ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ И ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

ПЫХТИНА МАРИЯ БОРИСОВНА

Аполипопротеин AI-содержащие химерные полипептиды как система доставки терапевтических биомакромолекул

1.5.4 – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

> Научный руководитель: доктор биологических наук Беклемишев Анатолий Борисович

ОГЛАВЛЕНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	8
	ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1.	Структура аполипопротеина А-І и ЛПВП	16
1.2.	Роль АроА-І и ЛПВП в регуляции физиологических	
	процессов в организме	. 19
1.3.	Источники получения ApoA-I	25
1.4.	ЛПВП и АроА-І как терапевтические средства и новая	Ā
	платформа для доставки различного рода лекарственных	ζ.
	соединений	. 27
1.5.	Вирусные и невирусные системы доставки генов в клетки	
	эукариот	30
1.5.1.	Трансфекция ДНК с помощью гистоновых белков	. 32
1.5.2.	Трансфекция ДНК с помощью пептидов, проникающих в	3
	клетки	37
1.6.	Цитокины	. 41
1.6.1.	Интерферон альфа 2b	. 41
1.6.2.	Колониестимулирующие факторы	. 43
1.7.	Современные подходы к решению проблемы	
	пролонгирования функциональной активности цитокин-	
	содержащих фармпрепаратов в организме	. 46
1.7.1.	Липидные или полимерные системы	. 48
1.7.2.	Модификации белковых молекул с целью пролонгации их	ζ
	активности	49
1.8.	Способы получения рекомбинантных химерных белков	56
1.9.	Продуценты цитокинов человека	61
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	65
	ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	67

2.1.	Материалы и реактивы	67
2.1.1.	Реактивы	67
2.1.2.	Хроматографические сорбенты для очистки белков	68
2.1.3.	Ферменты	68
2.1.4.	Рекомбинантные белки – стандарты	68
2.1.5.	Буферные системы и среды	68
2.1.6.	Штаммы микроорганизмов, вирусов и плазмидные вектора	69
2.1.7.	Линии культур клеток	70
2.1.8.	Лабораторные животные	70
2.2.	Методы	71
2.2.1.	Выделение ЛПВП и АроА-І из плазмы крови	71
2.2.2	Молекулярно-биологические методы анализа ДНК и белков.	72
2.2.2.1.	ПЦР	72
2.2.2.2.	Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции	72
2.2.2.3.	Лигирование фрагментов ДНК с использованием ДНК-	
	лигазы бактериофага Т4	73
2.2.2.4.	Электрофорез ДНК в агарозном геле	73
2.2.2.5.	Метод задержки ДНК в геле	73
2.2.2.6.	Электрофорез белков в денатурирующих условиях в	
	пластинах полиакриламидного геля (SDS-PAG)	73
2.2.2.7.	Электрофорез белков в нередуцирующих условиях в	
	пластинах PAG	74
2.2.2.8.	Иммуноблоттинг белков	74
2.2.2.9.	Твердофазный иммуноферментный анализ белков	74
2.3.10.	Методы количественного определения белков	74
2.2.3.	Физические методы анализа рекомбинантных белков и	
	ДНК	75
2.2.3.1.	Инфракрасная Фурье-спектроскопия АроА-І и его	
	комплексов с ДНК	75

2.2.3.2.	Масс-спектрометрия rhIFN-ApoA-I	75
2.2.4.	Генно-инженерные методы работы с бактериальными и	
	эукариотическими клетками	76
2.2.4.1.	Схема клонирования ДНК в бактериях и дрожжах	76
2.2.4.2.	Проектирование синтетических генов	77
2.2.4.3.	Метод предсказания третичной структуры белков	77
2.2.4.4.	Выделение рекомбинантных плазмидных ДНК	77
2.2.4.5.	Приготовление электрокомпетентных клеток Escherichia	
	coli и Pichia pastoris	78
2.2.4.6.	Трансформация бактериальных и эукариотических клеток с	
	помощью электропорации плазмидными ДНК	. 78
2.2.4.7.	Скрининг колоний <i>E. coli</i> на наличие клонированной ДНК-	
	вставки	78
2.2.4.8.	Селекция рекомбинантных клонов – продуцентов целевых	
	белков.	79
2.2.5.	Получение и очистка рекомбинантных белков,	
	продуцируемых $E.coli$	80
2.2.5.1.	Культивирование клеток штамма <i>E. coli</i>	80
2.2.5.2.	Индукция синтеза рекомбинантного белка в клетках <i>E. coli</i>	80
2.2.5.3.	Определение внутриклеточной локализации белков	80
2.2.5.4.	Выделение и очистка рекомбинантных белков Н2А, РТО-	
	ApoAI-H2A и H2A-ApoAI-H2A	80
2.2.6.	Получение и очистка рекомбинантных белков,	
	продуцируемых <i>P. pastoris</i>	81
2.2.6.1.	Культивирование рекомбинантного штамма P .	
	pastoris	81
2.2.6.2.	Индукция синтеза рекомбинантного белка в клетках P .	
	pastoris	82
2.2.6.3.	Осаждение целевых белков из культуральной жидкости	

	сульфатом аммония	82
2.2.6.4.	Очистка рекомбинантных цитокинов	82
2.2.7.	Генно-инженерные методы работы на культуре клеток	
	млекопитающих	83
2.2.7.1.	Трансфекция клеток НЕК 293Т комплексами плазмид с	
	химерными полипептидами	83
2.2.8.	Методы работы с клетками костного мозга (ККМ)	
	млекопитающих	84
2.2.8.1.	Получение и культивирование ККМ крыс и человека	84
2.2.8.2.	Анализ ККМ методом проточной цитометрии	85
2.2.8.3.	Миелограмма	85
2.2.8.4.	Определение фаз клеточного цикла	85
2.2.9.	Исследование противовирусной активности rhIFN и rhIFN-	
	ApoA-I	86
2.2.10.	Культивирование мононуклеаров крови человека	87
2.2.11	XTT анализ	87
2.2.12.	Исследование фармакокинетики обеих форм	
	рекомбинантного IFN (rhIFN и rhIFN-ApoA-I)	88
2.2.13.	Методы статистической обработки результатов	89
	ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	90
3.1.	Разработка способа выделения АроА-І из плазмы крови	
	человека	90
3.2.	Исследование способности АроА-І связывать плазмидную	
	ДНК	93
3.3.	Конструирование и исследование трансфецирующей	
	активности химерных полипептидов	97
3.3.1.	Конструирование плазмид, несущих гены рекомбинантных	
	белков PTD-ApoAI-H2A, H2A-ApoAI-H2A и H2A,	
	предназначенных для трансфекции ДНК	97

3.3.2.	Трансформация клеток $E.\ coli$ и скрининг трансформантов	100
3.3.3.	Анализ экспрессии рекомбинантных генов	100
3.3.4.	Выделение и очистка рекомбинантных белков	102
3.3.5.	Оценка ДНК-связывающих свойств химерных белков	
	методом гель-ретардации	103
3.3.6.	Трансфекция ДНК, опосредованная рекомбинантными	
	химерными белками	104
3.4.	Получение штаммов метилотрофных дрожжей P. pastoris -	
	продуцентов рекомбинантных цитокинов человека и их	
	химерных форм АроА-І	107
3.4.1.	Получение штамма дрожжей P. pastoris - продуцента	
	рекомбинантной липазы из <i>T. Lanuginosus</i>	107
3.4.2.	Конструирование штаммов <i>P. pastoris</i> , продуцирующих	
	аутентичные и химерные формы rhIFN	110
3.4.2.1.	Конструирование рекомбинантных плазмид, несущих гены	
	IFN и IFN-ApoA-I	111
3.4.2.2.	Репрезентация 3Д структуры химерных белков	114
3.4.2.3.	Трансформация клеток P. pastoris и скрининг	
	трансформантов	115
3.4.2.4.	Препаративная наработка и очистка rhIFN и rhIFN-ApoA-I	118
3.4.2.5.	Масс-спектрометрический анализ rhIFN-ApoA-I	120
3.4.2.6.	Анализ препаратов rhIFN и rhIFN-ApoA-I электрофорезом в	
	12% SDS-PAG в редуцирующих и нередуцирующих	
	условиях	121
3.4.2.7.	Исследование противовирусной активности rhIFN и rhIFN-	
	ApoA-I	123
3.4.2.8.	Исследование фармакокинетики обеих форм rhIFN	123
3.4.3.	Конструирование штаммов P. pastoris, продуцирующих	
	колониестимулирующие факторы (КСФ) rhG-CSF и rhGM-	

	CSF и их химерные формы с АроА-I	125
3.4.3.1.	Проектирование, синтез и клонирование генов G-CSF и GM-	
	CSF в клетках $E.\ coli$ в составе вектора рРІС $Z\alpha A$	125
3.4.3.2.	Конструирование рекомбинантных плазмид pPICZaA/G-	
	CSF-ApoA-I и pPICZaA/GM-CSF-ApoA-I	126
3.4.3.3.	Трансформация клеток $E.\ coli$ и скрининг трансформантов	128
3.4.3.4.	Трансформация клеток P. pastoris и скрининг	
	трансформантов	128
3.4.3.5.	Препаративная наработка аутентичных и химерных форм	
	rhG-CSF и rhGM-CSF, синтезированных дрожжами P .	
	pastoris	131
3.4.3.6.	Хроматографическая очистка рекомбинантных аутентичных	
	и химерных форм КСФ	132
3.4.3.7.	Анализ препаратов КСФ электрофорезом в 12% SDS-PAG в	
	редуцирующих и нередуцирующих условиях	133
3.4.4.	Изучение биологических свойств химерных форм КСФ	135
3.4.4.1.	Сравнительное исследование специфической активности	
	обеих форм рекомбинантного rhG-CSF на ККМ крыс и	
	человека	135
3.4.4.2.	Сравнительное исследование специфической активности	
	обеих форм рекомбинантного rhGM-CSF	142
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	151
	ВЫВОДЫ	153
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	155
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	158

ВВЕДЕНИЕ

Одной из центральных задач современной медицинской биотехнологии является разработка оптимальных систем доставки организм терапевтически активных белков и нуклеиновых кислот. Использование технологии рекомбинантной ДНК позволяет создавать лекарственные препараты с заданными терапевтическими свойствами и специфичностью действия, которые могут применяться как для коррекции генетических нарушений, так и для терапии заболеваний инфекционной и неинфекционной природы [1]. Перенос генетического материала в экспериментальной и клинической генотерапии происходит преимущественно с использованием вирусных системам доставки генов, что сопряжено с вероятностью инсерционного мутагенеза и иммунными реакциями организма [2]. Одним из альтернативных направлений в доставке генетического материала является рекомбинантных мультидоменных полипептидных использование конструкций, сочетающих различные функциональные домены, в том числе и способные преодолевать вне- и внутриклеточные барьеры организма [3].

С открытием новых патофизиологических механизмов различных заболеваний значимость применения белковых терапевтических средств постоянно растет. В настоящее время более 200 различных терапевтических белков одобрено Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) для широкого спектра медицинских показаний [4].

Вместе с тем, клиническое применение биопрепаратов на основе белков и пептидов ограничено множеством проблем, таких как быстрая ферментативная деградация и, соответственно, короткое время действия [5], низкая растворимость, нестабильность при хранении [6], низкая биодоступностью, и нежелательные побочные эффекты [7].

В этой связи, разработка безвредных метаболизируемых средств адресной доставки и продления жизни лекарственных белковых препаратов

представляет настоящее время особую актуальность. Один В ИЗ перспективных подходов к решению вышеуказанных проблем - получение химерных форм терапевтических белков с длительно циркулирующими белками плазмы крови [8, 9, 10]. Эти природные белки обладают множеством существенных преимуществ по сравнению с синтетическими и полимерными системами лучшей биодоступностью, биосовместимостью, биоразлагаемостью и низкой токсичностью, в связи с чем, они интенсивно изучаются на предмет возможного их использования в качестве платформы различных низкомолекулярных ДЛЯ доставки органы И ткани терапевтических средств и белковых препаратов.

В последнее десятилетие в качестве новой наноплатформы для транспорта терапевтических молекул различной природы всесторонне исследуются липопротеины плазмы крови и их белковые компоненты – аполипопротеины [11, 12, 13].

Аполипопротеин А-I (АроА-I) - основной белок, входящий в состав липопротеинов высокой плотности. Он является природным транспортным белком, осуществляющим перенос липидов и холестерина в организме млекопитающих. Кроме того, АроА-I выполняет в организме также важные регуляторные функции, составляя значительный компонент антиоксидантной защиты [14], проявляет выраженные антиатерогенные [15], антитромбические [16], противоопухолевые функции [17] и участвует в обеспечении гуморального и клеточного иммунитетов [18].

АроА-I способен связывать гидрофобные и гидрофильные соединения [19], имеет длительный период циркуляции в организме [20], легко подвергается биодеградации не проявляя иммуногенности, способен связываться с рецепторами многих типов клеток и проникать внутрь этих клеток [21]. Все эти свойства обусловливают перспективность использования АроА-I для создания на его основе системы доставки терапевтических пептидов, белков и нуклеиновых кислот.

Целью работы явилось определение возможности применения аполипопротеина A-I (ApoA-I) человека в качестве белка-протектора и средства доставки биомакромолекул в клетки млекопитающих.

Для достижения цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1. Разработать способ выделения и очистки ApoA-I из донорской крови и исследовать его способность связываться с плазмидной ДНК методами ИК-Фурье спектроскопии и гель-ретардации.
- 2. Сконструировать штаммы *Escherichia coli*, продуцирующие рекомбинантные химерные белки, содержащие ApoA-I, слитый с гистоном H2A, и исследовать потенциальную способность химер трансфицировать плазмидную ДНК в клетки млекопитающих.
- 3. Отработать способы получения рекомбинантных штаммов *Pichia pastoris*, продуцирующих целевые белки, на примере создания дрожжевого штамма-продуцента липазы из *Thermomyces lanugenosus*.
- 4. Сконструировать штаммы P. pastoris, продуцирующие рекомбинантные аутентичные цитокины человека (rhIFN, rhG-CSF и rhGM-CSF), а также их химерные формы с ApoA-I (rhIFN-ApoA-I, rhG-CSF-ApoA-I и rhGM-CSF-ApoA-I).
- 5. Разработать способы лабораторного получения и хроматографической очистки аутентичных и химерных форм рекомбинантных цитокинов.
- 6. Оценить функциональные активности обеих форм рекомбинантных колониестимулирующих факторов в условиях *in vitro*.
- 7. Исследовать противовирусную активность и фармакокинетические параметры обеих форм рекомбинантного IFN.

Научная новизна работы.

Сконструированы рекомбинантные штаммы $E.\ coli$, продуцирующие оригинальные химерные белки, состоящие из зрелого ApoA-I человека, связанного с гистоном H2A (PTD-H2A-ApoAI, H2A-ApoAI-H2A). Показано, что рекомбинантные химеры способны образовывать прочные комплексы с плазмидной ДНК и трансфицировать её в ядра клеток эукариот *in vitro*. Эти

химеры могут рассматриваться в качестве прообраза будущих невирусных систем переноса (доставки) генов в клетки эукариот.

Впервые получены рекомбинантные химерные белки, состоящие из цитокинов человека, слитых с ApoA-I (rhIFN-ApoA-I, rhG-CSF-ApoA-I, rhGM-CSF-ApoA-I), продуцируемые дрожжами *P. pastoris*. Показано, что биологическая активность цитокинов в составе химерных белков полностью сохранена.

Установлено, что ApoA-I, входящий в состав химерных конструкций rhG-CSF-ApoA-I и rhGM-CSF-ApoA-I, модулирует активности слитых с ним цитокинов, привнося свое специфическое действие к действию цитокина, что выражается в снижении острофазности их действия, уменьшении апоптоза клеток (особенно в случае rhGM-CSF-ApoA-I), повышении жизнеспособности зрелых клеток и бластных форм и нормализации сегментации нейтрофилов (в случае с rhG-CSF-ApoA-I).

Впервые показана модулирующая роль АроА-I в составе химерного белка rhG-CSF-АроА-I, выраженная в способности химеры повышать пролиферацию клеток моноцитарного ряда костного мозга человека. Вносимый аполипопротеином эффект проявляется им в нанограммовых концентрациях, при которых нативный АроА-I не оказывает своего влияния.

Продемонстрировано, что ApoA-I в составе химерного белка rhIFN-ApoA-I в 1.8 раза увеличивает время полужизни rhIFN, способствуя пролонгированию его фармакологических эффектов.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

Разработан оригинальный способ выделения и очистки АроА-I, обеспечивающий высокий выход (80-85%) очищенного нативного белка. Этот способ может быть использован в научно-исследовательских институтах и фармкомпаниях для решения научных и прикладных задач, связанных с получением и изучением АроА-I и его комплексов с другими макромолекулами. В частности, в НИИ биохимии ФИЦ ФТМ этот способ

применяется на протяжении последних 7 лет для получения очищенного нативного АроА-I в научных целях.

Предложенный способ трансфекции ДНК в перевиваемые клетки *in* vitro с помощью химерных конструкций, содержащих АроА-I, слитый с гистоном H2A, по-видимому, может быть положен в основу усовершенствования и разработки невирусных систем доставки ДНК *in vivo*.

Разработанная технология получения функционально-активных химерных цитокинов пролонгированного действия с модулированными АроА-I дополнительными новыми свойствами может быть использована и для получения аналогичных химерных конструкций с другими цитокинами и биологически-активными пептидами и белками. Полученные химерные цитокины представляют интерес для более углубленного изучения их функций и возможного последующего использования в практической медицине.

Обнаруженное явление усиления фагоцитоза клеточного дебриса в присутствие химеры rhG-CSF-ApoA-I, а также продемонстрированная способность химеры повышать пролиферацию клеток моноцитарного ряда костного мозга человека, представляет интерес, в частности, для изучения возможности использования rhG-CSF-ApoA-I в терапии трофических язв с нарушенной фагоцитарной функцией.

В целом, настоящая работа расширяет знания об аполипопротеине A-I как о перспективной белковой платформе для создания на ее основе полипептидных препаратов пролонгированного действия.

Положения, выносимые на защиту:

- 1. АроА-I образует слабые комплексы с ДНК за счёт нековалентных связей и, по данным ИК-Фурье спектроскопии, вызывает локальное плавление ДНК в области связывания.
- 2. Рекомбинантные химерные полипептиды, состоящие из полноразмерного зрелого АроА-I, слитого с гистоном Н2A, способны образовывать

- устойчивые комплексы с ДНК и обеспечивать трансфекцию плазмидной ДНК в клетки НЕК 293Т, с эффективностью, составляющей 3-5%.
- 3. Аутентичные и химерные формы рекомбинантных цитокинов, полученные биосинтезом в дрожжах *P. pastoris*, обладают свойственными для соответствующих природных цитокинов специфическими функциональными активностями. Химерные и аутентичные формы проявляют сопоставимые по величине активности.
- 4. АроА-І, входящий в состав химерных форм колониестимулирующих (rhG-CSF-ApoA-I, rhGM-CSF-ApoA-I), факторов модулирует пролонгирует ИХ активность на клетках костного мозга. снижая острофазность действия, уменьшая апоптоз клеток И повышая жизнеспособность как зрелых, так и бластных форм.
- 5. Химера rhIFN-ApoA-I демонстрирует увеличенный период полужизни *in vivo* в сравнении с аутентичной формой rhIFN.

Публикации и апробация результатов.

По материалам работы было получено 2 патента, опубликовано 9 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science.

Основные результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: III Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012); научно-практической конференции молодых ученых и специалистов на тему «От эпидемиологии к диагностике актуальных инфекций: подходы, традиции, инновации» (Санкт-Петербург, 2014); VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015); VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015); IX Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва,

2017); X Международной научной конференции «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 2017); IV конференции Международной молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (Новосибирск, 2017); научнопрактической конференции ФИЦ-ФТМ (Новосибирск, 2018); Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы (Москва, 2019); Всероссийской мультиконференции развития» международным участием: «Биотехнология медицине (Новосибирск, 2019); IX всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фундаментальные аспекты компенсаторноприспособительных процессов» (Новосибирск, 2020); 6th и 7th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (2020, 2021).

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 200 страницах, включает 45 рисунков и 1 таблицу. Список литературы содержит 406 источников, в т.ч. 11 отечественных и 395 зарубежных авторов.

Вклад автора. Основные результаты исследований, представленные в диссертации, получены и проанализированы лично автором. Автор самостоятельно выполнила молекулярно-биологические и генно-инженерные исследования. Работы, связанные с анализом ИК-спектров комплексов ДНК с АроА-І, проводились автором совместно с в.н.с., д.б.н. Куницыным В.Г. Работы по тестированию биологической активности рекомбинантных цитокинов проводились совместно с д.м.н., проф., член-корр. РАН Черных Е.Р., с.н.с. Мирошниченко С.М. и с сотрудниками ЗАО «Вектор-Медика» к.х.н. Алексеевым П.В. и Гениной Е.С. Эксперименты по фармакокинетике rhIFN и rhIFN-АроА-І проводились совместно с к.б.н. Котляровой А.А.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю – д.б.н., профессору Беклемишеву А.Б. за общее руководство и

помощь на всех этапах выполнения диссертации. Автор также выражает глубокую признательность с.н.с. Мирошниченко С.М. за помощь в освоении метода проточной цитометрии и анализа полученных данных. Автор искренне благодарит г.н.с., к.б.н. Пельтека С.Е. за помощь в проведении масс-спектрометрии образца химерного rhIFN на базе ИЦиГ СО РАН. Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории генной инженерии НИИ биохимии ФИЦ ФТМ за помощь в освоении молекулярнобиологических и генно-инженерных методов и за помощь и поддержку в процессе выполнения работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структура аполипопротеина А-І и ЛПВП

Аполипопротеин А-I (АроА-I) является главным структурным и функциональным компонентом липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и составляет около 70% массы ЛПВП. Основной функцией ЛПВП в организме является обеспечение обратного транспорта холестерина из периферических тканей в печень и стероидогенные клетки для последующего катаболизма. Биогенез, метаболизм и транспорт антиатерогенных ЛПВП и их функциональные взаимодействия регулируются АроА-I [22].

АроА-I синтезируется в печени (70%) и кишечнике (30%) и секретируется в сыворотку в свободном от липидов состоянии [23]. Липидсвободная форма АроА-I является термодинамически лабильной и очень быстро липидируется [24], поэтому подавляющее большинство АроА-I находится в крови в связанном с липидами состоянии и лишь около 5-10% циркулирующих в крови АроА-I являются липид-свободными и обеспечивают поглощение фосфолипидов из клеток [25].

Циркулирующий не связанный с липидами ароА-І представляет собой типичный амфипатический белок массой 28 кДа, лишенный дисульфидных связей [26]. Анализ первичной структуры ApoA-I позволил идентифицировать повторы последовательностей из 11 и 22 аминокислотных остатков (а.о.), разделенных пролин-содержащими сегментами [27]. Каждый из повторов содержит периодичные амфипатические альфа-спирали, которые обеспечивают взаимодействие АроА-І с жирной или водной средой [19]. Гидрофобная поверхность спирали обращена в неполярную липидную среду, в то время как гидрофильная поверхность взаимодействует с водной фазой [19, 25]. Зрелый АроА-І представляет собой единую полипептидную цепь, состоящую из 243 а.о., и его структура более чем на 50% состоит из альфаспиралей.

Хотя первичная и вторичная структуры несвязанного с липидами АроА-I уже детально охарактеризованы, его третичная структура изучается до сих пор. АроА-I сложно исследовать с помощью традиционных структурных методов анализа белков, таких как рентгеновская кристаллография или ядерный магнитный резонанс (ЯМР), поскольку он имеет тенденцию к самоассоциации, связыванию гидрофобных субстанций и обладает исключительной структурной гибкостью [19, 28, 29].

Исследование природных и генно-инженерных мутантов АроА-І определить роль отдельных участков В его позволило молекуле. Встречающиеся в природе мутации N-концевого домена АроА-І часто связаны с развитием амилоидоза [30]. Кроме того, N-концевые мутанты демонстрируют пониженную стабильность и низкую спирализованность АроА-І [31]. Мутации центральной части белка снижают связывание ЛХАТ с ЛПВП, снижая этирификационную активность [32, 33]. Мутации Сконцевого домена демонстрируют его важную роль в инициации связывания ароА-І с липидами и формировании липопротеиновых частиц [34].

