® для получения модифицированной формы рекомбинантного интерферона бета-1b с улучшенными фармакокинетическими свойствами. // Е.А. Звонова, О.А. Ершова, А.В. Ершов, А.А. Казаров, Е.С. Белянина, М.В. Лыков, А.Ю. Вишневский, А.П. Карпов, С.В. Ручко, А.М. Шустер, А.А. Соловьев, И.В. Голденкова-Павлова. Материалы XXX Зимней молодежной научной школы «Перспективные

направления физико-химической биологии и биотехнологии». – г. Москва. - 2018. - С. 12.

7. **Звонова, Е.А.** Использование технологии PASylation® для получения модифицированной формы рекомбинантного интерферона бета-1b с улучшенными фармакокинетическими свойствами. / Е.А. Звонова, О.А. Ершова, А.В. Ершов, А.А. Казаров, Е.С. Белянина, М.В. Лыков, А.Ю. Вишневский, А.П. Карпов, С.В. Ручко, А.М. Шустер, А.А. Соловьев, И.В. Голденкова-Павлова // 18-я научная конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». – г. Москва. - 2018. - С. 182.