Гетерогенность популяций ЛПВП во многом определяется амфипатической динамичностью структурой АроА-І И высокой лабильностью его молекулы – амфипатические альфа спирали имеют вид петли, что позволяет АроА-І легко изменять свою конфигурацию в зависимости от количества связанных липидов [24, 35, 36]. В процессе формирования ЛПВП АроА-І проходит через стадии, начиная от липидсвободного АроА-І до липид-связанных состояний [37]. ЛПВП являются высоко динамичными частицами, постоянно меняющимися в отношении формы и размера, начиная от молекул с низким содержанием липидов, и заканчивая частицами, обогащенными холестерином и белками [38, 39, 40].

Сферические ЛПВП являются основной формой ЛПВП, ответственной за транспорт холестерина в печень, и представляют собой комплексы, состоящие из гидрофобного центрального ядра неполярных липидов (преимущественно триглицеридов и эфиров холестерина), окруженные

поверхностным монослоем амфипатических фосфолипидов, свободного холестерина и аполипопротеинов [41].

Следует подчеркнуть, что ЛПВП состоят из группы частиц с выраженной структурной, физико-химической, композиционной и функциональной неоднородностью и имеют существенные различия в биологической активности [42, 43]. Белки образуют основной структурный и функциональный компонент ЛПВП и в настоящее время идентифицировано более 80 ассоциированных с ЛПВП белков [44, 45], влияющих не только на липидный метаболизм, но также вовлеченных в регуляцию других процессов, протекающих в организме.

Состав липопротеиновых частиц является переменным и зависит от того, в норме или патологии находится организм [46]. Например, ЛПВП, страдающих изолированные больных, острыми И хроническими воспалительными заболеваниями, теряют белки и ферменты со свойственной одновременно приобретают ИМ функцией, И провоспалительные прооксидантные факторы. Дисфункциональные ЛПВП обнаруживаются при ряде аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит [47], диабет 1 типа [48], системная красная волчанка [49], и первичный антифосфолипидный синдром [50].

АроА-I в составе ЛПВП выполняет множество различных функций, таких как: атеропротекторные, антиоксидантные, противовоспалительные, антитромбические, иммуномодулирующие, противоопухолевые (Рисунок 1) – что будет рассмотрено ниже.

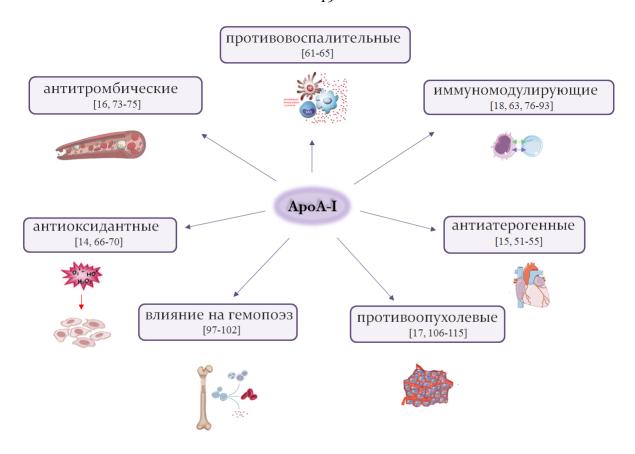


Рисунок 1. Функции АроА-І в организме.

1.2. Роль АроА-I и ЛПВП в регуляции физиологических процессов в организме

Антиатерогенная активность

Одной из основных функций ЛПВП является атеропротекторная. В течение нескольких последних десятилетий эпидемиологические данные и когортные исследования демонстрируют, что концентрация ЛПВП является обратным предиктором прогрессирующего атеросклероза и последующей ишемической болезни сердца [15, 51, 52]. Атеропротекторный эффект ЛПВП в значительной степени сводится к его способности транспортировать избыточный холестерин из кровеносных сосудов и периферических тканей (скелетные мышцы, кожа жировой ткани и макрофаги) в печень для выведения с желчью, - процесс, названный обратным транспортом

холестерина (ОТХ) [53, 54]. ОТХ инициируется ассоциацией синтезируемого в печени АроА-I в обедненные липидами ЛПВП частицы с помощью АТФ – связывающего кассетного транспортера (АВСА1) на макрофагах и других клетках-мишенях [55]. Это взаимодействие позволяет ЛПВП действовать в качестве акцептора холестерина. Кроме того, ЛПВП частицы акцептируют холестерин и фосфолипиды из клеточных мембран через два других АТФ кассетных трапспортера - АВСС1 и АВСС4 [56]. ЛПВП с низким содержанием липидов под действием ассоциированного с ЛПВП фермента лецитин-холестерин-ацилтрансферазы (ЛХАТ) впоследствии преобразуются в «зрелые» ЛПВП с ядром из сложных эфиров холестерина (сферические ЛПВП) [57, 58]. Последующее связывание частиц ЛПВП, содержащих АроА-I, со скавенджер рецептором В1 (SR-В1) [59] на гепатоцитах позволяет выгрузить холестерин, который в конечном итоге секретируется в виде желчи, завершая процесс обратного транспорта холестерина.

Противовоспалительная функция

Атеросклероз в настоящее время рассматривается как воспалительное заболевание, характеризующееся наличием макрофагов и других клеток, вовлеченных в воспаление, в артериальной интиме [60]. АроА-I и ЛПВП ингибируют воспаление, связанное с развитием атеросклеротических бляшек, подавляют экспрессию генов провоспалительных молекул адгезии и хемокинов в эндотелиальных клетках и последующий хемотаксис моноцитов [61], являющихся ключевыми этапами раннего атерогенеза. Нативные ЛПВП и АроА-I, уменьшая экспрессию гена CD11b, снижают адгезию моноцитов к эндотелиальным клеткам и модулируют рекрутирование нейтрофилов в места воспаления [62].

Противовоспалительная роль ЛПВП частиц также опосредуется связыванием АроА-I со значительной частью ЛПС плазмы, обусловливающим уменьшение доступности ЛПС для связывания с TLRs и инициации передачи воспалительного сигнала [63]. Было показано, что

снижение уровня сывороточного АроА-І у пациентов с сепсисом связано с плохим прогнозом [64, 65].

Характерной чертой воспаления является нарушением редокс- баланса. АроА-I и ЛПВП участвуют в снижении воспалительного статуса при множестве заболеваний посредством функций как самого АроА-I, так и других антиоксидантных белков, ассоциированных в ЛПВП.

Антиоксидантная функция

АроА-І играет центральную роль в обеспечении антиоксидантной функции ЛПВП. Спиральные области АроА-І служат платформой для связывания антиоксидантных белков, включая параоксоназу 1 (PON1) и активирующий тромбоциты фактор ацетилгидролазу (РАГ-АН) [66, 67]. Эти ферменты играют важную роль, разрушая сложные эфиры холестерина и фосфолипиды в окисленных липопротеинах. Кроме того, АроА-І в составе ЛПВП участвует в нейтрализации одноэлектронных свободнорадикальных окислителей. Остатки метионина АроА-І, расположенные в положениях 112 148, могут восстанавливать гидропероксиды липидов (LOOH) до окислительно-восстановительных гидроксидов липидов (LOH) за счет окисления их тиоловых групп, прекращая тем самым цепные реакции перекисного окисления липидов [14, 68]. Недавние исследования показали также участие в таких окислительно-восстановительных процессах тирозина [69]. положении 192 Поскольку ApoA-I нейтрализует одноэлектронные свободно- радикальные окислители, он снижает уровень активных форм кислорода (АФК) и модулирует активность H_2O_2 . Сотрудниками НИИ биохимии было показано, что АроА-І, снижая перекисное окисисление, влиял на пролиферацию и жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) [70].

Антитромбическая функция

Аггрегация тромбоцитов и тромбообразование напрямую способствует патогенезу и осложнению атеросклеротических процессов. Достоверно показано, что пациенты с артериальным и венозным атеротромбозом имеют

более низкие показатели содержания ЛПВП в плазме [71, 72]. ЛПВП обладают рядом антитромбических свойств, включая ингибирование аггрегации тромбоцитов и факторов свертывания крови, таких как тканевой фактор и факторы X, Va, и VIIIa [73, 74]. Кроме того, способность ЛПВП усиливать синтез NO также оказывает антитромбический эффект [75].

Иммуномодулирующая функция

В литературе появляется все больше данных об участии ЛПВП и АроА-I во врожденном и приобретенном иммунитете [18, 76-78]. Показано, что АроА-I может оказывать бактерицидное и бактериостатическое действие против некоторых грамм-положительных и грамм-отрицательных бактерий у низших позвоночных животных [79]. Антибактериальная активность ЛПВП в первую очередь связана с АроА-I, который конъюгирует и нейтрализует как бактериальные эндотоксины [63, 80], так и липотейховую кислоту [81], тем самым защищая от сепсиса.

АроА-I повышает уровень пентраксина 3 (РТХ3) - белка острой фазы, который распознает PAMPs (ассоциированную с патогеном молекулярную структуру) в вирусах, бактериях и грибах [82], влияя тем самым на врожденный иммунитет.

Кроме того, ЛПВП и АроА-I составляют значительную часть противовирусного компонента плазмы крови человека [83], препятствуя слиянию с клеткой и проникновению вируса внутрь клетки [84].

АроА-I и ЛПВП влияют на функции множества клеток иммунной системы, модулируя содержание холестерина в липидных рафтах - мембранных микродоменах, обогащенных холестерином и сфинголипидами-[85, 86]. В липидных рафтах заключены рецепторы с ключевыми иммунологическими функциями, такие как толл-подобные рецепторы (TLRs) [87], рецепторы Т и В- клеток [88, 89], а также ключевые эффекторы миелопоэза. Так, ЛПВП и АроА-I через АВСG1 и АВСА1 липидные транспортеры могут контролировать врожденный иммунитет—истощая холестерин из липидных рафтов и предотвращая TLR4 опосредованную

активацию NF-kB в эндотелиальных клетках [90]. ЛПВП влияют на функцию макрофагов, увеличивая экспрессию ATF3 и, приводят к снижению TLR-индуцированных провоспалительных цитокинов [91], что свидетельствует о том, что ЛПВП могут снизить воспалительный ответ, опосредованный TLR.

АроА-І также модулирует иммунный ответ, влияя на активацию Т-клеточного ответа. Было показано, что дефицит АроА-І приводил к росту пролиферации и активации Т клеток [92]. ЛПВП и АроА-І, снижая продукцию ИЛ12 в стимулированных зрелых ДК, тем самым снижал их способность активировать Т-клетки. Кроме того, АроА-І и ЛПВП влияют на созревание и активность ДК через индукцию простогладина Е2 и ИЛ10 [93].

Снижение уровня АроА-I может способствовать разрушительному хроническому воспалению, характерному для многих аутоиммунных заболеваний, что связано с чрезмерной активацией Т-клеточного иммунитета [94-96].

Влияние на гемопоэтические стволовые клетки

АроА-І и ЛПВП наряду со способностью связывать и переносить холестерин обладают многими плейотропными функциями, включая влияние (ΓCK) [97-100]. гемопоэтические стволовые клетки Недавние на исследования показали, что нарушение оттока холестерина может увеличить пролиферацию и дифференцировку ГСК. Yvan-Charvet и др. описали важную роль ЛПВП и холестерина в регуляции пролиферации гемопоэтических стволовых клеток и миелопоэза. В ГСК наблюдаются относительно высокие уровни экспрессии генов BCA1 и ABCG1. Yvan-Charvet и др. показали, что мыши с комбинированным дефицитом ABCA1 и ABCG1 демонстрировали очень низкие уровни ЛПВП-холестерина, выраженный лейкоцитоз и миелопролиферативный профиль [101]. Ими также было обнаружено, что введение мышам, нокаутным по ABCG1 и ABCA1 экзогенных ЛПВП уменьшало миелопролиферативный профиль до исходного уровня, что говорит о подавлении миелоидных клеток ЛПВП независимо от этих рецепторов [102]. Дальнейшие исследования показали, что в контроле

миелоидной пролиферации задействованы SR-BI рецепторы. Gao M. с коллегами было продемонстрировано SR-BI-опосредованное подавление пролиферации ГСК при инфузии реконструированных ЛПВП и АроА-I человека [99]. Таким образом, было найдено, что SR-BI играет критическую роль в ЛПВП-опосредованной регуляции пролиферации и дифференцировке ГСК.

Патологические состояния, такие как онкология и острые инфекции, повышенной пролиферации приводят И выходу кровь малодифференцированных супрессорных клеток миелодного происхождения - (МДСК). Инфузия наночастиц, имитирующих зрелые ЛПВП, существенно ингибирует активность МДСК, результатом чего является эффективный Тклеточный противораковый иммунный ответ на модели мышиной меланомы и рака легких [103]. У SR-B1 нулевых мышей такой ответ отсутствовал. Таким образом была показана связь между МДСК и рецептором SR-B1. Опосредованное ЛПВП ингибирование МДСК через SR-B1 может объяснять тот факт, что у людей с высокими уровнями сывороточного АроА-I и ЛПВП снижена заболеваемость раком, метастазирование и смертность от рака [104]. Все эти исследования указывают на важную роль путей оттока холестерина в контроле мобилизации ГСК, что может быть использовано в терапевтических стратегиях при лечении атеросклероза и гематологических онкологических заболеваний [105].

Противоопухолевая активность

Многочисленными исследованиями показано, что уровень АроА-I и ЛПВП в сыворотке крови людей коррелирует с уменьшением заболеваемости раком, метастазирования и смертности от рака [106-110]. Эти данные указывают на то, что АроА-I и ЛПВП могут быть потенциальными биомаркерами для раннего выявления опухолевого процесса. Известно также, что инфузия АроА-I в высоких дозах снижает метастазирование. Ряд исследований *in vitro* продемонстрировали, что АроА-I влияет на

пролиферацию, выживаемость и миграцию клеток различных карцином, большей частью через клеточно-автономные механизмы [111-113].

На мышах с меланомой было показано, что трансгенная сверхэкспрессия АроА-I человека или экзогенное введение АроА-I снижали малигнизацию, уменьшали метастазы и повышали выживаемость животных [17].

Противоопухолевое действие АроА-I обусловлено не прямым ингибированием репликации опухолевых клеток или гибелью клеток, а косвенным воздействием на врожденную и адаптивную ветви иммунной системы, а также путем ингибирования неоангиогенеза.

АроА-I связывает LPA (лизофосфатидную кислоту), обладающую проангиогенными свойствами и связанную с прогрессированием опухоли и [114]. неблагоприятным онкологическим прогнозом АроА-І изменяет фенотип экспрессии опухоль-ассоциированных макрофагов OT проопухолевого М2 до противоопухолевого фенотипа М1, ответственного за отторжение [17].Противоопухолевая опухоли активность ApoA-I уровней объясняется также снижением И активности матриксных металлопротеиназ ММР-2 и 9 [115], связанных с ремоделированием внеклеточного матрикса и формированием отдаленных метастазов. АроА-І подавляет МДСК, действующих как отрицательные иммуномодуляторы и мощные стимуляторы роста опухоли [17].

1.3. Источники получения ароА-І

В настоящее время существуют несколько источников получения АроА-І. Одним из первых способов было его выделение из плазмы донорской крови. Хотя данный способ и имеет множество недостатков, таких как невысокий уровень выхода белка, а также вероятность контаминации вирусами донорской крови, данный способ все еще используется рядом исследователей. Учитывая огромную роль АроА-І в организме человека и

значимость ApoA-I в диагностических целях, выделение интактного ApoA-I от здоровых и больных является важным шагом в понимании роли ApoA-I в прогрессировании как сердечно-сосудистых, так и ряда других заболеваний.

Выделение АроА-І из плазмы крови является многоэтапным и трудозатратным процессом и включает в себя ультрацентрифугирование в градиенте плотности, с последующей стадией делипидирования фракции использование органическими растворителями И нескольких хроматографий, таких как эксклюзионная хроматография, ионообменная и [116-119]. аффинная хроматографии Органические растворители, используемые для удаления липидов, вызывают проблемы, связанные с белков растворимостью делипидированных необратимыми И ИХ структурными изменениями.

Развитие генной инженерии метолов позволило получать рекомбинантный АроА-І, аналогичный нативному АроА-І человека. Для получения рекомбинантного АроА-І использовались различные системы экспрессии: клетки яичника китайского хомячка (СНО) [120], трансгенные растения [121], бакуловирусные системы [122]. Наиболее распространенным продуцентом ApoA-I являются рекомбинантные штаммы $E.\ coli$, которые позволяют получать приемлемые количества рекомбинантного АроА-I (до 100 мг/л) [123]. Тем не менее, получение рекомбинантных белков в $E.\ coli$ зачастую сопряжено с неправильным фолдингом, загрязнением белка необходимость бактериальными эндотоксинами, вызывающими длительной многоэтапной очистке белкового препарата. В связи с этим, несомненный интерес представляет использование В качестве микроорганизма-продуцента метилотрофных дрожжей *Pichia* pastoris. Однако, в настоящее время существует лишь одна работа, посвященная получению АроА-І человека биосинтезом в данном микроорганизме (выход белка составил 160 мг/л) [124].

1.4. ЛПВП и АроА-I как терапевтические средства и новая платформа для доставки различного рода лекарственных соединений

В последнее десятилетие ЛПВП рассматриваются как перспективная платформа для транспорта различного рода терапевтических соединений [11-13, 125-127].

Ряд особенностей ЛПВП характеризуют их как перспективных наноносителей для терапевтических или диагностических агентов: ЛПВП обладают термодинамической и кинетической стабильностью; в высокой концентрации присутствуют в крови (0,2 мг/мл); имеют длительный период полужизни (до 5 суток) [128]; не подвергаются эндосомальной секвестрации; биосовместимы и безопасны; их амфифильная природа обеспечивает способность связывать как гидрофильные, так и гидрофобные молекулы, лекарства и белки; наличие у множества клеток SR-В1 рецепторов к ЛПВП [59] позволяет эффективно доставлять с помощью ЛПВП лекарственные средства в их цитозольный компартмент.

Развитие бионанотехнологий предоставило платформу для разработки реконструированных или синтетических ЛПВП [129]. Реконструированные ЛПВП представляют собой синтетические формы нативных ЛПВП человека, в основном состоящие из фосфолипидов, АроА-I или коротких синтетических пептидов - миметиков АроА-I, холестерина и сложных эфиров холестерина. Реконструированные ЛПВП широко исследуются в качестве переносчиков микроРНК [127, 130, 131], противоопухолевых препаратов [132-134], различного рода белков и пептидов [135-136].

Преимуществом получения синтетических ЛПВП является возможность задавать структурные и композиционные особенности и придавать частицам уникальные свойства. Например, синтетические ЛПВП могут различаться по составу ядра - содержать сложные эфиры холестерина или неорганические скаффолды; по апо-компоненту - содержать

полноразмерный белок или апо-миметические пептиды; по форме - представлять собой дискоидальные или сферические ЛПВП.

Способ загрузки лекарственного агента в синтетические ЛПВП также может быть различным и зависит от его физико-химических свойств. Липофильные противоопухолевые препараты инкапсулируют в гидрофобное ядро ЛПВП [132, 134]; для доставки терапевтических пептидов конструируют их генно-инженерные химеры с АроА-I, альфа-спирали которого позволяют формировать ЛПВП частицу [136]; нуклеиновые терапевтические кислоты конъюгируют с холестерином для включения в билипидный слой ЛПВП [130].

В литературе существуют лишь отдельные работы, посвященные исследованию АроА-І, не связанного с липопротеиновой частицей, для транспорта терапевтических соединений, в том числе нуклеиновых кислот. В основном, это адресная доставка на основе АроА-І в печень и мозг. Так, I. например, Kratzer c коллегами конструировали протаминолигонуклеотидные наночастицы, покрывались ApoA-I которые транспортировались через гемато-энцефалический барьер [137]. Kim S.I. и др. получали АроА-І-катионные липосомы для доставки миРНК в печень для терапии против гепатита С [138].

В настоящее время есть отдельные работы, принадлежащие одному коллективу авторов, по созданию генетических конструкций, экспрессирующих *in vivo* химерные АроА-І-содержащие цитокины (IFN-α, IL15, anti-TGF-β, FGF15/19, инсулин) [139-144] с целью пролонгации действия этих белков в организме и адресной доставки в органы-мишени.

Сродство АроА-I и ЛПВП к клеткам врожденного иммунитета, в частности, к миелоидным клеткам, позволяет рассматривать АроА-I и ЛПВП-как в качестве естественных иммуномодуляторов, так и в качестве средств направленной доставки лекарственных агентов в иммунокомпетентные клетки [145].

Таким образом, терапевтическая платформа на основе ApoA-I и ЛПВП представляется перспективной для разработки лекарственных препаратов нового поколения, обладающих увеличенным временем полужизни, сниженной токсичностью и определённой направленностью действия.

<u>Миметики АроА-I</u>

Учитывая плейотропные свойства ApoA-I в организме, исследователями разрабатываются различные стратегии для повышения его уровня в организме.

Существует несколько способов терапии, имитирующей функцию АроА-I: введение полноразмерного АроА-I, мутантных вариантов АроА-I и пептидов-миметиков ароА-I. Преимуществами миметиков по сравнению с полноразмерным белком АроА-I являются относительная легкость и низкая стоимость синтеза. У большинства миметиков АроА-I нет гомологии с первичной структурой АроА-I, они лишь имитируют его ключевой элемент — 22-мерную амфипатическую альфа спираль, которая как полагают, отвечает за липид - акцепторные свойства АроА-I [146]. Пептиды-миметики АроА-I обладают как атеропротекторными, так и противовоспалительными и антиоксидантными свойствами.

К настоящему времени исследователями получен целый ряд таких миметиков, демонстрирующих как мощные антиатерогенные эффекты [147], так и потенциально применимые для целого ряда серьезных заболеваний, включая онкологические заболевания [148, 149], заболевания ЦНС [150], воспалительные заболевания [151] и астму [152].

АроА-І как платформа для транспорта соединений различной природы В НИИ биохимии также широко исследовался АроА-І в качестве платформы для транспорта различного рода биологически активных соединений [153, 154]. Исследовалась также способность АроА-І взаимодействовать с олигодезоксирибонуклеотидами. Было обнаружено, что АроА-І, ассоциированный со стероидными гормонами, специфически взаимодействует как с одноцепочечными, так и двуцепочечными короткими

GCC богатыми олигодезоксирибонуклеотидами, образуя с ними устойчивые комплексы [155, 156]. Также была рассчитана и константа диссоциации такого комплекса, составившая для комплекса ТГК (тетрагидрокортизол)-АроА-I с ДНК ~ 10⁶ М⁻¹ [157]. С помощью иммуногистохимических методов было обнаружено содержание АроА-I в ядрах клеток многих органов и тканей [158]. Самое высокое содержание АроА-I было выявлено в транскрипционно активном хроматине и ядерном матриксе (100 и 110 нг/мг белка хроматина, соответственно) [159].

Амфифильная природа АроА-I, способность связывать и транспортировать вещества различной природы, а также установленный факт связывания с ДНК побудили нас исследовать этот белок в качестве возможной невирусной платформы для защиты и переноса терапевтических ДНК.

Разработка эффективных способов доставки генов в клетки эукариот платформы является важным шагом К созданию для управления наследственными и приобретенными заболеваниями. За последние 2 десятилетия был достигнут значительный прогресс разработке эффективных векторов для доставки генов in vitro и in vivo.

Системы доставки генов могут быть подразделены на вирусные и невирусные [160]. Вирусная система доставки генов использует генно-инженерные векторные конструкции на основе аденовирусов, ретровирусов, аденоассоциированных вирусов, поксвирусов и других вирусов теплокровных [161]. Хотя перенос нуклеиновых кислот с помощью вирусных векторов является весьма эффективным, высокая иммуногенность и некоторая вероятность инсерционного мутагенеза существенно ограничили их клиническое применение [2, 162-164]. Эти проблемы стимулировали

разработку и исследование невирусных методов доставки генов [165]. Невирусные методы могут быть широко классифицированы на физические и химические методы [166, 167]. Физические методы, такие как микроинъекция [168], электропорация [169], сонопорация [170], «генная пушка» [171], гидропорация [172] небезопасны для клеток мишеней, и их применение *in vivo* ограничено. Поэтому в последнее время внимание исследователей было обращено на разработку более безопасных невирусных систем доставки генов.

Векторы на химической основе обычно состоят из материалов, которые являются значительно менее токсичными и / или менее иммуногенными по сравнению с вирусными векторами и, благодаря использованию адресных лигандов, могут быть нацелены на конкретные популяции клеток. К настоящему времени разработан ряд невирусных систем доставки генов, основанных на использовании катионных липидов (DOPE, DOTAP) [173, 174], катионных полимеров (разветвленных и линейных полиэтилениминах (PEI)) [175, 176], поли-л-лизине (PLL) [177, 178], липид-полимерных гибридов [179], неорганических наночастиц [180] и полипептидных транспортёров [3, 181].

Идеальный транспортёр генов, предназначенный для генотерапии, должен обеспечивать преодоление множества вне- и внутриклеточных барьеров. Результаты исследований последних лет показали, наибольшую трансфецирующую эффективность демонстрируют мультимодульные полипептидные транспортеры, сочетающие в себе различные домены, каждый из которых выполняет определенную функцию. обеспечивающие Такие транспортёры имеют домены, эффективную конденсацию ДНК и защищающие ее от деградации нуклеазами организма; распознавание специфическими рецепторами клетках-мишенях на интернализацию комплекса; домены, способствующие высвобождению генетического материала из эндосомального компартмента в цитозоль и домены, способствующие перемещению ДНК из цитозоля в ядро [182-184].

В последние годы гистоновые белки и полипептидные транспортеры, содержащие в своем составе домены гистонов, широко исследуются в качестве систем доставки ДНК в клетки эукариот.

1.5.1. Трансфекция ДНК с помощью гистоновых белков

Многочисленными исследованиями показано, что белки ядер, такие как гистоны, способны конденсировать ДНК и трансфецировать ими различные культуры клеток [185-187].

Гистоны представляют собой высоко консервативные положительно заряженные белки ядер, связывающиеся с ДНК путем электростатических взаимодействий между отрицательно заряженным фосфатным остовом ДНК и положительно заряженными остатками аргинина и лизина гистона [188]. Гистоны подразделяются на 2 типа - линкерный гистон Н1 и нуклеосомные гистоны Н2А, Н2В, Н3, Н4 [189]. Наличие ДНК-связывающих доменов и сигналов ядерной локализации [190] обуславливают перспективность применения гистонов в качестве безопасного и эффективного средства переноса генов в ядра клеток эукариот.

Трансфекция с помощью линкерного гистона Н1

Многочисленными исследованиями эффективность показана гистонофекции на ряде клеточных линий с помощью гистона Н1 [186, 191-194]. Puebla I. и др. было показано, что H1 может доставлять ДНК, мРНК и сиРНК в иммортализованные и первичные культуры с эффективностью, Ими превосходящей липосомальные системы доставки [186]. сконструирован ряд фрагментов гистона Н1 и была изучена способность каждого конденсировать ДНК и трансфицировать ею клеточные культуры. В результате было установлено, что Н1.4 пептид, содержащий весь С-концевой участок и среднюю часть белка, проявлял наилучшую трансфицирующую способность [186].

Гистон H1 также был использован в качестве составного домена в сложных мультимодульных гибридных конструкциях. Так, Soltani F. и др.

сконструировали мультидоменный полипептид для доставки целевого гена в клетки опухоли молочной железы ZR-75-1 [184]. Полипептид включал в себя 2 тандемно повторяющихся звена усеченного гистона H1 для конденсации ДНК, пептид для адресной доставки в клетки ZR-75-1, рН-чувствительный синтетический пептид KALA для дестабилизации мембраны эндосом, а также сигнал ядерной локализации ВИЧ, необходимый для преодоления барьера ядерной поры. Было показано, что полученный полипептид обеспечивал наибольший уровень трансфекции связанной с ним ДНК в сравнении с трансфекциями ДНК, ассоциированными с мультидоменными полипептидами, в которых отсутствовал хотя бы один из указанных доменов.

Dai и др. сконструировали серию гистон-содержащих полипептидов, состоящих из последовательности гистона H1, рецептора эпидермального фактора роста и эндосомалитического домена [194]. Данный вектор эффективно доставлял ген β-галактозидазы в опухолевые клетки *in vitro*.

Недостатком гистонофекции биомакромолекул с помощью гистона Н1 является необходимость применения дополнительных кофакторов, таких как кальция хлорида и хлорохина [191, 193], последний из которых оказывает токсичное действие *in vivo*.

Трансфекция с помощью нуклеосомных гистонов

Ваlіскі D. и др. на различных культурах клеток было показано, что наилучшими трансфицирующими свойствами обладает гистон H2A [185]. Высокую трансфецирующую способность гистона H2A можно объяснить его структурными особенностями. Гистон H2A - единственный из всех гистоновых белков способен независимо от других гистонов связываться с ДНК [195]. Кроме того, его использование для переноса генов не требует, в отличие от гистона H1 [191, 193], использования дополнительных кофакторов, которые могут оказаться нежелательными при трансфекции в условиях *in vivo*. Ваlіскі было показано, что мутации или удаление N-концевой части гистона H2A приводят к потере его трансфицирующей активности [195], в то время как для аналогичной активности H1 гистона

критичен С-концевой домен. Это может свидетельствовать о том, что гистоны Н1 и Н2 трансфецируют клетки с помощью различных механизмов.

Нуклеосомные гистоны также исследовались в качестве ДНКсвязывающих доменов в составе химерных конструкций. Wang Y. и др. методами генной инженерии сконструировали биомиметический вектор для адресной доставки плазмидной ДНК в клетки опухоли молочной железы MDA-MB-231 [196]. Указанный вектор состоял из следующих доменов: 4 тандемно повторяющихся единиц N-концевого домена гистона Н2А, служащего для конденсирования ДНК; мотива, обеспечивающего адресную доставку ДНК в клетки, содержащие рецепторы HER2; и рН чувствительного синтетического пептида слияния GALA, разрушающего мембраны эндосом и способствующего выходу наночастицы из эндосомы в цитозоль. Было показано, что активность каждого отдельного домена в составе указанного вектора была сохранена, сам вектор не оказывал токсичного влияния на клетки, однако, не все клетки оказались трансфецированы, что, повидимому, было опухолевые связано c тем, что не все клетки сверхэкспрессируют ген HER2.

Demirhan I. и Hasselmayer О. комбинировали различные системы доставки генов, включая гистоны Н3 и Н4 и липосомы [197, 198]. Ими было показано, что максимальной трансфецирующей активностью обладают гистоны Н3 и Н4, а гистон Н2А, в противоположность результатам, полученным Balicki и Beutler, оказался неспособен к трансфекции. Столь противоречивые данные МОГУТ быть объяснены применением исследователями разных условий трансфекции, использованием различных клеточных линий, применением различных источников выделения гистоновых белков и способов их очистки.

Wang C. с коллегами сконструировали химерный полипептид, содержащий в своем составе гистон H4 пшеницы, домен белковой трансдукции TAT (PTD-tat) для проникновения через плазматическую мембрану, и рецептор для лютеинизирующего релизинг гормона (LHRH),

служащий для нацеливания на опухолевые клетки [199]. Полученный химерный полипептид успешно трансфецировал ряд клеточных опухолевых линий.

Катіуа Н. и др. использовали гистон Н3 для доставки плДНК в клетки линии НеLa с помощью осмотического давления [200]. Они показали, что комплексы гистон/ДНК обладали низкой транскрипционной активностью, вероятно связанной с высокой стабильностью комплекса, которая препятствовала нормальному взаимодействию плДНК с транскрипционным аппаратом клетки.

Механизм гистон - опосредованного переноса ДНК

Перенос нуклеосомных гистонов H2A, H2B, H3 и H4 из цитоплазмы в ядро клетки опосредуется наличием в их структуре сигналов ядерной локализации (NLS) [201, 202]. Поскольку в структуре гистона H1 нет NLS, его перенос в ядро, по-видимому, обусловлен наличием большого количества положительно заряженных а.о. в его С-концевом домене, подобном NLS.

Balicki D. с соавт. предположили, что доставка ДНК посредством гистона H2A опосредуется за счет электростатического связывания и конденсации ДНК гистоном и ядерного импорта комплекса гистон/ДНК посредством NLS гистона [195]. Ими было показано, что мутации в N-конце H2A критически сказываются на эффективности трансфекции.

литературе существуют различные мнения 0 механизмах проникновения гистонов в комплексе с нуклеиновыми кислотами в клетки. Hariton-Gazal E. и др. показали, что гистоны H1, H2A, H2B, H3 и H4 проникают в клетки Hela и Colo-205 посредством пассивной диффузии [203]. Проникновение гистонов в эти клетки происходит в условиях низкой температуры, нехватки АТФ, и высокой концентрации сахарозы, что, как известно, блокирует процесс эндоцитоза. Вместе с тем, эндоцитозный путь проникновения комплексов гистон/ДНК нельзя полностью исключить. В частности, было продемонстрировано, что хлорохин, нейтрализующий кислую рH эндоцитозных пузырьков И снижающий деградацию

макромолекул эндосомальных везикул, усиливает трансфецирующую гистона H1[204]. Zaitsev S. И активность др., используя метод флюоресцентной микроскопии, продемонстрировали проникновение комплексов гистон Н1/ДНК в клетки эндоцитозным путем [191].

Wagstaff К. с коллегами для изучения механизма проникновения гистона H2B в клеточное ядро сконструировали ряд димеров, в которых разные части гистона H2B были состыкованы с зеленым флюоресцирующим белком GFP. В результате было показано, что трансдукция H2B зависит от N-концевого района и глобулярного домена, а также что гистоны в комплексе с ДНК проникают в ядро не эндоцитозным путем, а посредством трансдукции [187].

Безопасность применения гистонов для доставки ДНК

Одним из основных недостатков трансфекции ДНК невирусными агентами является их токсичность [205, 206]. Трансфецирующие агенты на основе липосом, такие как Lipofectin, Lipofectamine приводят к грубым морфологическим изменениям в клетках и снижению их жизнеспособности [206, 207], вследствие чего их применение ограничено условиями *in vitro*. Имеющиеся в литературе данные показывают, что применение гистонов в качестве средств доставки генов оказывает менее токсическое действие на клетки, чем использование других невирусных трансфицирующих агентов. Основной проблемой использования гистоновых белков является риск индукции ими иммунного ответа [208], а также их быстрая элиминация из кровотока.

Таким образом, использование гистонов в качестве невирусных систем трансфекции генов должно ограничиваться ситуациями, когда их полезные свойства превышают потенциальный вред. Одним ИЗ подходов К уменьшению иммуногенности гистонов является использование ИХ фрагментов, непосредственно участвующих в трансфекции. Так, Balicki D. и др. на клетках мышиной нейробластомы продемонстрировали, что 37мерный N-концевой пептид гистона H2A обладает столь же эффективной трансфицирующей способностью, как и полноразмерный гистон H2A [195].

1.5.2. Трансфекция ДНК с помощью пептидов, проникающих в клетки

В течение последних двух десятилетий проводятся активные поиски способов доставки генов внутрь клеток с применением положительно заряженных пептидов.

Ввиду недостаточной проницаемости клеточной мембраны для гидрофильных молекул, открытие пептидов, проникающих в клетки [cell-penetrating peptides (CPPs)] явилось важным шагом в разработке способов транспорта внутрь клеток таких терапевтически важных, но плохо проникающих через клеточную мембрану молекул, как пептиды, белки и нуклеиновые кислоты [209].

СРР представляют собой короткие (5-35 а.о.), водорастворимые и частично гидрофобные, богатые основными а.о. (аргинином и лизином) пептиды с положительным зарядом при физиологических значениях рН способные проникать через плазмолемму, так как митохондриальные или ядерные мембраны. Эти свойства демонстрируют **CPP** перспективность применения качестве средств доставки электростатически ИЛИ ковалентно связанных различных НИМИ терапевтических молекул, таких как плазмидные ДНК, олигонуклеотиды, интерферирующие РНК, белки, липосомные наночастицы и др. в клетки эукариот.

Первое указание на то, что белки могут содержать последовательности, ответственные за их транслокацию через клеточные мембраны, возникло из наблюдения за живыми клетками, которые интернализовали фрагмент размером 86 а.о. из белка ТАТ ВИЧ1, активируя транскрипцию, управляемую ВИЧ-LTR [211]. Последующие исследования показали, что ТАТ способен опосредовать трансдукцию гетерологичных пептидов и белков вне

зависимости от концентрации и типа эндоцитоза в 100% клеток-мишеней [212, 213].

СРР могут эффективно транспортировать грузы, молекулярная масса которых в несколько раз выше их собственного веса. Уникальные свойства СРР позволили целенаправленно создавать химерные молекулы, состоящие из СРР и ковалентно связанного с ним фрагмента макромолекулы.

В литературе нет единой классификации СРР, тем не менее, эти пептиды можно разделить на 2 основные группы [214], исходя из происхождения и физико-химических свойств. По происхождению СРР подразделятся на химерные (транспортан), производные белков ТАТ и синтетические из семейства полиаргининов. На основе физико-химических свойств СРР могут быть разделены на: катионные (ТАТ, пенетратин), амфипатические (МАР, МРG, САДУ, Рер-1) и гидрофобные (транспортан 10, С105У), и Вах-ингибирующий пептид (ВІР). Большинство СРР являются катионными (83%), в то время как, только 15% СРР классифицируются как амфипатические [214].

PTD-4

Домен белковой трансдукции (РТD) ТАТ белка ВИЧ (с 47 по 57 а.о.) - один из наиболее хорошо охарактеризованных СРР. РТD является широко испытанным носителем для доставки ДНК, РНК и белков внутрь клеток [215, 216]. Зачастую он входит в состав сложных мультидоменных химерных конструкций [217, 218] или используется для модификации липосом [219].

Но А. и др. синтезировали серию синтетических производных РТD, в которых было увеличено содержание альфа-спиральных участков за счет замен аминокислот на аланин, который, как известно, обладает самой высокой способностью стаилизировать альфа-спирали. Кроме того, пептиды различались по количеству аргининов. Среди них, РТD-4 обладал максимальным количеством остатков аланина и минимальным количеством остатков аргинина. Внесенные изменения привели к значительному повышению трансдукционного потенциала РТD-4, в сравнении с ТАТ

пептидом и серией синтетических производных PTD как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* [220].

На основе анализа этих данных пептид PTD-4 был введён нами в состав проектируемых мультимодульных полипептидных транспортёров в качестве домена, способствующего внутриклеточной интернализации комплекса полипептид/ДНК.

Механизм проникновения СРР внутрь клетки

Механизм проникновения СРР внутрь клетки является предметом дискуссий [221, 222] и зависит от множества факторов, таких как свойств СРР, его концентрации, размера, заряда, гидрофобности, а также типа доставляемого терапевтического груза [223], которые могут изменять путь проникновения СРР.

Для наиболее часто используемых положительно заряженных СРР проникновение внутрь клетки начинается со взаимодействия с отрицательно заряженными компонентами клеточной мембраны - гепарансульфатами.

После связывания с поверхностью клетки, СРР могут проникать в клетку двумя разными способами - *прямым проникновением* через мембрану или эндоцитозом, который является основным путем поглощения большинства СРР.

Концепция *прямой транслокации*, не требующая энергетических затрат, включает в себя различные механизмы, такие как порообразование [224], ковровую модель [225], модель истончения мембраны [226]. В модели порообразования поры формируются при концентрации пептида выше порогового значения, который варьирует в зависимости от СРР. В ковровой модели и модели истончения пептиды не проникают в липидный бислой, а накапливаются на его поверхности, приводя к дестабилизации мембраны и ее последующему истончению. Когда концентрация пептида превышает пороговое значение, происходит транслокация СРР.

Эндоцитоз является энергетически зависимым процессом, при котором плазматическая мембрана складывается внутрь, чтобы внести материал из

внешней среды и абсорбировать клеткой. Существует 3 основных типа эндоцитоза: фагоцитоз, пиноцитоз и рецептор-опосредованный эндоцитоз. В зависимости OT конкретного механизма, рецептор-опосредованный эндоцитоз дополнительно классифицируется на клатрин-опосредованный эндоцитоз, кавеол-опосредованный эндоцитоз И клатрин- и независимый эндоцитоз. Белки клатрин и кавеолин являются необходимым условием для инвагинации мембраны для последующего построения везикул после прикрепления внеклеточной молекулы к мембранному рецептору. Так, было обнаружено, что гибридный белок GST-Tat-GFP проникает в клетки, главным образом, опосредованно кавеолами [227], в то время как ТАТ пептид и гибридный белок Таt-НА2 интернализуются, главным образом, макропиноцитозом [216, 228].

Недостатки применения СРР

Одним из серьезных недостатков СРР является их малый размер, и соответственно, склонность К быстрой деградации ферментами биологических жидкостей организма. Кроме того, СРР могут оказывать повреждение мембран клеток, a также влиять на нормальное функционирование мембранных белков. Было показано, что модельный амфипатический пептид (МАР), известный как один из часто используемых амфипатических СРР, может приводить к перфорации плазматической мембраны [229]. Кроме того, многие СРР происходят от белков, не встречающихся у человека, в связи с чем могут вызывать иммунный ответ. Поэтому, как и в случае применения гистоновых белков, использование СРР для переноса терапевтических молекул должно быть применимо, когда полезные свойства превышают их потенциальный вред.

Создание генно-инженерными методами мультимодульных конструкций, ДНК-связывающие содержащих белки, домены внутриклеточной и внутриядерной локализации, а также длительно белок циркулирующий крови ApoA-I, защищающий плазмы терапевтическую ДНК от деградации нуклеаз крови, позволило бы снизить

токсичность и иммуногенность проникающих пептидов, а также продлить время полужизни трансфицируемой ДНК.

Важным направлением в лечении наследственных и приобретенных заболеваний помимо генной терапии является также разработка генно-инженерными методами терапевтических белковых платформ, содержащих цитокины и другие биологически активные соединения.

1.6. Цитокины

Цитокины - класс эндогенных полипептидных медиаторов, продуцируемых активированными клетками кроветворной и иммунной систем, участвующих в регуляции иммунного ответа, развитии воспаления и гемопоэзе [230]. Действие цитокинов опосредуется специфическими рецепторами на клеточной поверхности, связывание с которыми запускает каскады внутриклеточной сигнализации, что приводит к изменению экспрессии генов, кодирующих поверхностные рецепторы или другие цитокины, тем самым усиливая или подавляя иммунный ответ.

Цитокины подразделяются на интерлейкины (IL), факторы некроза опухоли (TNF), факторы роста (TGF, FGF, VEGF), интерфероны (INF), колониестимулирующие факторы (M-CSF, G-CSF, GM-CSF) и хемокины (MCP, RANTES, MIP).

В настоящее время цитокины находят все более широкое применение в клинической практике для лечения онкологических, инфекционных, иммунодефицитных, аутоиммунных и др. заболеваний. Развитие технологии рекомбинантных ДНК позволило получать цитокины в количествах, необходимых для клинического применения.

1.6.1. Интерферон альфа 2b

Зрелый лейкоцитарный интерферон альфа 2b человека (IFN) — это белок с молекулярной массой 19.3 кДа, состоящий из 165 а.о. В белке

имеются две дисульфидные связи, образованные четырьмя остатками цистеина в положениях Cys1-Cys98 (первая дисульфидная связь) и Cys29-Cys138 (вторая дисульфидная связь) [231], причём последняя важна для проявления антивирусной активности IFN [232].

IFN играет ключевую роль в запуске раннего иммунного ответа, индуцирует продукцию важнейших цитокинов, таких как IFN -гамма и IL2 и обеспечивает связь врожденного и приобретенного иммунитетов. IFN оказывает антипролиферативное [233], противовирусное [234] и иммуномодулирующее действие [235].

Рецепторы к IFN-α экспонируются на многих типах клеток, таких как фибробласты, Т-лимфоциты, макрофаги, дендритные клетки. Все типы IFN индуцируются вирусами, или микробными продуктами через активацию толл-подобных рецепторов (TLR). Связывание IFN 1типа со специфическими поверхностными клеточными рецепторами активирует множество внутриклеточных сигнальных каскадов, которые включают в основном JAK-STAT, MAPK, Crkl и IRS пути [236]. Вместе эти пути приводят к синтезу белков, которые опосредуют противовирусные, иммуномодулирующие и противоопухолевые активности.

Следует отметить, что количество рецепторов к IFN колеблется и высокие дозы IFN снижают их количество. Восстановление экспрессии генов рецепторов происходит на 2-3 сутки, в связи с чем, чаще 2-3 раз в неделю нецелесообразно вводить препараты IFN [237].

Разнообразие функций интерферонов обусловили ИХ широкое качестве действующих применение В медицине В ингредиентов лекарственных препаратов. IFN как в монотерапии, так и в комбинированном лечении с другими препаратами, применяется при лечении множества заболеваний, таких как гепатиты В и С [238], некоторые виды рака: меланома [239], саркома Капоши [240], хроническая миелоидная лимфома [241], ангиобластома [242]. Основным недостатком использования рекомбинантных препаратов IFN в клинической практике является его

короткий период полужизни в крови пациента (4-8 ч) [243], а также вызываемые им серьезные побочные эффекты, особенно со стороны кроветворной и нервной систем [244, 245].

1.6.2. Колониестимулирующие факторы (КСФ)

КСФ представляют собой одну из подгрупп цитокинов, поддерживающих формирование клеток миелоидного и моноцитарного ряда. Среди них выделяют гранулоцитарный КСФ (G-CSF), макрофагальный КСФ (M-CSF) и гранулоцитарно-макрофагальный КСФ (GM-CSF).

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) — фактор, стимулирующий конечную дифференцировку ряда миеломоноцитарных клеточных линий и образование миелоидных колоний клетками костного мозга [246]. G-CSF человека состоит из 174 а.о. и имеет молекулярную массу 19.6 кДа [247]. Молекула G-CSF содержит 2 внутримолекулярные дисульфидные связи между цистеинами, а также один цистеин в положении 17, не формирующий дисульфидную связь [248]. Эндогенный G-CSF человека является О-гликозилированным. Хотя гликозилирование не требуется для проявления биологической активности G-CSF и его связывания со специфическим рецептором, рядом исследований показано, что углеводный остаток существенно повышает физико-химическую стабильность молекулы G-CSF, защищая цистеин-17-сульфгидрильную группу и предотвращая конформационные изменения белка [249-251].

G-CSF синтезируется множеством типов клеток, такими как моноциты/ макрофаги, стромальные клетки, фибробласты, эндотелиоциты. G-CSF человека осуществляет свою биологическую активность за счет связывания со специфическим трансмембранным рецептором, что приводит к активации нескольких сигнальных путей - Jak-STAT, Raf-MAP и PI-3, с последующей стимуляцией пролиферации и созревания нейтрофилов [252]. Биологические эффекты G-CSF сводятся не только к увеличению гранулоцитов в периферической крови, но также к повышению эффекторных функций

нормальных зрелых нейтрофилов и стимуляции к продукции IFN-α, увеличивая способность нейтрофилов к антителозависимому лизису опухолевых клеток.

Препараты рекомбинантного G-CSF широко применяются в онкологии для лечения фебрильной нейтропении, вызванной химио- и радиотерапией. Кроме того, в последнее время появляются данные о возможности его применения в лечении заболеваний нервной системы, таких как болезнь Паркинсона и Альцгеймера [253], для терапии последствий инсультов и инфарктов [254, 255], а также некоторых аутоиммунных состояний [256]. Как и большинство белков небольшого молекулярного веса, G-CSF обладает небольшим временем полужизни в организме, что ограничивает его клиническое применение [257].

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) является цитокином с плейотропным действием, и играет ключевую роль в пролиферации и дифференцировке множества гематопоэтических клеток, особенно моноцитов, гранулоцитов и дендритных клеток [258].

Зрелый GM-CSF человека состоит из 127 a.o., и его молекулярная масса составляет 14.5 кДа [259]. В молекуле GM-CSF есть 2 сайта Nгликозилирования и несколько сайтов О-гликозилирования. В зависимости гликозилирования, молекулярная масса GM-CSF варьировать от 14 до 32 кДа, так, что до 50% состава молекулы может быть представлено углеводной частью [260]. Биосинтез GM-CSF в различных системах экспрессии обусловливает различную степень гликозилирования GM-CSF, отличающуюся от таковой у человека. Например, в $E.\ coli$ GM-CSF синтезируется негликозилированным [261], a дрожжи Saccharomyces cerevisiae синтезируют гипергликозилированный GM-CSF массой 28-32 кДа [262]. Установлено, что с увеличением молекулярной массы снижается биологическая активность GM-CSF [263,264]. Вместе тем, гликозилирование существенно увеличивает время полужизни GM-CSF в

крови - дегликозилированный GM-CSF быстро выводится из кровотока [265, 266].

GM-CSF Bсинтезируется Т-лимфоцитами, моноцитами, фибробластами, тучными, мезотелиальными и эндотелиальными клетками. Связывание GM-CSF со своим специфическим рецептором запускает JAK2 и STAT-5 сигнальные пути, которые регулируют дифференцировку и функциональную активность клеток [267]. Несмотря на высокое сходство первичных структур и пространственных конформаций молекул GM-CSF мышей, **GM-CSF** проявляет видоспецифичность человека И ПО биологическому действию [268].

В клинической практике препараты рекомбинантного GM-CSF применяются в комбинации с химио- и радиотерапией при лечении онкобольных [269] или при трансплантации костного мозга с целью снижения рисков инфекций. Кроме того, в последнее время исследуется возможность использования GM-CSF в лечении нейродегенеративных заболеваний [270], иммунотерапии злокачественных заболеваний [271], при аутоиммунных состояниях [272, 273], терапии травм позвоночника, осложненных повреждением спинного мозга [274], а также в ранозаживлении [275].

В целом, в клинической практике чаще используется G-CSF, чем GM-CSF. Во многом это связано с большей токсичностью GM-CSF и более серьезными побочными эффектами на фоне его применения [276]. Вместе с GM-CSF весьма перспективен В иммунотерапии опухолевых заболеваний и широко используется при создании противоопухолевых GM-CSF усиливает вакцин [277]. антигенпредставляющую функцию моноцитов, стимулирует дифференцировку сторону образования дендритных клеток [278] и в сочетании с IL-3 и IL-4, входит в протокол получения дендритных клеток периферической крови для иммунотерапии рака [279].

В последние 10 лет разрабатывался ряд гибридных конструкций, применение которых позволит избежать использования высоких терапевтических доз рекомбинантного GM-CSF, которые, в сочетании с химиотерапией, оказывают токсическое действие на организм. Примерами таких конструкций являются: GM-CSF слитый с Bcl-XL, в качестве антиапоптотического агента [280]; GM-CSF, слитый с IL-3, для стимуляции гемопоэза [281], гибридные белки GM-CSF с цитокинами IL-2, IL-15, IL-21- в качестве иммуномодулирующих средств [282].

1.7. Современные подходы к решению проблемы пролонгирования функциональной активности цитокин-содержащих фармпрепаратов в организме

В настоящее время существует более 200 терапевтических белков и пептидов, одобренных Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) для широкого спектра [4]. Природные обладают применений лиганды превосходными лекарственными свойствами, такими как селективное связывание с рецепторами и мощная рецепторная активация. Вместе с тем, прямое использование большинства полипептидов в качестве лекарственных препаратов затруднено ввиду их неоптимальных фармакокинетических свойств: быстрому метаболизму, протеолитической деградации, в случае с белками размером менее 70 кДа - восприимчивости к почечному клиренсу [5, 6]. Все это обусловливает весьма ограниченное время полужизни белков и пептидов - от нескольких минут до нескольких часов.

Среди различных фармакокинетических параметров период полувыведения (полужизни) определяется как время, необходимое для уменьшения вдвое концентрации препарата в крови и этот параметр имеет особое значение, поскольку определяет частоту приема препарата [283]. К примеру, период полужизни в сыворотке нативного глюкагонопободного

белка (GLP)-1 составляет всего 1-2 мин [284]. Продление времени жизни лекарства способствует увеличению интервалов между его введением, снижению его дозы и тем самым снижению нежелательных для пациента побочных реакций, особенно в случае с хроническими заболеваниями, требующими пожизненного лечения. В настоящее время разработан целый ряд стратегий продления полужизни и улучшения фармакокинетических свойств нативных и рекомбинантных белков и пептидов [285, 286].

Фармацевтической промышленностью признано, что около 15% утвержденных терапевтических белков модифицированы с целью продления времени их полужизни [287]. Общим принципом большинства стратегий белков полужизни терапевтических является почечного клиренса, главным образом за счет увеличения молекулярного размера (гидродинамического объема), увеличения отрицательного заряда молекулы белка или связывания терапевтического белка с неонатальным Fcрецептором (FcRn). Ниже мы рассмотрим основные существующие стратегии продления полужизни терапевтических белков и (Рисунок 2).



Рисунок 2. Основные стратегии продления полужизни белковых молекул.

1.7.1. Липидные или полимерные системы

Липосомы

Липосомы представляют собой везикулы, состоящие из одной или нескольких липидных мембран, окружающих водную полость. Липосомы используют для инкапсуляции и доставки терапевтических средств уже более 40 лет. Липосомы могут применяться для инкапсуляции как гидрофобных (внутри бислоя), так и гидрофильных (инкапсулированные внутри ядра) соединений. Липосомы применялись для инкапсулированы ряда цитокинов: IFN-γ [288], IFN [289], TNF-α [290], различных IL, GM-CSF [291]. Недостатками липосом является их быстрый клиренс и нестабильность в плазме крови, что ограничивает их время циркуляции [292], а также неспособность к контролируемому высвобождению «груза». Кроме того, липосомы вызывают активацию системы комплимента в организме человека [293, 294]. Все эти недостатки обусловили необходимость разработок других систем пролонгации терапевтических средств.

Полимерные наночастицы (ПН)

ПН - это частицы, полученные из природных, полусинтетических и синтетических полимеров. Большинство распространенных используемых ПН состоит из биодеградируемых полиэфиров, поликеталей, хитозана и модифицированных декстранов. ПН находят широкое применение для доставки различного рода терапевтических агентов, в частности, цитокинов-IL-18 [295], IFN [296], IL-2 [297], GM-CSF [298]. Преимуществом ПН способность контролируемому использования является ИΧ К высвобождению лекарственных средств. Вместе с тем, ограничением этого подхода является денатурация белка в процессе инкапсуляции, что вызывает необходимость оптимизации условий для сведения к минимуму потерь биологических функций цитокина. Кроме того, существует проблема закисления инкапсулированного в ПН цитокина продуктами деградации полимера, что ведет к снижению биологической активности цитокина [299].

1.7.2. Модификации белковых молекул с целью пролонгации их активности

Создание генно-инженерными методами химерного полипептида, в котором фармакологически активный белок/пептид слит с белком плазмы крови, имеющим длительный период полужизни в организме

Сравнительно новым подходом к решению проблемы увеличения полужизни терапевтических белков является получение методами генной инженерии их гибридных форм с длительно циркулирующими в крови белками, такими как, сывороточный альбумин человека (HSA) [10, 300-302], трансферрин [303, 304] и иммуноглобулин [9, 305, 306]. Слитые белки сочетают, как правило, свойства входящих в их состав компонентов. Наиболее часто используемым белком-протектором является *HSA* [10]. HSA составляет основной компонент сыворотки крови и участвует в поддержании ее осмолярности. HSA является естественным транспортером природных молекул, обладает очень низким почечным клиренсом и длительное время циркулирует в крови (19 дней). К настоящему времени создано большое количество химерных белков пролонгированного действия на основе HSA. Так, был получен гибрид IFN-α с HSA – Albuferon (HGSI, Novartis), продуцируемый дрожжами Kluyveromyces lactis. Исследования показали, что применение Альбуферона может сократить IFN- терапию при лечении гепатита С до 1 раза в 2 или 4 недели [302], что является серьезным успехом не только в сравнении с применением не химерного IFN, но также и с пегилированным IFN [307]. В то же время, биоактивность Альбуферона оказалась снижена в 10 раз по сравнению с его нехимерным вариантом [302].

В системе экспрессии *S. cerevisiae* был получен химерный полипептид, содержащий G-CSF, слитый генно-инженерными методами с HSA (Albugranin) [300], который оказывал более пролонгированное действие и более эффективно повышал грануцитарные прогениторы и зрелые нейтрофилы, в отличие от Филграстима, при введении экспериментальным животным.

С. Chaudhury и др. было обнаружено, что длительное время циркуляции HSA в основном определяется его III доменом, который связывается с неонатальным Fc рецептором (рецептором фрагмента IgG) и защищает его от деградации [308]. В дальнейшем, Zhao S. и др. биосинтезом в дрожжах *P. pastoris* получили G-CSF, слитый с доменом III HSA. Полученная химера хоть и обладала меньшим временем полужизни, в сравнении с химерой, содержащей полноразмерный HSA, но, в отличие от последней, на этапах очистки и хранения не образовывала димеров, которые могут вызывать иммунологические реакции [301].

Фрагменты *иммуноглобулинов* IgG1 и IgG4 также широко используются при создании модифицированных цитокинов пролонгированного действия [9, 306]. Иммуноглобулины циркулируют в крови с периодом полужизни 21 день. Их стабильность обусловлена, как и в случае с HSA, связыванием Fcфрагмента IgG с неонатальным Fc-рецептором, препятствующим деградации IgG в лизосомах. Присоединение терапевтических белков к Fc-фрагментам использовалось создания химерных полипептидов ДЛЯ ряда пролонгированного действия. Так, Cox G.N. и др. сконструировали рекомбинантные белки, в которых G-CSF был слит с Fc и C(H) доменами IgG1 и IgG4 человека. Биоактивность белка G-CSF/IgG-C(H) была снижена в 3 раза в сравнении с белком G-CSF/IgG-Fc. Гибридный белок G-CSF/IgG-Fc демонстрировал более медленный клиренс и продолжительное увеличение нейтрофилов, в сравнении с G-CSF после внутривенного и подкожного введения крысам [305].

Трансферрин - гликопротеин сыворотки, транспортирующий железо к клеткам. Трансферрин имеет большой молекулярный вес (80 кДа) и длительное время циркуляции, составляющее 7-10 дней. Трансферрин также используется при создании химерных конструкций для продления времени полужизни терапевтических белков. Ваі Ү. сконструировали гибридный белок G-CSF-трансферрин, разделенный коротким линкером, который сохранил лишь 10% от активности G-CSF. Тем не менее, полученный

химерный белок при пероральном введении мышам оказывал устойчивый миелопоэтический эффект до 3 дней, в то время как эффект от введения нативного G-CSF длился 1 день [304]. Неіпzelman Р. и др. конструировали химеры GM-CSF с трансферрином для разработки на их основе перорально доступных терапевтических средств для лечения нейродегенеративных заболеваний [303].

Одновременно с начатыми нами исследованиями по конструированию и анализу активности рекомбинантных цитокинов человека, слитых с АроА-I, аналогичные по идеалогии работы проводились группой Pedro Berraondo. В частности, эти исследователи конструировали рекомбинантные плазмиды, содержащие в своем составе гибридные гены, кодирующие слитые с АроА-І цитокины: IFN-α [139], IL-15 [140], anti-TGF-β [141], FGF15/19 [143], и гормон инсулин [144]. Ожидалось, что химерные цитокины будут обладать пролонгированным и адресным действием. Методом гидродинамической инъекции данные плазмиды вводились лабораторным мышам, в результате химерных белков осуществлялся de чего синтез novo В печени. Синтезированные химеры демонстрировали улучшенные фармакокинетические свойства, имели сниженную гематотоксичность и более выраженную иммуностимулирующую активность в сравнении с Интересным нативными цитокинами. является факт, TOT что новосинтезированные белки проявляли зачастую новые, несвойственные нативным цитокинам активности.

Серьезной проблемой при конструировании химерных полипептидов является снижение их биологической активности вследствие конформационных изменений, вызываемых белком-пролонгатором в составе химеры. Так, например, Neugranin — рекомбинантный G-CSF человека, слитый с HSA, сохранил лишь 14.3% своей биологической активности [309]. В результате создания химеры IFN с HSA (Albuferon) произошло 10-кратное снижение активности IFN [302].

Сниженный биологический эффект влечет за собой необходимость повышения дозы для достижения терапевтического эффекта, что повышает иммуногенность препарата и увеличивает затраты на лечение. Использование связующих линкеров, разобщающих в пространстве домены химерных белков, может отчасти решать проблему снижения биоактивности последних [310]. В то же время в литературе есть примеры, когда конструирование белков сопровождалось многократным падением биологической активности, даже несмотря на использование подобных линкерных пептидов [311, 312].

Создание генно-инженерными методами химерных полипептидов, содержащих фармакологически активный белок/пептид, слитый с иммунологически и функционально инертным полипептидом-протектором

В последнее десятилетие активно развивается технология создания химерных полипептидов, содержащих в качестве протекторов миметики широко используемого полиэтиленгликоля (ПЭГ). В качестве полипептидовпротекторов используется XTEN, гомоаминокислотный полимер (НАР), эластин-подобный пептид (ELP) или полимер (пролин-аланин-серин)п (PAS). Неструктурированная природа таких полипептидов увеличивает гидродинамический радиус всей молекулы, что приводит к замедлению почечного клиренса и увеличению времени жизни белка.

XTENylation технология использует полипептид массой 83.5 kDa, состоящий из a.o. Ala, Asp, Gly, Pro, Ser, и Thr. Эта аминокислотная обеспечивает свойства композиция полимеру такие как неструктурируемость, неимуногенность, хорошую растворимость И химическую стабильность [313]. Примером препарата, полученного ХТЕХтехнологией, является Somavaratan (VRS-317, Amunix/Versatis), находящийся в данный момент в 3 фазе клинических испытаний, и предназначенный для терапии детей с дефицитом гормона роста [314].

ELPylation является другим способом продления полужизни белков, основанный на слиянии ELP (elastin-like polypeptid) с белком-мишенью. [315]. ELP представляет собой повторяющиеся пептидные единицы,

содержащие последовательности, обычно встречающиеся в эластине. Поскольку последовательности данные ΜΟΓΥΤ деградировать ПОД воздействием эластаз человека, полимеры ELP могут считаться биологически разлагаемыми. Слияние ELP с небольшими терапевтическими белками увеличивает их гидродинамический радиус и повышают полужизни. Так, например, слияние ELP с доменом VHH фактора некроза опухоли (TNF) позволило в 24 раза увеличить время полужизни конструкции после внутривенной инъекции мышам [316].

PASylation технология основана на использании ограниченного набора а.о (Pro, Ala и Ser) для создания гибкой полипептидной цепи различной длины, позволяющей увеличивать период полужизни множества терапевтических молекул [317]. Получение полипептида, состоящего из 600 а.о. PAS с IFN-1 позволило в десять раз увеличить время полужизни IFN-1 у трансгенных мышей [318].

HAPylation представляет собой слияние фармакологически активного белка с синтетическим полипептидом, обогащённым глицином (HAP). Метод HAPylation использовался в целях увеличения периода полужизни anti-HER2 на моделях животных. В результате, HAPylated Fab имел увеличенный вдвое гидродинамический объем и соответственно увеличенное время полужизни [319].

Гликозилированние белков

Многие белки плазмы являются N- или О-гликозилированными. Гликановые фрагменты играют важную роль в молекулярной стабильности и биологической активности белков за счет увеличения их размера и заряда [320]. Гликоинженерия позволила продлить время полужизни множества терапевтически значимых белков [321]. Так, например, были получены гликозилированные производные IFN-а2b, содержащие 4 и 5 N-гликанов, что привело к 25-кратному увеличению периода их полужизни [322].

Увеличение гидродинамического радиуса фармакологически активного пептида или белка путем его химической конъюгации с повторяющимися химическими мотивами (ПЭГ или гиалуроновая кислота)

Пэгилирование

Модификация молекул цитокинов полиэтиленгликолем (пэгилирование) широко используется для увеличения их периода полужизни [323, 324]. В результате такой реакции образуется ПЭГ-модифицированная молекула белка с принципиально новыми физико-химическими свойствами, обладающая высокой гидрофильностью и устойчивостью к протеолизу [325]. С помощью технологии пэгилирования получены использующиеся в настоящее время в клинике препараты Pegasys, PEG-Intron. Pegasys – это модифицированный разветвленным ПЭГ IFNα-2a с размером 40 кДа и временем полужизни в организме пациента - 77 ч [326]. PEG-Intron – модифицированный линейным 12 кДа полиэтиленгликолем IFN-α2b, время полужизни которого составляет со временем полужизни 35 ч [327]. В настоящее время на фармацевтическом рынке имеется также препарат рекомбинантного G-CSF, модифицированный ПЭГ- Neulasta [328]. Хотя ПЭГ и одобрен FDA в качестве безопасного агента [329], пэгилированные биомолекулы имеют существенный недостаток, поскольку вызывают реакции гиперчувствительности через активацию системы комплемента [330], а также индуцируют анти-ПЭГ антитела класса IgM [331]. Кроме того, гетерогенной, часто приводит получению пегилирование К очищаемой смеси продуктов, низкому выходу белка и снижению его биологической активности [332].

Конъюгация с гиалуроновой кислотой (ГК)

ГК является природным полисахаридом, присутствующим в стекловидном теле и хрящах, где она играет ключевую роль в организации внеклеточного матрикса. ГК уникальна тем, что имеет простую линейную структуру повторяющихся несульфатированных дисахаридных звеньев в составе d-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-d-глюкозамина [333]. ГК

считается биосовместимой, неиммуногенной и нетоксичной ввиду её присутствия в организме человека. Используются многочисленные варианты химической модификации ГК с целью приготовления конъюгатов белок-ГК в качестве лекарственного средства пролонгированного действия. Так, например, используя стратегию окисления периодатом, были получены конъюгаты ГК с IFN-α2b. В сравнении с неконъюгированным IFN-α2b, конъюгат, содержащий 6 молекул IFN-α2b, при введении крысам обладал пролонгированным действием и обнаруживался в течение 50-110 ч, в то время как нативная форма цитокина - только 24 ч [334].

<u>Увеличение отрицательного заряда фармакологически активного белка</u>
<u>или пептида реакцией полисиалирования</u>

Полисиаловая кислота (ПК) используется в качестве альтернативы ПЭГ [335]. ПК найдена на поверхности разнообразных эукариотических клеток и, следовательно, является биосовместимым и биоразлагаемым природным полимером. ПК была химически конъюгирована с несколькими терапевтическими значимыми белками, что приводило к увеличению времени их полужизни в кровотоке и не сопровождалось неблагоприятными реакциями для организма. В частности, ковалентное связывание ПК с инсулином позволило существенно продлить время его действия в организме [336].

<u>Химическая конъюгация пептидов с длительно циркулирующими</u> <u>белками плазмы крови</u>

Ковалентная связь белкового или пептидного препарата с белками крови, такими как: альбумин, трансферрин, иммуноглобулин - может быть достигнута путем их химического присоединения. Так, например, путем сайт направленной конъюгации к НЅА был присоединен пептид (34 а.о.) с анти-ВИЧ активностью [337]. На макаках-резус этот химически конъюгированный пептид продемонстрировал 9-кратное увеличение периода полужизни в сравнении с его неконъюгированной формой.

Нековалентное связывание пептида или белок-связывающего домена с длительно циркулирующими белками плазмы крови

Фармакологически активные белки могут быть присоединены к длительно циркулирующим белкам (альбумин, трансферрин, иммуноглобулин) нековалентными связями, т.е. конъюгацией.

Нековалентное связывание белками \mathbf{c} сыворотки позволяет терапевтическому белку диссоциировать от связанного с ним белка. взаимодействие Нековалентное быть может достигнуто путем конъюгирования цепи жирной кислоты с терапевтическим белком. Такой подход был применён к получению инсулина длительного действия (инсулин детемир), модифицированного жирной кислотой, позволяющей ему обратимо связываться с участками связывания длиноцепочечных жирных кислот альбумина и тем самым продлять время его полужизни [338].

Поскольку настоящая работа была посвящена созданию методами генной инженерии химерных полипептидов, представляющих собой по сути бинарные и мультидоменные конструкции, представлялось важным более детально рассмотреть основные способы получения таких конструкций, возможные проблемы, сопровождаемые их получением и пути их решения.

1.8. Способы получения рекомбинантных химерных белков

После воспроизведения природных белков с помощью технологии рекомбинантной ДНК, усилия исследователей стали направляться на разработку способов получения рекомбинантных химерных белков, не существующих в природе, но обладающих улучшенными и множественными свойствами [339]. Гибридные белки являются продуктами экспрессии гибридных генов, состоящих из двух или более генов или их фрагментов. Гибридные гены кодируют комбинации функционально разных доменов в одной полипептидной молекуле, что упрощает их единовременное

производство, а также доставку в качестве лекарственных средств. В результате использования этого подхода могут быть созданы более совершенные биомолекулы с новыми функциями, не существующие в природе, что обуславливает привлекательность такого подхода для медицины.

На ранних этапах конструирования химерных белков создавались пептидные «хвосты» (tags) для одноэтапной очистки с использованием методов аффинной хроматографии [340]. Флюоресцентные белки, такие как зеленый флюоресцирующий белок GFP, синий — CFP, жёлтый — YFP, красный — RFP и др. также широко применяются в качестве составных элементов гибридных белков, и используются в качестве флуоресцирующих маркеров для мониторинга сигнальных молекул или как репортеров, для определения уровня экспрессии анализируемых гибридных генов [341, 342]. Гибридные белки имеют широкий спектр применения во множестве областей - биодетектировании, молекулярной биологии, текстильной, пищевой и биофармацевтической промышленностях [339, 343, 344].

При конструировании гибридных белков исследователям необходимо учитывать ряд параметров. Для проявления своей биологической активности белкам иногда необходим свободный N- или С-концевой участок полипептидной цепи. Если активный центр белка расположен в N-конце, то тогда только его С-конец может использоваться для состыковки со вторым белком (пептидом), входящим в состав химеры [345]. Ярким примером этому служит работа Ding Y., в которой продемонстрирована важность позиции слияния при конструировании гибрида мозгового натрийуретического пептида (BNP) с HSA. Все пептиды, у которых на N- конце был расположен BNP, были лишены значительной части биологической активности, в то время как пептиды, в которых BNP находился на С-конце, были активны практически в равной степени с природным BNP, и имели более длительный период полужизни в организме [346].

Существует несколько способов конструирования синтетических слитых белков. Тандемное слияние — это способ состыковки 2-х и более генов в одну полинуклеотидную цепь, кодирующую полипептид, состоящий из 2-х и более белковых доменов, соответственно. Гены, объединённые в составе полинуклеотидной цепи экспрессируются в виде одной полипептидной цепи в подходящем организме-хозяине. Для поддержания функциональности белковых доменов в подобного рода конструкциях зачастую необходим связующий линкер. Выбор и рациональный дизайн пептидного линкера является важным вопросом в технологии получения рекомбинантных слитых белков. Отсутствие связующего линкера может приводить ко множеству нежелательных результатов, таких, как: неправильному сворачиванию слитых белков [347], низкому выходу белка или нарушению/снижению его биологических функций [309, 348].

Связующие линкеры можно разделить на 3 группы: гибкие, жесткие и расщепляемые (протеаза-чувствительные) [310]. Гибкие линкеры обычно состоят из небольших неполярных или полярных а.о., таких как глицин, серин и треонин. Наиболее распространенным является (Gly4Ser)n линкер, в котором п – количество повторов мотива [349, 350]. Такой гибкий линкер конформацию, способствующую быстрому может принимать взаимодействию между различными частями слитого белка. Гибкие линкеры допускают в определенной степени движения и поэтому применяются для объединения функциональных доменов, которые требуют междоменных взаимодействий. Из-за своей гибкости такие линкеры неструктурированы и, таким образом, обеспечивают ограниченное разделение доменов. В литературе есть несколько примеров, когда использование гибких линкеров приводило к низкой экспрессии гибридного гена и потере или снижению биологической активности химерного белка. Примерами таких конструкций могут служить, например, консенсусный IFN-а, слитый с HSA посредством Gly-Gly-Gly-Ser линкера [311]; химера, в которой иммуноглобулин Gсвязывающий белок G, был слит посредством GGGGS линкера с

люциферазой из Vargula [351]. Жесткие линкеры применяются в случаях, когда пространственное разделение доменов имеет решающее значение для их стабильности и биологической активности [352]. К таким линкерам относят альфа-спиральные линкеры - A(EAAAK)nA [353] и пролин-богатые последовательности - (XP)n, где X - а.о. – аланин, лизин или глутаминовая кислота [354]. Стабильная связь между функциональными доменами обеспечивает продление времени полужизни химерного белка в плазме, тем не менее, она зачастую приводит к снижению биологической активности, вследствие взаимного влияния на конформации друг друга [352, 355].

В то время как гибкие и жесткие линкеры являются стабильными іп vivo, протеаза-чувствительные линкеры чувствительны к протеазному расщеплению или восстановлению дисульфидных связей, что упрощает расщепление линкеров и высвобождение доменов, входящих в состав химеры [356, 357]. Так, к примеру, была создана химера G-CSF-трансферрин, собой дисульфидным соединенные между линкером, содержащим внутримолекулярную дисульфидную связь, образованную между двумя остатками цистеина, а также чувствительную к тромбину последовательность между двумя остатками цистеина. Обработка in vitro этой химеры тромбином приводила к расщеплению чувствительной к тромбину последовательности и высвобождению G-CSF [356].

Доменная вставка – это тип химерных конструкций, при котором один домен (донор) содержится внутри другого (реципиентного) белка. Aroul-Selvam R. было показано, что 9% мультидоменных белков содержат вставки, особенно α/β классы белков [358]. Разработка химерного белка в форме доменной вставки является сложной задачей, поскольку встройку донорского домена в белок-реципиент необходимо провести таким образом, чтобы не нарушить фолдинг как донорского домена, так и реципиентного белка. Несмотря стратегия на трудности, эта часто используется при конструировании гибридных белков, особенно тех, которые используют

переключающееся поведение, где конформационные изменения в одном домене модулируют функцию другого [359].

Посттрансляционная белковая конъюгация является альтернативным методом создания слитых белков и заключается в (био)химическом связывании индивидуальных белков после их индивидуального синтеза. Посттрансляционное слияние может быть использовано в первую очередь для конструирования мультикомпонентных систем, поскольку генно-инженерный синтез может приводить, во-первых, к получению гибридных генов с низким уровнем экспрессии, во-вторых, к получению химер, в которых вследствие взаимного конформационного влияния доменов может снижаться или полностью нарушаться их функции.

Технология получения рекомбинантных полипептидов будет иметь все большее значение при создании новых терапевтических белков и усовершенствовании современных белковых препаратов. Рациональный дизайн химерных белков с желаемыми свойствами и предсказуемым поведением, остается сложной задачей. При конструировании химерных белков может возникнуть целый ряд проблем, таких как низкий выход белка, потеря или существенное снижение их биологической активности, а также приобретение новых, неспецифичных свойств белков.

До недавнего времени дизайн гибридных белков был неопределенным, интуитивным и эмпирическим, результатами чего являлись вышеуказанные проблемы или неожиданные находки. Применение вычислительных программ, предсказывающих структуру, рациональный дизайн химерных белков и возможное участие в различных сигнальных путях организма позволит конкретизировать структуру и цели конструирования химерных белков, тем самым сокращая сроки их создания, исследования биологических свойств и внедрения в практику.

1.9. Продуценты цитокинов человека

В существующих на сегодняшний день технологиях производства рекомбинантных белков в качестве микроорганизмов-продуцентов используются, главным образом, штаммы $E.\ coli$ и культуры клеток эукариот.

Escherichia coli изучается в течение многих лет как модельный бактериальный организм, который является одним из самых популярных хозяев для продукции гетерологичных белков [360] благодаря короткому жизненному циклу, использованию несложных генетических манипуляций при работе с ним, и применению дешевых культуральных сред. Рекомбинантные терапевтические препараты, полученные биосинтезом в E. coli, составляют почти 40% от всего рынка рекомбинантных белков.

В настоящее время существуют несколько коммерческих препаратов рекомбинантного IFN-α2b, полученных биосинтезом в *E. coli:* Intron A (Merck Sharp & Dohme Corp., США), Viraferon (Schering-Plough Corporation, Бельгия), Реаферон (Вектор-фарм, Россия).

Е. соli, как продуцент, также широко используется для продукции колониестимулирующих факторов — G-CSF [361, 362], GM-CSF. Биосинтезом в *E. соli* получен используемый в клинической практике рекомбинантный G-CSF человека (филграстим) [363], выпускаемый под торговыми названием Neupogen (Amgen, США); рекомбинантный GM-CSF (молграмостим) [364], известный под торговым названием Leucomax (Sandoz/Schering Plough, Швейцария). Молграмостим не был одобрен FDA в США в связи с высокой частотой побочных эффектов [365].

Токсичность GM-CSF по отношению к клеткам хозяина-продуцента является серьезным препятствием для получения высоких уровней выхода этого цитокина. Накопление новосинтезированного GM-CSF в цитоплазме клеток $E.\ coli$ приводит к остановке роста при индукции и лизису клеток, что неизбежно ведет к низкому выходу белка [366].

Использование E. coli для получения рекомбинантных цитокинов имеет недостатков, таких как: приобретение синтезируемыми белками ряд модификаций, несвойственных эукариотам структурных таких как N-концевого ацетилирование, наличие метионина, приводящих К существенному снижению функциональной активности модифицированных молекул; аккумуляция белка при его высоком уровне синтеза в телах включения в нерастворимой форме, что влечет за собой последующую сложную многостадийную дорогостоящую процедуру его приводящую к снижению или потере биологической активности [367]. Кроме того, в препаратах рекомбинантных IFN и G-CSF, выделенных из телец включения, наряду с модифицированными молекулами присутствуют примеси молекул белков в денатурированной форме либо с неправильно замкнутыми дисульфидными связями, которые могут иметь сниженную активность и восприниматься организмом как чужеродные белки и индуцировать иммунный ответ [368]. Необходимость очистки OT отсутствие свойственных эндотоксинов И ЭТИМ цитокинам посттрансляционных модификаций, таких как О- и N-гликозилирование, также являются существенными недостатками использования данного продуцента.

Культура клеток млекопитающих также широко используется для продукции цитокинов. Так, гликозилированный биологически активный IFN-α2b человека был получен в культуре клеток мышиной миеломы [369]; на линии клеток НЕК293 [370]. При использовании культуры клеток яичника китайского хомячка (СНО) получен применяемый в клинике препарат рекомбинантного G-CSF - Ленограстим (Granocyte, Sanofi-Aventis, Франция) [371]. Использование линий клеток млекопитающих для продукции GM-CSF осложнено тем, что GM-CSF в них продуцируется с различной степенью гликозилирования, что может влиять на фармакокинетику, антигенность и токсичность [266]. В целом, использование клеток млекопитающих в качестве продуцентов рекомбинантных цитокинов представляется

трудоемким и не очень перспективным направлением, ввиду длительности процесса культивирования (8-10 суток), требующего особых условий аэрации и поддержания концентрации CO₂, использования дорогостоящих сред, строгого соблюдения стерильных условий культивирования, а также привлечения к производству высококвалифицированного персонала.

наиболее распространенными Из дрожжевых продуцентов получения рекомбинантных цитокинов являются Saccharomyces cerevisiae. В коммерчески доступным препаратом момент полученным в данном продуценте, является гликозилированный GM-CSF – сарграмостим [262], известный под торговым названием Leukine (Immunex, S. США). Биосинтезом В cerevisiae получен Albugranin [300], представляющий собой химерный G-CSF, слитый с HSA. Вместе с тем, данный продуцент имеет серьезный недостаток — синтезируемые в S. cerevisiae белки претерпевают гипергликозилирование, при котором каждый олигосахарид может содержать более 50 маннозных остатков. Избыточное гликозилирование оказывает существенное влияние на фармакокинетику, биологическую активность, токсичность и антигенность рекомбинантного белка [263, 372].

Одним из наиболее перспективных подходов В производстве функционально значимых рекомбинантных белков эукариот является использование для экспрессии кодирующих их генов клеток Pichia pastoris [373-375]. P. pastoris являются непатогенными для человека и животных микроорганизмами и не содержат токсических и пирогенных соединений, что позволяет использовать эти микроорганизмы в качестве продуцентов рекомбинантных белков, применяемых в клинической практике. Уже в ближайшие годы P. pastoris может войти в тройку наиболее широко используемых платформ продукции фармацевтических белков наряду с клетками китайского хомячка и $E.\ coli.$

В качестве достоинств работы с метилотрофными дрожжами *P. pastoris* следует указать следующие:

- 1. Простота генетических манипуляций, используемых в клонировании генов в клетках *P. pastoris* [376].
- 2. Применение для трансформации дрожжевых клеток интеграционных векторов, содержащих сильный регулируемый промотор гена метанол-индуцируемой алкоголь-оксидазы (*AOXI*) [377].
- 3. Возможность множественной встройки чужеродных генов в геном P. pastoris, что обеспечивает, как правило, высокий уровень синтеза и секреции целевых рекомбинантных белков [378-380].
- 4. Высокая генетическая стабильность рекомбинантных штаммовпродуцентов вследствие встройки клонируемых в них целевых генов в геном [376].
- 5. Культивирование дрожжей осуществляется с применением недорогих сред и с малыми затратами энергии, поскольку клетки растут при 25-28°C, достигая высоких плотностей (до 100г/л или 500 ОЕ₆₀₀/мл) [381, 382].
- 6. Способность осуществлять посттрансляционные модификации белков, свойственные высшим эукариотам, такие как: протеолитический процессинг, фолдинг, образование дисульфидных связей и гликозилирование [383], максимально приближенное к таковому у человека [384];
- 7. Применение специальных типов экспрессирующих векторов, обеспечивающих получение целевого рекомбинантного белка в секретируемой в культуральную среду форме, что существенно упрощает процессы выделения и очистки целевого белка [384, 385].

Вышеперечисленные преимущества дрожжей P. pastoris, демонстрируют их перспективность в качестве продуцента терапевтически значимых рекомбинантных белков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящий обзор представлен четырьмя большими разделами: раздел, посвященный изучению многообразия функций АроА-I в организме и возможностям его использования в качестве платформы для транспорта лекарственных соединений; раздел, описывающий невирусные способы доставки генетического материала в клетки млекопитающих; раздел, посвященный функциональной характеристике широко используемых в клинике цитокинов человека (IFN, G-CSF, GM-CSF) и наиболее распространенных продуцентах этих цитокинов и раздел, описывающий современные стратегии создания на основе цитокинов фармпрепаратов нового поколения, обладающих пролонгированным действием.

Вышеизложенные литературные данные, касающиеся структуры и функций АроА-І и возможных практических приложений его использования в медицине и биологии, позволяют сделать следующее заключение. Аполипопротеин А-І является сложным и многофункциональным белком плазмы крови. Его участие в различных физиологических процессах организма выходит за рамки обеспечения обратного транспорта холестерина. В настоящее время появляются все более новые данные о вовлечении АроА-І и ЛПВП в различные метаболические пути. Активно изучается возможность использования АроА-І и ЛПВП в качестве новой наноплатформы для лекарственных соединений различной природы транспорта ДЛЯ иммунотерапии.

Вторая часть литературного обзора посвящена характеристике способов доставки генов в клетки эукариот и рассмотрены различные способы невирусной доставки нуклеиновых кислот, включая пептиды, проникающие в клетки и гистоновые белки. Одним из перспективных направлений является создание химерных мультидоменных полипептидов, которые бы сочетали различные модули для эффективного проникновения внутрь клетки.

В третьей и четвертой части литературного обзора рассматриваются отдельные широко используемые в клинике цитокины человека, а также современные способы пролонгации их действия в организме. Наиболее распространенными подходами к пролонгации терапевтических белков являются пэгилирование, создание липосомальных форм, включение в наночастицы и прочие. Сравнительно новым подходом к решению данной проблемы является создание генно-инженерных химерных полипептидов на основе длительно циркулирующих в крови белков. Это направление было наиболее детально рассмотрено В настоящем обзоре. Традиционно используемыми белками-протекторами плазмы крови являются альбумин, трансферрин и иммуноглобулины. Несмотря на очевидные достоинства АроА-І как белка-транспортера, в настоящее время в литературе практически отсутствуют работы, посвященные его использованию в качестве протектора фармакологически значимых пептидов в составе химерных конструкций. В вышеизложенным, представлялось актуальным связи с И значимым исследовать АроА-І в качестве платформы для доставки и пролонгации активности терапевтических макромолекул.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы и реактивы

2.1.1. Реактивы

В работе использовали следующие реактивы и материалы: агароза, 2х-кристаллизованный, N,N'-метилен-бисакриламид акриламид 2xдезоксирибонуклеозид-5'кристаллизованный, бромистый этидий, трифосфаты, бычий сывороточный альбумин (БСА), додецилсульфат натрия (SDS), персульфат аммония, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), бромфеноловый синий, ксиленцианол, агар, сахароза, 2-меркаптоэтанол, диметилсульфоксид (DMSO), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), глицерин, глюкоза, Твин-20, Тритон Х-100 (Биолот, Россия), Трисгидроксиметиламинометан (Трис), изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), ТФУ, реагент ХТТ, пропидий йодид (Sigma-Aldrich, США), α-циано-4-гидроксикоричная кислота (Bruker, Germany), трипсин (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega, США), дитиотреитол, йодацетамид (BioRad, США), ацетонитрил (Merck, США), ДМЕМ, эмбриональная телячья сыворотка (FBS), Игла МЕМ с L-глютамином (Биолот), RPMI-1640, LPS E. coli 0114:B4 (Sigma-Aldrich), Lipofectamine 2000 (Invitrogen Life Technologies, США), пенициллин-стрептомицин, бензилпенициллин, канамицин, зеоцин. Пептон, дрожжевой экстракт, бакто-триптон, агар-агар (Difco, Великобритания). Микропористые нитроцеллюлозные капроновые И мембраны (Millipore, США). Мочевина, хлороформ, этанол, фенол, кислоты, соли (квалификации «ХЧ» или «ОСЧ») (Реахим, Россия). Олигонуклеотиды были синтезированы в ООО «Биосинтез» (Новосибирск, РФ). Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду, растворы стерилизовали автоклавированием или фильтрованием через одноразовые микропористые мембранные фильтры с размером пор 0.22 мкм.

2.1.2. Хроматографические сорбенты для очистки белков:

- *а)* ионообменные сорбенты: YMC BioPro Q30 (YMC Europe GmbH, Германия); Macro-Prep DEAE Support и Macro-Prep CM Support (Bio-Rad, США); DEAE- и SP-Sepharose FF (GE Healthcare, Швеция);
- б) сорбент для обращенно-фазовой хроматографии: SupelpakTM-2SV (Supelco, США).
- *в)* сорбент для аффинной хроматографии: Ni-NTA сефароза 6B-CL (Qiagen, Германия).

2.1.3. Ферменты:

РНКаза A, ДНКазаI, ДНК-полимераза Red-Tag (Sigma-Aldrich, США), Phusion ДНК-полимераза, ДНК-лигаза бактериофага Т4 (Thermo Fisher Scientific, США), эндонуклеазы рестрикции (Сибэнзим, РФ).

2.1.4. Рекомбинантные белки-стандарты:

IFN-α2b человека (MCO1) code: 95/566; бактериальный GM-CSF (Sigma-Aldrich); бактериальный GM-CSF, любезно предоставленный в.н.с. ГНЦ ВБ «Вектор», д.б.н. Гилевой И.П.

2.1.5. Буферные системы и среды:

Буфер ТЕ (10мМ Трис-HCl, рН 7.6, 1мМ ЭДТА);

Трис-ацетатный буфер (1x) (0.04 M трис-ацетат, pH 7.6, 0.002 M ЭДТА);

5х буфер для нанесения образцов в агарозные гели или SDS-PAG: 40% сахароза (или 15% фиколл 400 или 30% глицерин), 0.25% БФС, 0.25% КЦ;

Буфер для лизиса эритроцитов (154.4 мМ хлорида аммония, 10 мМ бикарбонат калия и 97.3 мкМ ЭДТА тетранатриевая соль);

Буфер №1 (25мМ Трис-HCl, 0.150 M NaCl, 0.1% Твин-20, pH 8.0); Буфер №2 (25 мМ Трис-HCl, 10 мМ ЭДТА, 50 мМ глюкоза, pH 8.0); Буфер №3 (25мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, pH 8.0); Буфер №4 (50 мМ Трис-HCl, 2 мМ ЭДТА, 7М мочевина, рН 7.6);

Буфер №5 (25 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА, 0.02% Твин-20, рН 4.5);

Буфер №6 (25 мМ ацетат натрия, 1 мМ ЭДТА, рН 4.5);

Буфер №7 (10 мМ фосфат натрия, 1 мМ ЭДТА, рН 7.5);

Среда LB (на 1л: бакто-триптон 10г, бакто-дрожжевой экстракт 5г, NaCl 10г, pH 7.0);

Среда YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% глюкоза);

Среда YPD агаризованная (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% глюкоза, 2% агар);

Среда YPDS (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% глюкоза, 1 М сорбитол);

Среда ВМGY (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 1.34% YNB, 4×10^{-5} биотин);

Среда BMM2 (1.34% YNB, 4×10⁻⁵% биотин, 1% метанол);

Среда BMM10 (1.34% YNB, 4×10⁻⁵% биотин, 5% метанол).

2.1.6. Штаммы микроорганизмов, вирусов, плазмидные вектора, праймеры

Штаммы *Escherichia coli*: шт. BL21 (DE3): F⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB⁻ mB⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) (Novagen, США);

IIIT. TOP10: F- mcrA $\Delta(mrr-hsd\text{RMS-}mcr\text{BC})$ $\phi80lacZ\Delta\text{M}15$ $\Delta lacX74$ nupG recA1 araD139 $\Delta(ara-leu)7697$ galE15 galK16 rpsL (Str^R) endA1 λ^- («Invitrogen», CIIIA).

Штаммы Pichia pastoris: шт. X33; шт. GS115 («Invitrogen», США)

Штамм вируса везикулярного стоматита лошадей: (VSV, ГКВ № 600, штамм «Индиана», депонированный в Государственной коллекции вирусов НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского).

<u>Плазмидные векторные ДНК</u>: pJExpress401 (DNA2.0, США); pPICZαA (Invitrogen, США).

Праймеры:

№386-F: 5'-CAGTCGACATATGAGCGGCCGTGG-3'

№387-R: 5'-CAGAATTCCTTACCTTTCGCCTTGTGGT-3'

№419-F: 5'- CGTGCAGCAGCTCGTC-3'

№420-R: 5'-CAGTCTCGAGCTTACCTTTCGCCTTGTG-3'

№423-F: 5'-TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3'

№424-R: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

AOX1-F: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'

AOX1-R: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

2.1.7. Линии культур клеток (из музея культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор», п.г.т. Кольцово, Р Φ):

Линия клеток почек эмбрионов человека - НЕК 293Т; линия клеток почек быка - MDBK; линия клеток эритролейкемии человека - TF-1.

2.1.8. Лабораторные животные

В работе были использованы лабораторные животные, предоставленные виварием Института Цитологии и Генетики СО РАН (ИЦиГ СО РАН): самцы крыс Вистар массой 200–250 г.; самцы беспородных мышей СD-1 (массой 25-35 г).

Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и стандартному гранулированному корму. Работа с животными проводилась в строгом соответствии с Приказом Минздрава РФ № 199н от 1 апреля 2016 г. «Надлежащая лабораторная практика» и положениями Директивы 2010/63 ЕС Европейского союза о защите животных, используемых в научных целях и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях.

2.2. Методы

2.2.1. Выделение ЛПВП и АроА-І из плазмы крови

Ультрацентрифугирование липопротеинов

ЛПВП выделяли из плазмы крови человека с помощью изоплотностного ультрацентрифугирования в растворах КВг [386]. Метод основан на различиях в плотности частиц липопротеинов и скорости их флотации. Ультрацентрифугирование проводили в роторе 75 Ті на ультрацентрифуге «Optima L-90K, Beckman- Coulter» (Австрия) в течение 18-24 ч при 4°C и ускорении 10500g. Выделенную фракцию ЛПВП диализовали против трех смен ФСБ при 4°C.

Делипидирование фракции ЛПВП

В диализованный раствор ЛПВП вносили 1М трис- гидрохлорид с рН 9.4 до конечной концентрации 100 мМ. В забуференный раствор вносили два объема смеси бутанол-диизопропиловый эфир (соотношение 1:3) и перемешивали в течение 3-4 ч при медленном вращении ротатора при комнатной температуре. Далее смесь центрифугировали при 3000g в течение 5 мин и отбирали водную фазу, содержащую делипидированные белки.

Высаливание АроА-І сульфатом аммония

В растворы делипидированных белков плазмы крови вносили различные количества сульфата аммония от 5 до 60% (масса/объем), выдерживали при 4°С в течение 1 ч, затем осаждали образовавшиеся преципитаты белка центрифугированием при 16000g в течение 10 мин. В целях избирательной преципитации подбирали концентрацию сульфата аммония, при которой достигается наиболее полное освобождение от НSA. Для максимальной очистки от HSA преципитаты промывали 30% раствором сульфата аммония при комнатной температуре и интенсивном перемешивании в течение 1 ч.

Хроматографическая очистка АроА-І

Очистку АроА-I проводили анионообменной хроматографией на смоле YMC BioPro Q30. АроА-I- содержащие сульфат-аммонийные преципитаты растворяли в натрий-фосфатном буфере, рН 7.4, и после диализа против этого же буфера наносили на колонку со смолой YMC BioPro Q30. АроА-I элюировали с колонки градиентом NaCl (50-500 мМ NaCl) в этом же буфере.

2.2.2. Молекулярно-биологические методы анализа ДНК и белков 2.2.2.1. ПЦР

Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР), использовали амплификатор Thermal Cycler BIS (BIS, РФ). Реакцию проводили в пластиковых пробирках объемом 0.2 мл. Выбор олигонуклеотидных праймеров проводили с помощью программы Vector NTI (версия 7.0), с помощью этой же программы определяли температуры отжига праймеров с матрицей-мишенью при концентрации каждого праймера в реакционной смеси 0.2 мкМ. Для точного копирования ДНК-мишеней использовали набор для амплификации ДНК фирмы Finnzymes (Финляндия), содержащий термостабильную химерную ДНК-полимеразу «Phusion» с корректирующей активностью.

Для подтверждения вставки целевой ДНК в плазмиды и отбора рекомбинантных клонов методом ПЦР колоний использовали REDTaq-ДНК полимеразу. Для каждого вида амплифицируемых мишеней подбирали время полимеризации и количество циклов. Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1.5-2% агарозном геле.

2.2.2.2. Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции

Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции проводили согласно инструкциям фирмы-изготовителя ферментов. Гидролизованную ДНК анализировали в 0.8-1.2% агарозных гелях в зависимости от размера анализируемых рестриктных фрагментов. Полученные фрагменты ДНК использовали в дальнейшей работе.

2.2.2.3. Лигирование фрагментов ДНК с использованием ДНК-лигазы бактериофага Т4

Лигирование фрагмента ДНК с плазмидой-вектором по липким концам проводили согласно инструкции фирмы-изготовителя ДНК-лигазы бактериофага Т4. Лигирование проводили, как описано в [387] в течение 10—14 ч в МС2 DNA Thermal Cycler (DNA technology, РФ) с последовательной сменой циклов: 1 мин при 10°С и 1 мин при 30°С. Молярное соотношение встраиваемого фрагмента ДНК с вектором составляло 5:1. Полученные реакционные смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* методом электропорации.

2.2.2.4. Электрофорез ДНК в агарозном геле

За основу брали приемы и методы, описанные в монографии Маниатиса и др. [388]. Результаты электрофореза регистрировали фотографированием геля при освещении ульрафиолетом (длина волны 302 нм) с помощью системы гель-документирования Gel Imager-2.

2.2.2.5. Метод задержки ДНК в геле

Способность рекомбинантных белков связывать ДНК с образованием комплексов ДНК-белок оценивали методом задержки ДНК в геле (гельретардации). Линеаризованную ДНК плазмиды рЕGFP-N1 (50 мкг/мл) смешивали с исследуемым белком в массовом соотношении ДНК/белок от 1:0.5 до 1:14 при общем объеме реакционной смеси 15 мкл в буфере №1. Перед нанесением в карманы агарозного геля, в реакционную смесь вносили до 10% глицерина. Комплексы готовили и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Электрофорез проводили в 0.8% агарозном геле 45 мин при 60 В. О формировании и снижении скорости миграции комплексов судили по локализации окрашенной бромистым этидием ДНК в агарозном геле.

2.2.2.6. Электрофорез белков в денатурирующих условиях в пластинах полиакриламидного геля (SDS-PAG)

Анализ размера белков проводили с помощью электрофореза в вертикальных пластинах 12% SDS-PAG в денатурирующих условиях, по Леммли [389], с последующей их окраской. Гели документировали с помощью системы гель-документирования Gel Imager-2.

<u>2.2.2.7. Электрофорез белков в нередуцирующих условиях в</u> пластинах *PAG*

Анализ препаратов рекомбинантных белков на возможное присутствие в их составе ковалентно «сшитых» дисульфидными связями форм проводили с использованием электрофореза белка в 12% SDS-PAG в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях следующим образом. Образцы анализируемых белков кипятили в течение 5 минут в 4-х буфере для денутаруции белков, в присутствие или отсутствие 5% (V/V) 2-МеЕtOH и анализировали электрофорезом в 12% SDS-PAG. Белки в геле окрашивали кумасси G250.

2.2.2.8. Иммуноблоттинг белков

Иммунохимическое выявление целевых белков в пластинах SDS-PAG после завершения электрофореза проводили методом иммуноблоттинга [390]. Электроперенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану проводили полусухим методом на аппарате «Эконоблот» НПО «МедБиоСпектр» при силе тока 100 мА в течение 1 часа.

2.2.2.9. Твердофазный иммуноферментный анализ белков

Концентрации rhIFN и rhIFN-ApoA-I в сыворотке экспериментальных животных при проведении экспериментов по их фармакокинетике определяли с помощью набора «альфа-ИНТЕРФЕРОН-ИФА-БЕСТ» фирмы Вектор-Бест (Россия). Оптическую плотность регистрировали на планшетном фотометре Multiskan Ascent (США).

2.2.2.10. Методы количественного определения белков

Для определения количества белка в образцах использовали нижеуказанные методы:

- калориметрические методы по Bradford [390, C. 15-19] и по Лоури [390, C. 7-19];

-спектрофотометрический метод измерения поглощения раствора белка при длине волны 280 нм с учетом молярного коэффициента экстинкции белка;

-денситометрия полос белков в пластинах SDS-PAG, окрашенных Кумасси бриллиантовым синим, в сравнении с известными количествами HSA с использованием компьютерной программы Gel-Pro Analyzer.

2.2.3. Физические методы анализа рекомбинантных белков и ДНК

2.2.3.1. Инфракрасная Фурье-спектроскопия ApoA-I и его комплексов с ДНК

Инфракрасные спектры растворов ДНК снимали на ИК-Фурье спектрометре (Nicolet 6700, Thermo Scientific, USA) методом НПВО (нарушенного полного внутреннего отражения) с использованием алмазной приставки с разрешением 4 см⁻¹ в диапазоне частот 900-4000 см⁻¹, что соответствует длине волны 2.5-11 мкм. Спектры снимали против буфера, содержащего 1 мМ (Na₂SO₃/NaHSO₃), рН 7.41. В качестве исследуемой ДНК использовали плазмиду рЕТт-СВD размером 5782 п.н, гидролизованную эндонуклеазой рестрикции EcoR1. Для оценки взаимодействия ДНК-белок использовали выделенный нами нативный очищенный АроА-I, взятый в количестве 30 нг.

2.2.3.2. Macc-спектрометрия rhIFN-ApoA-I

Идентификацию рекомбинантного химерного белка rhIFN-ApoA-I проводили с помощью масс-спектрометрического анализа. Для этого соответствующие белковые фракции вырезали из геля, отмывали от красителя и после восстановления в 45мМ дитиотреитоле и алкилирования в 100 mM иодацетамиде проводили гидролиз в растворе свиного трипсина с концентрацией 25мкг/мл. Пептиды экстрагировали и очищали, используя микроколонки со смолой C18: Millipore ZIPTIP C18 (Millipore, USA), которые

обеспечивают быстрый И эффективный захват, концентрацию И обессоливание пептидов. Очищенные пептиды смешивали с матриксным раствором: α-циано-4-гидроксикоричная кислота в 70% ацетонитриле, 0.1% ТФУ. 1 µ1 смеси наносили на мишень масс-спектрометра и высушивали на воздухе. Macc-спектрометрический анализ проводили на приборе Ultraflex III (Bruker, Germany). Калибровку прибора производили с использованием стандартного триптического гидролизата BSA (Bruker, Germany) по следующим массам: 937.48 Да, 1163.63 Да, 1283.71 Да, 1305.71 Да, 1399.69 Да, 1439.81 Да, 1479.79 Да, 1567.7 Да, 1639.93 Да, 1724.84 Да, 1880.92 Да, 1907.92 Да, 2045.02 Да. Полученную пептидную карту рекомбинантного белка сравнивали с теоретически рассчитанной для его аминокислотной последовательности в программном пакете mMass.

2.2.4. Генно-инженерные методы работы с бактериальными и эукариотическими клетками

2.2.4.1. Схема клонирования ДНК в бактериях и дрожжах

Синтетические гены PTD-ApoAI-H2A, H2A-ApoAI-H2A и H2A были клонированы в составе вектора pJexpress401. Полученными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* шт. BL21 (DE3). Рекомбинантные клоны отбирали на агаризованной среде LB, содержащей 30 мкг/мл канамицина. Наличие ДНК вставки определяли методом ПЦР колоний. Отобранные клоны исследовали на способность продуцировать целевые белки, анализируя лизаты клеток электрофорезом в пластинах 12% SDS-PAG.

Синтетические гены цитокинов IFN, G-CSF и GM-CSF, а также их химерных форм с АроА-I, были сначала клонированы в клетках $E.\ coli$ в составе экспрессирующей плазмиды рРІС $Z\alpha$ -А. Плазмидами трансформировали клетки $E.\ coli$ шт. Тор10, которые затем высевали на агаризованную среду ЛБ на чашки Петри, содержащие 50 мкг/мл зеоцина. Выросшие клоны анализировали на наличие рекомбинантной плазмиды методом ПЦР колоний. Один из ПЦР-позитивных клонов использовали для

препаративной наработки плазмид, содержащих целевые гены. Плазмиды (5-BstX1 15 мкг) были линеаризованы по сайту и далее ими были дрожжей Р. X33. трансформированы клетки pastoris шт. Трансформированные клоны отбирали на селективной агаризованной среде YPD, содержащей 500 и 2000 мкг/мл зеоцина. Клоны, индуцируемые 4 суток метанолом, исследовали на способность продуцировать целевые белки, анализируя белки культуральных сред электрофорезом в 12% SDS-PAG.

2.2.4.2. Проектирование синтетических генов

Нуклеотидная последовательность искусственного химерного гена PTD-АроАІ-Н2А была спроектирована и оптимизирована по кодоновому составу для экспрессии в клетках *E. coli* с использованием компьютерной программы GeneDesigner 2.0 фирмы DNA2.0 (США), а также с применением разработанной нами программы поиска пар кодонов, которые по данным [391] затрудняют или даже останавливают трансляцию мРНК в *E. coli*. Оптимизированный ген химерного белка был синтезирован фирмой DNA2.0 (США).

Нуклеотидные последовательности искусственных (синтетических) генов, кодирующих зрелые АроА-I, G-CSF, GM-CSF и IFN человека оптимизировали для экспрессии в дрожжах *P. pastoris* с использованием компьютерных программ "Gene designer" ("DNA 2.0", USA), пакета программ VisualGeneDeveloper [392] и пакета Invitrogen GeneOptimizerTM. Оптимизированные гены были синтезированы фирмой Gen-Script (USA).

2.2.4.3. Метод предсказания третичной структуры белков

Для построения и визуализации пространственных моделей полученных рекомбинантных аутентичных и химерных цитокинов, был использован программный комплекс RaptorX [393].

2.2.4.4. Выделение рекомбинантных плазмидных ДНК

Плазмидную ДНК выделяли щелочным методом, удаляя примеси РНК обработкой препарата ДНК РНКазой А [388, С. 100-110]. Концентрацию

плазмидных ДНК замеряли на флюориметре Qubit (Invitrogen) согласно инструкции фирмы.

2.2.4.5. Приготовление электрокомпетентных клеток Escherichia coli u Pichia pastoris

Электрокомпетентные клетки *E. coli* шт. TOP10 и BL21(DE3) и электрокомпетентные клетки *P. pastoris* шт. X33 или GS115 были приготовлены согласно инструкции фирмы-производителя (Invitrogen, USA).

<u>2.2.4.6. Трансформация бактериальных и эукариотических клеток с</u> помощью электропорации плазмидными <u>ДНК</u>

В работе использовали кюветы с расстоянием между электродами 2мм. При трансформации клеток *E. coli* импульс тока давали при выходном напряжении 2500 Вольт. После электропорации трансформированные клетки рассевали на чашках Петри с агаризованной средой LB с соответствующим антибиотиком. Чашки инкубировали при 37°С до образования колоний размером 0.5-1.0 мм в диаметре (примерно 12-16 ч).

При трансформации электрокомпетентных клеток P. pastoris около 5-10 мкг плазмидной ДНК, содержащей целевой ген, линеаризовали рестриктазой BstX1 и гидролизованной ДНК трансформировали клетки P. X33 pastoris методом электропорации, использованием запрограммированного режима на приборе Gene Pulser Xcell Total System Electroporator (BioRad, США). Трансформанты, несущие копии плазмид с целевым геном, интегрированных в геном дрожжевых клеток, выращивали на чашках с агаризованной средой YPD, содержащей 2000 мкг/мл зеоцина, в 30°C 3-5 термостате при В течение дней. Зеоцин-резистентные способность трансформанты оценивали на затем синтезировать И секретировать целевой рекомбинантный белок.

<u>2.2.4.7. Скрининг колоний Е. coli на наличие клонированной ДНК-</u> вставки

Выросшие на агаризованной среде клоны проверяли методом ПЦР колоний на наличие рекомбинантной плазмиды, содержащей вставку

нужного гена. ПЦР проводили с использованием амплификатора DNA Thermal Cycler BIS (BIS, РФ) в присутствии прямого и обратного праймеров. Размер ампликонов определяли электрофорезом в 0.8% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Присутствие вставки целевого гена в ПЦР позитивных клонах, содержащих рекомбинантную плазмиду, определяли рестрикционным анализом. Идентичность ДНК вставки в одном из позитивных клонов подтверждали секвенированием ДНК.

<u>2.2.4.8. Селекция рекомбинантных клонов - продуцентов целевых</u> <u>белков</u>

Селекцию рекомбинантных клонов E. coli Р. pastoris, продуцирующих целевые белки проводили в несколько этапов. На первом этапе отбирали канамицинили зеоцин-резистентные клоны на агаризованных чашках Петри. На следующем этапе отбор клонов проводили методом ПЦР по наличию нужной ДНК-вставки и путем индукции синтеза целевого белка ИПТГ при выращивании в пробирках в среде LB (в случае E. coli).

Селекцию трансформантов дрожжей проводили путем индукции в них синтеза белка метанолом при выращивании в среде ВМСУ в 96-глубоколуночных планшетах следующим образом. Резистентные к зеоцину клоны культивировали в лунках объёмом 2.2 мл 96-луночного планшета (Ахудеп Scientific) в среде ВМСУ на орбитальном шейкере при 300 об/мин в течение 60 ч при 28°С. Затем в каждую лунку вносили по 250 мкл среды ВММ2. В следующие три дня в лунки вносили по 50 мкл среды ВММ10. На 4 сутки индукции клетки из каждой лунки осаждали центрифугированием при 6000g в течение 5 мин при комнатной температуре. Белки из полученных супернатантов осаждали 10% ТХУ по общепринятой методике. Преципитаты белков после осаждения ТХУ промывали 100% ледяным ацетоном, просушивали и растворяли в денатурирующем буфере для электрофореза в SDS-PAG.

2.2.5. Получение и очистка рекомбинантных белков, продуцируемых E. Coli

2.2.5.1. Культивирование клеток штамма E. coli

Музейный штамм Е. coli, хранящийся при -20°C в среде LB с 15%-ным глицерином, или лиофилизированный штамм перед использованием подращивали в среде LB, в объеме 2-3 мл при 37°C, в течение 10-14 часов в термостате. Ночную культуру инокулировали в колбу со средой LB, содержащей антибиотик, и инкубировали при перемешивании на орбитальном шейкере (100-120 об/мин) и температуре 37°C до $O\Pi_{600}$ 1.0±0.2 о.е [388].

2.2.5.2. Индукция синтеза рекомбинантного белка в клетках E. coli

В колбу с выросшей культурой вносили индуктор — ИПТГ до конечной концентрации 1мМ. Далее культуру инкубировали при 30°С в течение 16±2 часов. Клетки собирали центрифугированием при 3500 об/мин в течение 15 мин. Осадок клеток замораживали и хранили при -20°С, либо использовали сразу для выделения рекомбинантных белков.

2.2.5.3. Определение внутриклеточной локализации белков

Внутриклеточную локализацию рекомбинантных гистоновых полипептидов определяли по Randall L.L [394].

<u>2.2.5.4. Выделение и очистка рекомбинантных белков H2A, PTD-</u> <u>АроАІ-Н2А и H2A-АроАІ-Н2А</u>

Биомассу клеток *E. coli*, продуцирующих рекомбинантные гистонсодержащие полипептиды, получали, как описано в п.2.6.1.

Рекомбинантный *H2A* выделяли из телец включения, очистку проводили с помощью аффинной хроматографии в денатурирующих условиях. Осадок клеток рекомбинантного штамма, полученный центрифугированием из 1 литра культуральной среды, суспендировали в буфере №2, содержащим 100 мг/мл лизоцима. Суспензию обрабатывали на ультразвуковом дезинтеграторе МЭФ 91.1 (МЭЛФИЗ, Москва) при максимальной амплитуде на льду 30 с, лизат охлаждали на льду и процессы

озвучивания повторяли 6 раз. Лизат центрифугировали в Eppendorf 5810R при 5000g, 10°C в течение 10 мин. Супернатант отбрасывали, а из осадка, содержащего тельца включения, выделяли гистон методом аффинной хроматографии на колонке с Ni²⁺-NTA сефарозой 6B-CL (Qiagen, Германия) в денатурирующих условиях согласно инструкции фирмы Qiagen. Фракции, содержащие очищенный белок объединяли и диализовали против буфера №3, содержащего понижающиеся количества мочевины.

Выделение рекомбинантных химерных полипептидов *PTD-ApoAI-H2A* и *H2A-ApoAI-H2A* осуществляли из клеточного дебриса в денатурирующих условиях следующим образом. Осадок клеток озвучивали на УЗД МЭФ 91.1 аналогично тому, как описано для гистона H2A. Далее суспензию озвученных клеток центрифугировали в Eppendorf 5810R при 3000g, 10°C в течение 20 мин. Полученный осадок растворяли в денатурирующем буфере №4, перемешивали на магнитной мешалке и центрифугировали при 5000g, 10°C в течение 20 мин. Очистку химерных белков проводили с помощью двухэтапной жидкостной ионообменной хроматографии среднего давления на колонках с Масго-Prep DEAE Support и CM Support в буфере №4. Белки элюировали линейным градиентом NaCl (0-0.2M в буфере №4). Фракции, содержащие очищенный белок, объединяли и диализовали против буфера №1, содержащего понижающиеся количества мочевины.

2.2.6. Получение и очистка рекомбинантных белков, продуцируемых P. pastoris

2.2.6.1. Культивирование рекомбинантного штамма P. pastoris

Клетки рекомбинантного штамма дрожжей *P. pastoris* из лиофилизированного или глицеринового музея инокулировали в 10 мл среды ВМGY в 50 мл конической колбе и выращивали 48 ч при 28°C на орбитальном шейкере при 250 об/мин. Затем культуру переносили в 100 мл среды ВМGY в конические колбы объемом 500 мл с дефлекторами и

выращивали на орбитальном шейкере при 26°C и 250 об/мин в течение 2-3 суток.

<u>2.2.6.2. Индукция синтеза рекомбинантного белка в клетках P.</u> <u>pastoris</u>

После достижения оптической плотности 30 OD₆₀₀ nm, в колбы ежедневно вносили 100% метанол до конечной концентрации 1% в течение 4 суток. Для оценки динамики синтеза и секреции целевых белков, отбирали ежедневно аликвоты по 300 мкл культуральной жидкости, центрифугировали их при 5000g и супернатанты анализировали электрофорезом в SDS-PAG.

<u>2.2.6.3. Осаждение целевых белков из культуральной жидкости</u> <u>сульфатом аммония</u>

После завершения культивирования клетки собирали центрифугированием при 3750g в течение 30 мин при 4°C. В отобранный супернатант вносили порошок сульфата аммония до насыщения 40-70% при 4°C и полученный раствор инкубировали в течение ночи при 4°C. Преципитаты белка осаждали центрифугированием при 39000g в роторе JA20 на центрифуге J2-21 (Beckman, USA) в течение 30 мин при 4°С. Супернатанты отбрасывали, а преципитаты белка растворяли буфере №5, диализовали ночь против данного буфера и нерастворившуюся часть осаждали при 37000g в течение 20 мин. Осветленный супернатант использовали для хроматографической очистки целевого белка. Присутствие целевого белка в супернатанте подтверждали электрофорезом SDS-PAG в вестерн блоттом. Положительными контролями служили препараты коммерческих цитокинов, продуцируемых $E.\ coli.$

2.2.6.4. Очистка рекомбинантных цитокинов

Рекомбинантные цитокины (rhIFN, rhG-CSF, rhGM-CSF) из осветленного супернатанта очищали ионообменной хроматографией на смолах DEAE- и SP-Sepharose FF как описано ниже. RhG-CSF очищали последовательно на смолах с DEAE- и SP-Sepharose FF в буфере №6. Очистку rhIFN и rhGM-CSF проводили в три последовательных стадии:

сначала хроматографией на колонке с DEAE-Sepharose (элюция буфером №5), затем на колонке с SP-Sepharose (элюция буфером №5) и на заключительной стадии- на колонце с DEAE-Sepharose (элюция буфером №7).

Химеру rhIFN-ApoA-I очищали обращенно-фазовой хроматографией в градиенте ацетонитрила (20-80%) на смоле SupelpakTM-2SV. Очищенные фракции диализовали против буфера №7.

Очистку rhG-CSF-АроА-I проводили с помощью двухэтапной ионообменной хроматографии на колонке с DEAE Sepharose FF в кислых (в буфере №5) и нейтральных (буфер №7 с 0.02% Твин-20) условиях.

RhGM-CSF-АроА-I обессоливали на колонке с Сефадекс G25 и далее очищали последовательной хроматографией на смолах DEAE- и SP-Sepharose FF (элюция буфером №7).

Фракции, содержащие наиболее очищенные целевые белки, объединяли и анализировали электрофорезом в 12% SDS-PAG. Антигенную природу очищенных белков подтверждали вестер-блоттом. Очищенные рекомбинантные белки хранили при -70°C.

2.2.7. Генно-инженерные методы работы на культуре клеток млекопитающих

<u>2.2.7.1. Трансфекция клеток НЕК 293Т комплексами плазмид с</u> <u>химерными полипептидами</u>

Способность комплексов ДНК/белок (ДНК/Н2А, ДНК/Н2А-АроА-Н2А, ДНК/РТD-АроА-Н2А) проникать в клетки оценивали на линии клеток НЕК 293Т. Клетки культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 10% FBS, смесь антибиотиков (пенициллин-стрептомицин) и инкубировали при 37°С во влажной атмосфере, содержащей 5% СО₂. За 24 часа до трансфекции клетки разводили в свежей среде ДМЕМ и высевали в 96-луночный планшет. По достижении 50-70% конфлюэнтности клеток культуральную среду заменяли на бессывороточную и трансфицировали клетки комплексами белок-

плазмидная ДНК pEGFP-N1. В качестве положительного контроля использовали коммерческий трансфектант Lipofectamine согласно протоколу, прилагаемому фирмой-производителем. Комплексы ДНК-химерный белок были приготовлены в буфере №1. При трансфекции использовали следующие молярные соотношения ДНК/белок: 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000.

Трансфекционную смесь перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. После инкубации смесь по каплям добавляли к клеткам. Через 8 ч после трансфекции культуральную среду заменяли на свежую, содержащую 10% FBS. Через 48 ч анализировали эффективность трансфекции по количеству GFP-позитивных клеток визуально, с помощью инвертированного флюоресцентного микроскопа AxioOberver.D1 (Carl Zeiss, Германия) и количественно - с использованием проточного цитофлюориметра BD модель FACSCanto^{тм} II. Эксперименты проводились в 3 независимых повторах (n=6).

2.2.8. Методы работы с клетками костного мозга (ККМ) млекопитающих

2.2.8.1. Получение и культивирование ККМ крыс и человека

Для взятия костного мозга использовали взрослых самцов крыс линии Вистар массой 200-250 г (n=4). Все экспериментальные процедуры были одобрены Комитетом по этике НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины (протокол №14 от 18.06.2019).

Костный мозг крыс выделяли в стерильных условиях из большеберцовой кости и бедренных костей по стандартному протоколу [395]. Эритроциты лизировали путем ресуспендирования осадка клеток в 2 мл лизирующего буфера в течение 4 мин с последующим добавлением 15 мл RPMI и центрифугированием (1400 об/мин в течение 5 минут). Затем клеточную суспензию доводили до концентрации 2×10^6 средой для культивирования клеток (RPMI, 10% FBS) и по 0.5 мл переносили в 24-

луночный планшет. ККМ культивировали в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂) в течение 24 и 48 ч в присутствии ростовых факторов (50 нг/мл), взятых в эквимолярных количествах. Клетки, культивированные в тех же условиях, но без добавок, использовали в качестве контроля.

ККМ человека получали с добровольного согласия пациента в клинике НИИ клинической и экспериментальной лимфологии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины. Культивирование ККМ человека осуществляли аналогично вышеописанному способу.

2.2.8.2. Анализ ККМ методом проточной цитометрии

Анализ биологической активности химерных rhG-CSF-ApoA-I и rhGM-CSF-ApoA-I проводили на ККМ крыс и человека методом проточной цитометрии («CYTOFLEX S-100», «Весктап Coulter», США). Гейтирование ККМ крыс и человека было проведено в зависимости от размера клеток (FCS) и их гранулярности (SSC). Гейты, выделенные в правой области цитограммы, содержали клетки большего размера и оценивались нами как гейты, содержащие, преимущественно, прогениторные клетки.

2.2.8.3. Миелограмма

Мазки клеток костного мозга были окрашены по Май Грюнвальд и Гимза. Окрашенные клетки исследовали под микроскопом «Axio Scope A1» («Zeiss AG», Германия) и подсчитывали 500 клеток на мазок.

2.2.8.4. Определение фаз клеточного цикла

Для изучения распределения клеток по стадиям клеточного цикла (G0/G1. S, G2/MДНК измеряли количество внутриядерной интенсивности флуоресценции интеркалирующего флуоресцентного йодида пропидия (PI), флуоресценции красителя уровень которого пропорционален количеству ДНК, с которым он связался. После завершения культивирования суспензии ККМ с колониестимулирующими факторами, 0.25% адгезированные клетки снимали трипсином, отмывали культуральной PBS, объединяли суспензией среды раствором c

неадгезированных клеток и фиксировали в ледяном 70% этаноле в течение минимум 2 ч. Затем клетки центрифугировали с последующей инкубацией в течение 10 мин в гипотоническом растворе с целью удаления низкомолекулярных фрагментов ДНК для определения гиподиплоидного пика. Окраску клеток проводили в буфере, содержащем 2 мкг/мл РІ, 20 мкг/мл РНКазы и 0.1% Triton X-100. Флуоресценцию РІ определяли на проточном цитофлуориметре CYTOFLEXS, $\lambda Em = 670$ нм.

2.2.9. Исследование противовирусной активности rhIFN и rhIFN-ApoA-I

Специфическую противовирусную активность rhIFN и его химерной формы определяли по их способности ингибировать цитопатический эффект, вызываемый вирусом везикулярного стоматита лошадей дозе, соответствующей 100 ТЦИД50/0,1мл, на перевиваемой линии клеток почек быка - MDBK. Препаратом сравнения служил международный стандартный образец интерферона альфа-26 человека (MCO1) code: 95/566. Клетки MDBK культивировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% углекислого газа в среде Игла МЕМ с L-глютамином, бензилпенициллином, канамицином и 10% FBS до формирования сплошного монослоя. По достижении монослоя, адгезированные клетки промывали средой и снимали трипсином. Клеточную суспензию из расчета 2*10⁵/мл переносили в 96-луночный планшет и инкубировали сутки при 37°C и 5% CO₂. После формирования клеточного монослоя, меняли ростовую среду на поддерживающую - Игла МЕМ с Lглютамином, бензилпенициллином и канамицином с 5% FBS. Далее в лунки планшета вносили серии разведений опытных образцов IFN, а в контрольные лунки препарат сравнения (МСО1) и инкубировали 24 ч при вышеуказанных условиях. Образцы в поддерживающей сыворотке удаляли, лунки промывали средой и адгезированные клетки подвергали заражению вирусом с известным титром и инкубировали 24 ч. Бляшки, являющиеся зоной лизиса клеток, инфицированных вирусом, подсчитывали под микроскопом и определяли их количество на 1 мл. Одна единица активности определялась как количество IFN, необходимого для получения эквивалентной противовирусной активности, и выражалась в стандартных международных единицах. Каждый образец проверяли в трех параллелях. Инфекционный титр вируса вычисляли по формуле Спирмена-Кербера.

2.2.10. Культивирование мононуклеаров крови человека

Мононуклеарные клетки (МНК) из венозной гепаринизированной крови выделяли стандартным методом градиентного центрифугирования на фиколле-верографине. МНК культивировали в течение 4 суток при 37°С в СО₂-инкубаторе в 6-луночных планшетах (Nunclon, Дания) в стандартной среде RPMI-1640 с 5% FBS. Исследуемые ростовые факторы вносили в лунки в эквимолярных количествах: rhGM-CSF (из *E. coli*) и rhGM-CSF (из *P. pastoris*) по 40 нг/мл, rhGM-CSF-ApoA-I (из *P. pastoris*) - 120 нг/мл, и добавляли IFN-α 1000 Ед/мл (Роферон-А, Roche, Швейцария). Для индукции созревания дендритных клеток (ДК) на 3 сутки вносили 10 мкг/мл ЛПС и продолжали культивирование в течение последующих 48 ч.

Аллостимуляторную активность полученных ДК оценивали смешанной культуре лимфоцитов. В качестве отвечающих использовали МНК доноров $(0,1x10^6/лунку)$ (n=12), которые культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640 в присутствии 10% инактивированной сыворотки крови группы AB(IV) при 37°C в CO₂инкубаторе. Соотношение МНК к ДК составляло 10/1. Пролиферативный ответ оценивали на 5 сутки радиометрически по включению ³H-тимидина (1мкКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования.

2.2.11. XTT анализ

Биологические активности rhGM-CSF и химеры rhGM-CSF-ApoA-I, полученных биосинтезом в дрожжах *P. pastoris*, оценивали по уровню стимуляции пролиферации TF-1 клеток эритролейкемии человека с

использованием XTT реагента. Для калибровки активности обеих форм **GM-CSF** был рекомбинантного дрожжевого использован препарат рекомбинантного GM-CSF, полученный путем биосинтеза в клетках E. coli [396]. Для эксперимента готовили 2-кратные разведения ростовых факторов до конечной концентрации 0.063; 0.125; 0.25; 0.5; 1; 2 и 4 нг/мл в среде RPMI с добавлением 10% FBS. Клетки засевали в 96-луночный планшет из расчета 2×10^4 клеток/лунку с вышеуказанными количествами ростовых факторов, взятых в эквимолярных количествах, и инкубировали в течение 72 ч при 37°C, 5% CO₂, влажности 85%. Клетки, инкубированные без цитокинов, служили отрицательным контролем. Оптическую плотность определяли на планшетном спектрофотометре SpectraCount (Packard), $O\Pi_{490/620}$. Стимуляцию пролиферации клеток TF-1 рассчитывали в процентах относительно контроля. За 100% принимали количество живых клеток в отрицательном контроле. Для различных концентраций препаратов rGM-CSF определяли среднее значение и дисперсию. Расчет для каждой точки делали в 5 повторах. Все расчеты проводили с использованием программного обеспечения LabView.

2.2.12. Исследование фармакокинетики обеих форм рекомбинантного IFN (rhIFN и rhIFN-ApoA-I)

Для фармакокинетических исследований использовали беспородных мышей-самцов CD-1 (25-35 г) (n=75). Все экспериментальные процедуры были одобрены этическим комитетом НИОХ СО РАН (протокол №8 от 17.09.2019).

После карантина 75 мышей были рандомизированы по весу и разделены на 2 группы. Рекомбинантные белки вводили в виде однократной подкожной инъекции в дозе 10 мкг/кг rhIFN и 25 мкг/кг rhIFN-ApoA-I в PBS. Образцы крови собирали в гепаринизированные пробирки через 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 и 24 часа после инъекции. На каждую временную точку брали по пять мышей. Для получения плазмы образцы крови центрифугировали 15 мин при

3000 об/мин. Образцы плазмы замораживали при -70°С и хранили до анализа. Концентрацию rhIFN и rhIFN-АроА-I в образцах плазмы крови определяли с помощью набора «альфа-ИНТЕРФЕРОН-ИФА-БЕСТ» фирмы Вектор-Бест (Россия). Фармакокинетический анализ проводили с помощью программы PKSolver - надстройки к Microsoft Office Excel [397]. Определяли следующие фармакокинетические параметры: максимальную концентрацию в плазме (Стах), время достижения максимальной концентрации - Стах (Ттах), площадь под кривой между 0 и ∞ (AUC0- ∞) и кажущийся период полувыведения (Т 1/2).

2.2.13. Методы статистической обработки результатов

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 6.0. Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего. Данные по аллостимулирующей активности дендритных клеток представлены как медиана и среднеквартильный разброс. Нормальность распределения определяли по Шапиро-Уилку. Для оценки достоверности между выборками использовали U-критерий Манна-Уитни, р≤0.05 считали достоверным.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Разработка способа выделения АроА-І из плазмы крови человека

Для выделения нативного ApoA-I из крови, за основу была взята известная технология, модифицированная на отдельных стадиях - делипидирования фракции ЛПВП и очистки ApoA-I в целях получения нативного высокоочищенного препарата.

Источником липопротеинов и АроА-I служила кровь здорового донора. Забор крови и получение плазмы крови проводили стандартно. Получение фракции ЛПВП путем центрифугирования в растворе КВг проводили как описано в методах (п. 2.2.1). Выделенную фракцию ЛПВП диализовали против PBS и подвергали делипидированию.

Делипидирование фракции ЛПВП является неотъемлемой частью получения АроА-І. Однако, органические растворители, используемые для удаления липидов, вызывают проблемы, связанные с растворимостью делипидированных белков и их необратимыми структурными изменениями. Различные органические растворители, такие как смеси этанол-диэтиловый эфир [398], хлороформ-метанол [399] и прочие подобные им, используются для экстракции липидов из плазмы или сыворотки, однако большинство из них вызывает денатурацию белка, зачастую, необратимую. Бутанол является мощным растворителем липидов, и вызывает осаждение белков сыворотки В. Knowles В. или плазмы, когда используется один. Cham продемонстрировали, что использование смеси бутанол/диизопропилоый эфир позволяет быстро и просто экстрагировать триглицериды, холестерин, фосфолипиды и неэтерифицированные жирные кислоты с минимальным изменением физического состояния делипидированного белка. Скорость извлечения белка зависит от доли бутанола в смеси, при этом не происходит значительной денатурации белка [400]. Указанный метод делипидирования мы применили к выделенной изоплотностным ультрацентрифугированием

фракции ЛПВП. Перед делипидированием, раствор белка забуферили 1М трис-гидрохлоридом с рН 9.4, во избежание образования преципитата денатурированного белка. Затем в забуференный раствор ЛПВП вносили два объёма смеси бутанол-диизопропиловый эфир (1:3) и перемешивали в течение 3-4 часов при комнатной температуре и медленном вращении ротатора (15 об/мин). Смесь центрифугировали при 3000g 5 мин и затем отбирали водную фазу, содержащую делипидированные белки. Полученный на данном этапе препарат белков состоял примерно на 65-70% из сывороточного альбумина, на 25-30% из АроА-I и 2-5% минорных белков.

На последующих стадиях выделения и очистки АроА-I использовали высаливание белков сульфатом аммония, или проводили ионообменную хроматографию. В целях избирательной преципитации АроА-I подбирали такую концентрацию сульфата аммония, при которой достигается наиболее полное освобождение от HSA. В результате фракционного высаливания было найдено, что наиболее полное выделение АроА-I с наименьшей примесью HSA наблюдается при внесении в раствор делипидированных белков сульфата аммония до концентрации 35% (масса/объём) (Рисунок 3). Для максимальной очистки АроА-I преципитаты промывали раствором 30% (масса/объём) сульфата аммония при комнатной температуре и интенсивном перемешивании в течение 1 ч, переводя в него большую часть соосаждённого альбумина и минорных белков. Очищенный таким образом препарат АроА-I не содержал заметного количества примеси HSA (Рисунок 5).

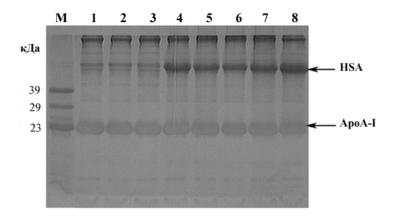


Рисунок 3. Электрофореграмма белков, преципитированных из делипидированной фракции ЛПВП высаливанием различными концентрациями сульфата аммония. Электрофорез проводили в 15% SDS-PAG. Дорожки: М — маркёр молекулярных масс белков (23, 29, 39 кДа); 1-8 — белки, преципитированные различными концентрациями сульфата аммония: 1-25%; 2-30%; 3-35%; 4-40%; 5-45%; 6-50%; 7-55%; 8-60%.

Высаливание проводили непосредственно после делипидирования препарата, или после диализа раствора аполипопротеина и примесных белков против PBS для освобождения от бутанола. Во втором случае, после высаливания сульфатом аммония и последующего центрифугирования получали осадок белка, легкорастворимый в PBS. Если же высаливание проводили без предварительного диализа, то в результате центрифугирования образовывались флотирующие преципитаты, которые затем растворяли в 4-6 М мочевине и диализовали против PBS.

Альтернативную стадию очистки АроА-I, полученного после делипидирования, осуществляли методом ионообменной хроматографии на анионообменной смоле YMC BioPro Q30. Хроматографию проводили, как указано в п. 2.2.1. Было установлено, что максимальное отделение АроА-I от HSA достигается при концентрации соли 200 мМ (Рисунки 4 и 5).

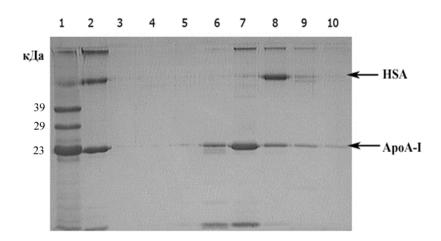


Рисунок 4. Электрофореграмма фракций, полученных в процессе хроматографического разделения белков делипидированного препарата ЛПВП на колонке с ионообменной смолой YMC-BioPro Q30. Электрофорез проводили в 15% SDS-PAG. Дорожки: 1 — маркёр молекулярных масс белков (23, 29, 39 кДа); 2 — препарат АроА-I, полученный делипидированием

фракции ЛПВП; 3 — не связавшийся со смолой материал; 4-10 — фракции, элюированные «ступеньками» концентраций NaCl (от 50мМ до 500 мМ NaCl).

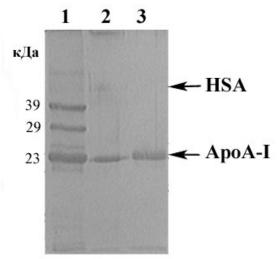


Рисунок 5. Электрофореграмма препаратов АроА-I, полученных очисткой с применением двухступенчатого высаливания делипидированной фракции ЛПВП 35%-ным (масса/объём) сульфатом аммония (2) или с помощью ионообменной хроматографии на смоле YMC-BioPro Q30 (3). Электрофорез проводили в 15% SDS-PAG. Дорожки: 1 — маркёр молекулярных масс белков (23, 29, 39 кДа).

Таким образом, описанный способ выделения ApoA-I позволяет получать препараты очищенного (95-97% чистоты) нативного ApoA-I с применением щадящих органических растворителей на стадии делипидирования, позволяющих сохранять структуру и функции белка.

3.2. Исследование способности АроА-І связывать плазмидную ДНК

Многолетние исследования сотрудников НИИ биохимии СО РАМН продемонстрировали, что функции ЛПВП и АроА-I не ограничиваются его транспортной ролью. Было показано, что АроА-I с высоким сродством связывается с гетероолигонуклеотидами, причём была определена константа такого взаимодействия, составляющая $10^6 \, \text{M}^{-1}$ – для комплекса ТГК-АроА-I с ДНК [157].

Способность АроА-I взаимодействовать с ДНК и образовывать комплекс ДНК/белок могла бы найти большое применение в области пептидной невирусной доставки генетического материала, что представляет собой большую актуальность для лечения целого ряда генетических заболеваний.

В связи с этим мы решили исследовать, насколько стабильным является подобный комплекс и можно ли рассматривать АроА-I в качестве транспортера не только биологически активных макромолекул, но и генетического материала.

Для оценки комплексообразования и определения его стабильности были использованы методы ИК-Фурье спектроскопии и гель-ретардации. Метод ИК-Фурье спектроскопии позволяет исследовать пробы в водном растворе в очень малых концентрациях. В результате проведения ИК-Фурье спектроскопии наблюдались изменения в следующих полосах поглощения:

Связи дезоксирибозы. Инкубация раствора ДНК с АроА-І приводила к снижению на 25% интенсивности полосы поглощения 1044.42 см⁻¹, соответствующей О5-С4-О4-С5 связям дезоксирибозы, что говорит об изменении конформации дезоксирибозы. При этом наблюдался сдвиг частоты на 2 см⁻¹ в коротковолновую область. Это объясняется конформационным переходом высокоупорядоченной ДНК в менее упорядоченную структуру.

Фосфатные группы. После инкубации раствора ДНК с АроА-I выявлялось уменьшение интегральной интенсивности и сдвиг частоты РОС связи на 1,1 см⁻¹; кроме того, исчезали полосы поглощения 1222 и 1242, оставалась лишь полоса 1226 см⁻¹. Полосы поглощения 1133.65 и 1155 заменялись на полосу 1153,66 см⁻¹. Уменьшение интенсивности полосы поглощения 1044.42, а также уменьшение интегральной интенсивности 1084.5 см⁻¹ (РОС-связь) и исчезновение расщепления в области 1133 и 1222 см⁻¹ свидетельствуют о взаимодействии АроА-I с ДНК и ее локальном

плавлении. Наиболее вероятным сайтом связывания ApoA-I с ДНК являются CC(GCC)n и GG(CGG)n олигонуклеотиды [157].

2982.26 2937.73 cm⁻¹, СН-связи. Полосы поглощения И соответствующие СН-валентным колебаниям, изменяли свою интенсивность подобно «качели», что также свидетельствует о структурном переходе типа порядок →беспорядок в структуре оснований и о локальном плавлении ДНК в области связывания АроА-І. Наряду с изменением интенсивности наблюдалось и изменение частоты полос поглощения СН-связей, что было обусловлено, во-первых, образованием водородных связей гидрофильных групп оснований с подобными группами (NH, CO) АроА-І, во-вторых, результатом действия вандерваальсовых сил (гидрофобное являлось взаимодействие) между АроА-І и ДНК.

<u>NH-связи.</u> При инкубации АроА-I с ДНК выявлялись только 2 полосы поглощения- 3300.46 и 3265.63 см⁻¹, в то время как в контрольном образце плДНК наблюдались полосы поглощения 3324.8, 3308.3, 3291.1 и 3275.8 см⁻¹. Сдвиг частоты полос поглощения в этой области объясняется образованием водородных связей между карбоксильными группами аминодикарбоновых кислот, пептидными связями, ОН-группами АроА-I и NH, С=О-связями оснований ДНК. NH и СО-связи оснований находятся в π-сопряжении, поэтому образование водородной связи с одной из них приводит к сдвигу частоты полосы поглощения другой связи. В итоге, NH-связь оснований в результате плавления ДНК также претерпевает изменения по частоте и интенсивности.

Таким образом, инкубация плДНК с АроА-І приводит к изменению вторичной структуры макромолекулы, что сопровождается изменением конформации дезоксирибозы, частоты и интенсивности полос поглощения Р=О, РОС, СОС, NH, СО и СН, свидетельствующих об образовании водородных связей. Исчезновение расщепления у вышеуказанных полос связано с уменьшением упорядоченности. По совокупности данных, полученные результаты можно объяснить плавлением ДНК при связывании с

АроА-I или структурным переходом типа порядок → беспорядок. Следует отметить, что БСА, взятый в данных экспериментах в качестве контроля, не вызывал заметных изменений в структуре ДНК.

Оценку связывания АроА-I с ДНК также проводили методом гельретардации ДНК. Использовали различные массовые соотношения ДНК/белок при их смешивании (от 1/1 до 1/10). В результате проведения гель-ретардации не было замечено разницы в миграции в геле ДНК, смешанной с АроА-I в сравнении с контрольной ДНК (данные гельретардации АроА-I+ДНК не представлены).

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что АроА-I способен связываться с плазмидной ДНК, но это взаимодействие обеспечивается формированием лишь слабых водородных связей и гидрофобным взаимодействием за счёт вандерваальсовых сил между АроА-I и ДНК. Возможное функциональное значение подобного взаимодействия является предметом отдельных исследований и не входило в задачи данной работы.

АроА-І, несомненно, представляет интерес в качестве возможного транспортера терапевтической ДНК, поскольку обладает естественного проникновения внутрь клеток [21], специфически связывается с рецепторами большинства типов клеток [59] и характеризуется длительным периодом полужизни в крови [20]. Однако, он не способен прочно связываться с ДНК, то есть образовывать стабильный комплекс ДНК/белок. Одним из путей решения этой проблемы, на наш взгляд, может быть создание химерной конструкции, содержащей полноразмерный АроА-I и полипентид, обладающий высоким сродством к ДНК. Такой полипентид должен обладать большим количеством положительно заряженных а.о. Этому требованию в наибольшей степени соответствуют гистоны эукариот, которые, как известно, обладают повышенным сродством к ДНК. Анализ литературных данных позволил нам из всех групп гистоновых белков остановить свой выбор на нуклеосомном гистоне Н2А. В следующем разделе приводятся результаты исследований, направленных на создание рекомбинантных химерных полипептидных конструкций в качестве потенциальных средств доставки ДНК в клетки эукариот.

3.3. Конструирование и исследование трансфецирующей активности химерных полипептидов

Ha первом этапе были спроектированы генно-инженерные химерные полипептиды, конструкции, кодирующие содержащие полноразмерные аминокислотные последовательности: (а) гистона Н2А ДНК-связывающего качестве человека, используемого В домена обусловливающего внутриклеточное компонента, И внутриядерное проникновение ДНК; (б) АроА-І человека – обеспечивающего защиту ДНК от нуклеаз, пролонгированное время жизни комплекса ДНК-белок в крови, а также специфическое связывание со многими клетками организма; (в) пептида PTD-4, являющегося аналогом ДНК-трансдуцирующего домена белка ТАТ ВИЧ и обеспечивающего внутриклеточную интернализацию комплекса.

3.3.1. Конструирование плазмид, несущих гены рекомбинантных белков PTD-ApoAI-H2A, H2A-ApoAI-H2A и H2A, предназначенных для трансфекции ДНК

<u>Проектирование структуры гена химерного белка PTD-АроАІ-Н2А</u>

Нуклеотидная последовательность искусственного гена химеры РТD-АроАІ-Н2А была спроектирована и оптимизирована для экспрессии в клетках *E. coli* (п. 2.2.4.2). Синтезированный ген РТD-АроАІ-Н2А был встроен по сайтам рестрикции NdeI и XhoI в коммерческий вектор pJexpress401, в результате чего была получена плазмида pJexpress401/PTD-АроАІ-Н2А (Рисунок 6 A). Схема гена химерного белка РТD-АроАІ-Н2А показана на Рисунке 6 Б.

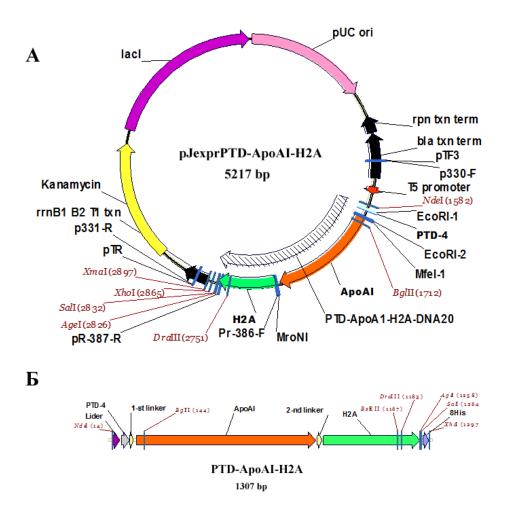


Рисунок 6. Физическая карта рекомбинантной плазмиды pJexpress401/PTD-ApoAI-H2A (A) и схема структуры гена химерного белка PTD-ApoAI-H2A (Б). pUC огі — область начала репликации; грп txn, bla txn и rrnB1 B2 txn — терминаторы транскрипции различных генов; Капатусіп — ген неомицин фосфотрансферазы II; ApoA-I — ген зрелого ApoA-I человека; H2A — ген гистона H2A; PTD — ген PTD4.

Сборка и клонирование гена химерного белка Н2А-АроАІ-Н2А

Ген Н2А амплифицировали методом ПЦР на плДНК pJexpress/PTD-АроАІ-Н2А с использованием пары праймеров №386-F и №387-R, содержащих на 5'-конце дополнительные последовательности, включающие сайты рестрикции NdeI (для прямого праймера) и EcoRI (для обратного праймера). Ампликон гена Н2А был гидролизован рестриктазами NdeI и EcoRI и с помощью ДНК-лигазы Т4 встроен в плазмиду pJexpress/PTD-АроАІ-Н2А, из которой предварительно по этим же сайтам был удален PTD4.

Физическая карта плазмиды pJexpress401/H2A-ApoAI-H2A и схема гена H2A-ApoAI-H2A показаны на Рисунке 7.

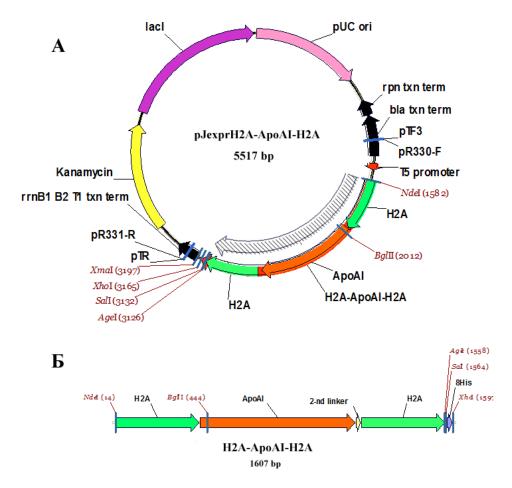


Рисунок 7. Физическая карта рекомбинантной плазмиды pJexpress401/H2A-ApoAI-H2A (A) и схема структуры гена химерного белка H2A-ApoAI-H2A (Б). ApoA-I – ген зрелого ApoA-I человека; H2A – ген гистона H2A.

Амплификация и клонирование гена гистона Н2А

Ген Н2А амплифицировали методом ПЦР на плДНК pJexpress/PTD-АроАІ-Н2А с использованием прямого №386-F и обратного №420-R праймеров, содержащих на 5'-концах дополнительные последовательности, включающие сайты рестрикции NdeI и XhoI. Ампликон гидролизовали рестриктазами по сайтам NdeI и XhoI и с помощью ДНК-лигазы Т4 встраивали в плазмиду pJexpress401, предварительно гидролизованную по этим же сайтам.

3.3.2. Трансформация клеток E. coli и скрининг трансформантов

Полученными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* BL21 (DE3), как указано в п. 2.2.4.6. Клоны, содержащие целевые вставки, отбирали на селективной агаризованной среде LB, содержащей 30 мкг/мл канамицина. Наличие ДНК-вставки определяли методом ПЦР колоний. Отобранные клоны исследовали на способность продуцировать белки РТD-АроАІ-Н2А, H2A-АроАІ-Н2А и H2A электрофорезом лизата клеток в SDS-PAG.

3.3.3. Анализ экспрессии рекомбинантных генов

Колонии, выросшие на селективной агаризованной среде LB, содержащей 30 мкг/мл канамицина, отбирали с помощью ПЦР в присутствие праймеров №419-F и №387-R на наличие в них клонированных целевых Отобранные клоны выращивали ночь в LB среде, содержащей 30 мкг/мл канамицина и затем в течение 5 ч индуцировали ИПТГ экспрессию клонированных целевых генов. Клетки собирали центрифугированием, лизировали и лизаты анализировали электрофорезом в SDS-PAG (Рисунки 8, 9). Судя по результатам этого анализа, отобранные клоны E. coli обеспечивали эффективную экспрессию синтетических генов гистона Н2А и белков PTD-ApoA1-H2A H2A-ApoAI-H2A. химерных И Анализ субклеточных фракций (п. 2.2.5.3) показал, химерные белки ЧТО локализовались, преимущественно, в клеточном дебрисе, по-видимому, вследствие связывания АроА-І -домена обеих химер с клеточной мембраной. Гистон Н2А обнаруживался только в тельцах включения. По данным электрофоретического анализа белки H2A, PTD-ApoAI-H2A и H2A-ApoAI-Н2А соответствовали своим расчетным молекулярным массам – 15.56 кДа, 47.84 кДа и 58.93 кДа, соответственно (Рисунки 8, 9). На долю синтезированных белков приходилось от 20% до 35% от суммарного белка клеток.

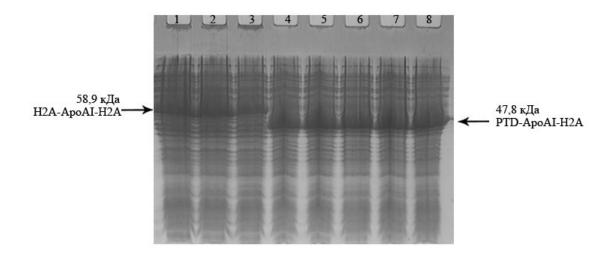


Рисунок 8. Электрофореграмма лизатов клеток клонов $E.\ coli$ шт. BL21 (DE3), индуцированных ИПТГ и содержащих рекомбинантные плазмиды pJexpress401 со встроенными генами химер PTD-ApoAI-H2A и H2A-ApoAI-H2A. Электрофорез проводили в 12% SDS-PAG. Дорожки: 1-3 — лизаты индуцированных ИПТГ клеток $E.\ coli$, продуцирующих белок H2A-ApoAI-H2A; 4-8 — лизаты индуцированных ИПТГ клеток $E.\ coli$, продуцирующих белок PTD-ApoAI-H2A.

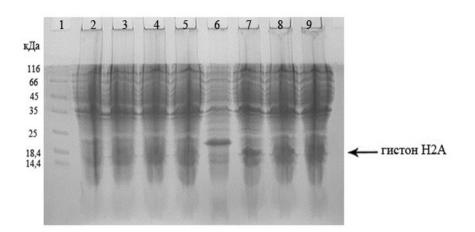


Рисунок 9. Электрофореграмма лизатов индуцированных ИПТГ клеток клонов $E.\ coli$, шт. BL21 (DE3), содержащих рекомбинантную плазмиду pJexpress401 со встроенным геном гистона H2A. Электрофорез проводили в 12% SDS-PAG. Дорожки: 1 — маркер молекулярных масс белков (Fermentas) (14,4-116 кДа); 2-9 — лизаты индуцированных ИПТГ клеток $E.\ coli$, продуцирующих белок H2A.

Клоны, продуцирующие наибольшие количества рекомбинантных химерных PTD-АроАІ-Н2А, H2A-АроАІ-Н2А и гистона H2A, отбирали для

наработки указанных белков в препаративных количествах, а также для создания глицериновых и лиофильных музеев.

3.3.4. Выделение и очистка рекомбинантных белков

Выделение и очистку химерных белков проводили различными способами. Первоначально использовали аффинную хроматографию на колонках с Ni²⁺-NTA-сефарозой 6B-CL, однако такая очистка не позволяла получать препарат достаточной чистоты и сопровождалась большими потерями целевых белков. Вследствие этого мы в дальнейшем для этих целей применяли ионообменную жидкостную хроматографию среднего давления.

Химерные полипептиды PTD-ApoAI-H2A и H2A-ApoAI-H2A очищали на смолах с Macro-Prep DEAE Support и Macro-Prep CM Support (Bio-Rad, США). Фракции анализировали электрофорезом в 12% SDS-PAG.

Рекомбинантный гистон H2A выделяли из телец включения как указано в (п. 2.2.5.4) и очищали с помощью аффинной хроматографии.

Чистота очищенных рекомбинантных белков составила 92-95% (Рисунок 10). Трудности при очистке химерных белков могли быть вызваны наличием в их структурах гетерогенного по своей природе доменного состава, обусловленного отличающимися по физико-химическим свойствам белками АроА-I и гистона Н2А.

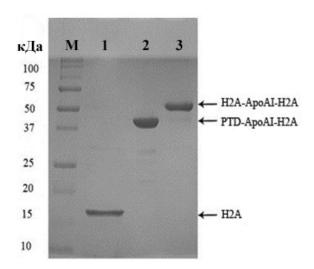


Рисунок 10. Электрофореграмма очищенных рекомбинантных белков H2A, PTD-АроАІ-H2A и H2A-АроАІ-H2A. Электрофорез проводили в 12% SDS-

РАG. Дорожки: M – маркер молекулярных масс (Bio-Rad); 1 – H2A; 2 – PTD- ApoAI-H2A; 3 – H2A-ApoAI-H2A.

3.3.5. Оценка ДНК-связывающих свойств химерных белков методом гель-ретардации

Полученные рекомбинантные белки были исследованы методом гельретардации в 0.8% агарозном геле на способность образовывать устойчивые комплексы с ДНК. Как видно из Рисунка 11, все рекомбинантные белки эффективно связывают ДНК, но при отличающихся массовых соотношениях ДНК/белок. В частности, полная задержка ДНК в геле для белка Н2А достигается при соотношении ДНК/белок, составляющим ~ 1:8, для Н2А-АроАІ-Н2А - при соотношении ~ 1:4, тогда как для белка PTD-АроАІ-Н2А ~ 1:12. Способность к формированию комплексов ДНК-белок связана с химерных белков участков наличием структурах гистона электростатически взаимодействующих с фосфатным остовом молекулы нуклеиновой кислоты. Более выраженная задержка в геле плазмидной ДНК при минимальном соотношении ДНК/белок, наблюдаемая с химерным обусловлена белком H2A-ApoAI-H2A, наличием его составе аминокислотных последовательностей 2-х молекул гистона Н2А. Судя по полученным результатам можно ожидать, что данные рекомбинантные химерные белки, способные связывать ДНК и содержащие домены внутриклеточной и внутриядерной локализации, могут быть использованы в качестве переносчиков генов В клетки млекопитающих.

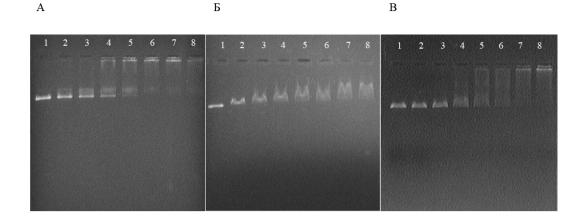


Рисунок 11. Гель-ретардация комплексов химерных полипептидов РТО-АроАІ-Н2А (Б) и H2A-АроАІ-Н2А (В) и рекомбинантного белка H2A (А), с плазмидной ДНК рЕGFP-N1. (А) 1. ДНК рЕGFP-N1; 2-8. ДНК рЕGFP-N1+H2A при массовых соотношениях 1:1; 1:2; 1:4; 1:6; 1:8; 1:10; 1:12. (Б) 1. ДНК рЕGFP-N1; 2-8. ДНК рЕGFP-N1+PTD-АроАІ-Н2А при массовых соотношениях 1:2; 1:4; 1:6; 1:8; 1:10; 1:12; 1:14. (В) 1. ДНК рЕGFP-N1; 2-8. ДНК рЕGFP-N1+H2A-АроАІ-Н2А при массовых соотношениях 1:0.5; 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:6.

3.3.6. Трансфекция ДНК, опосредованная рекомбинантными химерными белками

Способность полученных полипептидов переносить плазмидную ДНК в клетки эукариот была исследована на клетках НЕК 293Т. В качестве положительного контроля трансфекции была использована трансфекция ДНК pEGFP-N1 Lipofectamine2000. Процедуру трансфекции проводили согласно п. 2.2.7.1. Уровень трансфекции клеток комплексом ДНК+РТD-АроА1-Н2А составил ~ 3.5% (3.2±0.3%), комплексами ДНК+Н2А и ДНК+Н2А-АроАІ-Н2А - около 5% (4.6±0.45%) при максимально взятом молярном соотношении плДНК/белок 1/8000, в то время как в случае применения Lipofectamine уровень трансфекции составил 55% (52±5.5%) клеток (Рисунок 12).

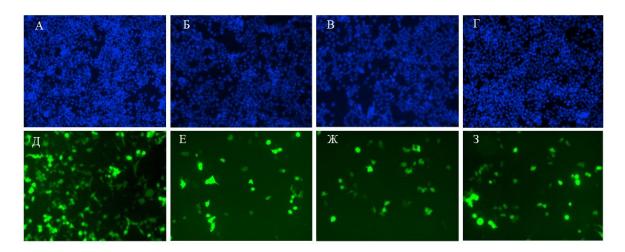


Рисунок 12. Флуоресцентная микроскопия клеток НЕК 293Т, трансфецированных комплексами рекомбинантных полипептидов H2A, PTD-ApoAI-H2A и H2A-ApoAI-H2A с плазмидной ДНК pEGFP-N1. Увеличение 200х. (A, Б, В, Г) - окрашенные DAPI ядра клеток; (Д, Е, Ж, 3) — трансфецированные клетки, синтезирующие белок GFP; (Д) —

Lipofectamine 2000+pEGFP-N1; (E) H2A+pEGFP-N1 молярное PTD-ApoAI-H2A+pEGFP-N1 8000/1; соотношение (**Ж**) молярное H2A-ApoAI-H2A+pEGFP-N1 8000/1; (3) – соотношение молярное соотношение 8000/1.

Следует отметить, что все химерные гистон-содержащие полипептиды в целях повышения их растворимости были выделены и очищены с использованием буферных растворов, содержащих до 0.1% Твин-20, и трансфекционные смеси также содержали 0.1% Твин-20. Как известно, неионные детергенты (Твины 20, 40 или 80) образуют в водных средах двухслойные везикулы (ниосомы), имеющие замкнутые сходство способные связывать гидрофильные гидрофобные липосомами биомолекулы [401]. Благодаря наличию мембранотропных свойств ниосом, а также их биосовместимости И биодеградируемости, они широко доставки лекарственных используются ДЛЯ препаратов. Можно предположить, что в наших экспериментах, Твин-20, конечная концентрация которого при трансфекции составляла 0.02%, связывается с молекулами АроА-I и H2A в составе ДНК-белок комплексов и также формирует мицеллярные структуры, облегчающие их проникновение внутрь клетки. Однако, «голая» плазмидная ДНК в этих же условиях трансфецирующей активностью не обладала.

Таким образом, методами генной инженерии были получены АроА-I содержащие химерные белки, имеющие выраженную аффинность к плазмидной ДНК, продемонстрированную методом задержки в геле. Однако, трансфецирующая способность полученных рекомбинантных белков на культуре клеток НЕК 293Т оказалась невысокой - не превышающей 5%. Низкая трансфекционная эффективность исследованных рекомбинантных белков может быть обусловлена несколькими причинами: во-первых, затрудненным проникновением комплекса белок/ДНК через мембраны клетки и ядра; во-вторых, чрезмерно прочным связыванием этих белков с

ДНК, препятствующим транскрипции плДНК, в следствие чего происходит резкое снижение или отсутствие экспрессии репортерного гена GFP.

отметить, что в нашей конструкции PTD-ApoAI-H2A, PTD-4 проникающий В клетки пептид не проявил ожидаемой интернализующей активности. Это онжом объяснить конкуретным связыванием АроА-І в составе химерного белка с мембранами клеток, что, вероятно, препятствовало проявлению интернализующих свойств PTD-4.

Несмотря на низкую трансфецирующую активность полученных химерных белков, они имеют ряд достоинств, таких как, слабая токсичность в сравнении с химическими трансфектантами (Lipofectamine, Lipofectin, TurboFect и пр.), а также безопасность, в отличие от вирусных систем доставки ДНК. Дальнейшие исследования, связанные с подбором ингредиентов и условий трансфекции ДНК с использованием химер АроА-I с гистоном Н2А, представляется перспективным направлением создания невирусных систем доставки ДНК в органы и ткани человека для целей генотерапии.

Вторым большим блоком настоящей работы было конструирование химерных рекомбинантных полипептидов, содержащих АроА-I, слитый с цитокинами, в целях продления их полужизни и, как следствие этого, снижения их доз и, следовательно, снижения токсичности для организма. Для конструирования химерных цитокинов, обладающих пролонгированным действием, нами были выбраны IFNa2b (IFN) и ростовые факторы G-CSF и GM-CSF, широко используемые в клинической практике. В качестве продуцентов химерных белков мы использовали метилотрофные дрожжи *P. разтогія*, обладающие рядом преимуществ по сравнению с бактериальными системами экспрессии. В частности, в дрожжах осуществляется О- и N-гликозилирование белков, максимально приближенное к таковому у человека, а синтезированные белки могут секретироваться в культуральную жидкость.

3.4. Получение штаммов метилотрофных дрожжей *P. pastoris -* продуцентов рекомбинантных цитокинов человека и их химерных форм с ApoA-I

Ранее сотрудниками НИИ биохимии предпринимались попытки клонирования гена ApoA-I в клетках *Pichia pastoris*, однако выход рекомбинантного белка оказался крайне низким. Вероятно, это связано с высокой мембранотропностью АроА-І и разрушением мембраны дрожжевых клеток при секреции ими АроА-І [402]. Кроме того, лизис клетокпродуцентов приводил к загрязнению культуральной среды белками P. pastoris, что усложняло процедуры очистки и приводило к потере целевого белка. Возможным решением этой проблемы могло быть создание химерных N-концевой области белков. содержащих В аминокислотную последовательность белка-«локомотива», продуцируемого дрожжевыми клетками В большом количестве, a В С-концевой области последовательность АроА-І. Мы предположили, что в качестве такого белка-«локомотива» можно было бы использовать липазу из термофильных грибов Thermomyces lanuginosus, которая, по данным литературы, эффективно секретировалась родственными дрожжам грибами. В связи с этим, отработка методов клонирования генов и последующей очистки рекомбинантных белков с использованием в качестве продуцента метилотрофных дрожжей $Pichia\ pastoris\ проводилась\ на\ примере\ получения\ липазы\ T.\ lanuginosus.$

3.4.1. Получение штамма дрожжей P. pastoris - продуцента рекомбинантной липазы из T. lanuginosus

Конструирование и оптимизацию нуклеотидной последовательности гена липазы для его эффективной экспрессии в метилотрофных дрожжах P. pastoris шт. X33 проводили с использованием программного обеспечения Gene Designer (ATUM, США). Синтетический ген липазы клонировали в составе вектора pPICZ α A (Рисунок 13), который далее был использован нами

для всех работ, связанных с клонированием генов цитокинов, а также их химерных форм с АроА-I.

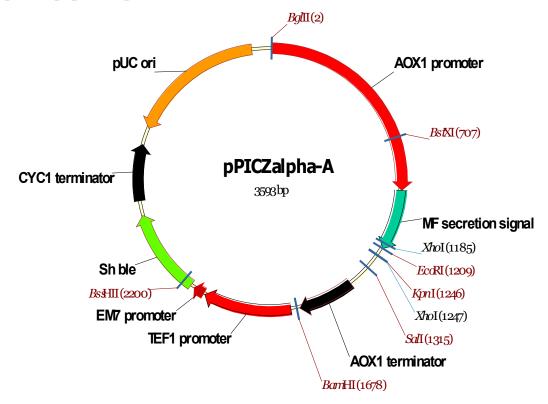


Рисунок 13. Физическая карта рекомбинантной плазмиды pPICZαA. pUC origin — область начала репликации плазмиды pUC; CYC1 transcription terminator — область терминатора транскрипции гена цитохрома C1; Sh ble — ген, обеспечивающий устойчивость к антибиотику зеоцину; EM7 — прокариотический промотор, TEF1 — эукариотический промотор гена фактора элонгации трансляции из Saccharomyces cerevisiae; AOX1 promoter — 5' область промотора гена алкоголь оксидазы; AOX1 transcription terminator — терминатор транскрипции гена AOX1; α-factor signal — альфа-сигнал секреции из Saccharomyces cerevisiae.

Этапы, связанные с трансформацией клеток *P. pastoris* шт. X33 плазмидой, несущей ген липазы, и селекцией выросших трансформантов проводили согласно пп. 2.2.4.6. и 2.2.4.8. Клон, продуцирующий наибольшее количество белка с молекулярной массой, соответствующей размеру липазы из *Т. lanuginosus*, отбирали для препаративной наработки этого фермента. Культивирование отобранного клона проводили в колбах согласно пп. 2.2.6.1. и 2.2.6.2. Были подобраны условия выращивания штамма, временные параметры индукции синтеза белка и оптимальные концентрации индуктора.

На Рисунке 14 приведена динамика накопления рекомбинантной липазы (rPichia/lip).

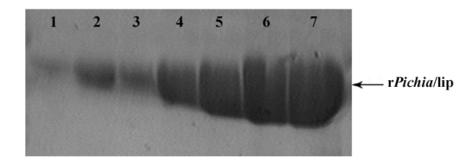


Рисунок 14. Электрофореграмма белков, присутствующих в культуральных жидкостях, отобранных в указанное время культивирования клона *P. pastoris* – продуцента рекомбинантной липазы. Электрофорез проводили в 15% SDS-PAG. Дорожки: 1-7 – белки культуральной жидкости, отобранной через 0, 3, 6, 12, 24, 48 и 72 ч после внесения метанола.

Были подобраны условия концентрирования белка также ИЗ культуральной жидкости. Концентрирование и очистку липазы осуществляли внесением в культуральную жидкость сухого порошка сульфата аммония до 70% +4°C насыщения при последующим растворением преципитированного препарата белка в 0.02 М натрий-фосфатном буфере, рН 8.0 и дальнейшем диализом от избытка солей. В целях предотвращения преципитирования белка, составы диализных буферов и рН среды также были оптимизированы. Следует отметить, что одно лишь высаливание без последующей хроматографической очистки позволило получить препарат белка с чистотой до 95% (Рисунок 15). Отсутствие необходимости в дополнительной очистке препарата свидетельствует о том, что в процессе культивирования и секреции липазы в культуральную среду дрожжевые клетки сохраняли жизнеспособность и целостность, и как результат культуральная жидкость преимущественно содержала целевой рекомбинантный белок без примеси дрожжевых белков.

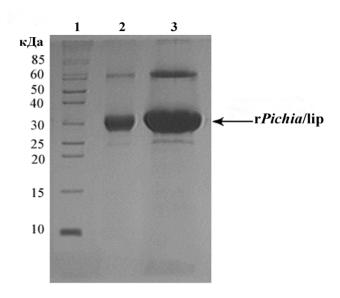


Рисунок 15. Электрофореграмма диализованного препарата липазы rPichia/lip. Электрофорез проводили в 15% SDS-PAG. Дорожки: 1 — маркёр молекулярных масс белков (Thermo Scientific) (10-200 кДа); 2, 3 — различные количества очищенного препарата липазы.

Очищенный препарат липазы обладал высокой ферментативной активностью и термостабильностью и был успешно применен при разработке биокатализаторов на носителях различной химической природы.

Следующим этапом настоящей работы было клонирование генов цитокинов человека в клетках дрожжей *P. pastoris* по вышеописанной технологии получения штамма - продуцента липазы rPichia/lip.

3.4.2. Конструирование штаммов P. pastoris, продуцирующих аутентичные и химерные формы rhIFN

Одной из основных проблем использования в клинической практике препаратов на основе рекомбинантных белков является их короткое время полужизни в организме человека, что влечет за собой необходимость частых инъекций препаратов и соответственно, увеличение побочных эффектов. Существуют разные стратегии увеличения времени полужизни в крови таких препаратов. Одним из перспективных путей решения этой задачи является создание химерных гибридных конструкций цитокина с длительно циркулирующими в крови белками плазмы крови. В литературе описаны

получения конструкций для продления полужизни белков на основе альбумина [10], фрагментов иммуноглобулина [9], трансферрина [304]. Эта стратегия была принята нами для создания препаратов рекомбинантных цитокинов с увеличенным временем полужизни в организме, где в качестве протектора использовался АроА-I. АроА-I может стать перспективной платформой для создания цитокинов пролонгированного действия, учитывая множество полезных свойств, проявляемых этим белком в организме и его длительное время циркуляции в крови.

В данном разделе представлены результаты получения рекомбинантных штаммов *P. pastoris*, продуцирующих аутентичные и химерные формы цитокинов человека. Химеры состоят из N-концевого домена, представленного цитокином (IFN, G-CSF, GM-CSF), соединённым с помощью гибкого линкерного олигопептида со вторым доменом — зрелым АроА-I человека. Ожидалось, что АроА-I в составе химерных белков позволит продлить время полужизни цитокинов и снизить их острофазность и токсичность для организма человека.

3.4.2.1. Конструирование рекомбинантных плазмид, несущих гены IFN и IFN-ApoA-I

Нуклеотидные последовательности генов зрелого IFN и ApoA-I оптимизировали с использованием программ, указанных в п. 2.2.4.2. Оптимизированные гены были синтезированы компанией (ATUM, USA). Было синтезировано 2 варианта гена зрелого IFN - один для получения штамма - продуцента зрелого IFN, другой- для получения штамма, продуцирующего химерный IFN, слитый с АроА-I человека.

Конструирование рекомбинантной плазмиды pPICZαA/IFN

Первый вариант гена зрелого IFN содержал на 3'-конце за кодирующей областью стоп кодон трансляции и затем сайт Sall. В 5'-концевой области гена содержалась последовательность, кодирующая сайты гидролиза протеазами Ste13 и Kex2 и сайт рестрикции XhoI. Этот вариант гена

клонировали в составе плазмиды pPICZaA по сайтам XhoI и SalI (Рисунок 16) в клетках $E.\ coli\ \text{шт.}\ \text{Тор10},\ a\ затем}$ переклонировали в клетки дрожжей $P.\ pastoris\ X33.$

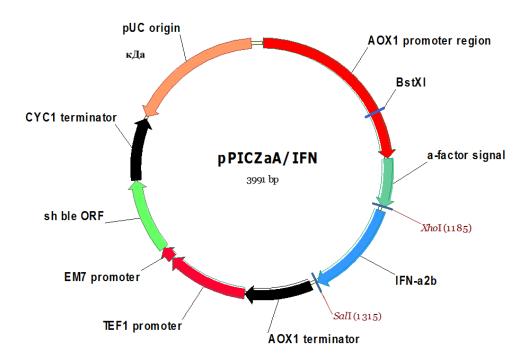


Рисунок 16. Физическая карта рекомбинантной плазмиды pPICZαA/IFN.

Конструирование рекомбинантной плазмиды pPICZαA/ApoA-I

Синтезированный ген зрелого АроА-І человека гидролизовали рестриктазами XhoI и EcoRI и лигировали с плазмидным вектором pPICZαA, гидролизованным ПО сайтам **EcoRI** И SalI. Лигазной смесью трансформировали электрокомпетентные клетки *E. coli* шт. TOP10 как указано в методах. Отбор трансформантов проводили на селективной низкосолевой среде LB, содержащей 25 мкг/мл зеоцина. Выросшие клоны целевой анализировали на наличие рекомбинантной плазмиды рРІСΖαΑ/АроА-І методом ПЦР колоний в присутствие прямого 423-Г и обратного 424-R праймеров, специфичных для фланкирующих ген зрелого АроА-І человека областей рекомбинантной плазмиды рРІСΖαΑ/АроА-І. Размер ампликонов определяли электрофорезом в 0.8% агарозном геле. Один из ПЦР-позитивных клонов использовался для препаративной наработки плазмиды pPICZαA/ApoA-I для последующего клонирования в составе этой плазмиды гена IFN-linker.

Сборка рекомбинантной плазмиды pPICZaA/IFN-ApoA-I

Второй вариант гена IFN (IFN-linker) состоял из последовательности, кодирующей зрелый IFN, которой следовал KpnI, 3a сайт глицин-сериновый последовательность, кодирующая гибкий линкер (GSSGSGSSGSGSGSGSG) и сайт EcoRI. Комбинация гибких и гидрофильных остатков в таком линкере предотвращает образование вторичных структур и снижает вероятность неправильного фолдинга белковых доменов. Линкер в составе конструкции обеспечивал состыковку двух белков, входящих в химеру. В 5'-концевой области гена содержалась последовательность, кодирующая сайты гидролиза протеазами Ste13 и Kex2 и сайт рестрикции XhoI. Этот вариант гена IFN был клонирован в составе рекомбинантной плазмиды pPICZαA/ApoAI по сайтам XhoI и EcoRI.

Синтезированный химерный ген IFN-linker гидролизовали по сайтам XhoI и EcoRI и лигировали с плазмидой pPICZαA/ApoAI, предварительно гидролизованной рестриктазами по этим же сайтам. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* шт. TOP10. Далее выращивали и отбирали трансформанты, выросшие на селективной низкосолевой среде LB, содержащей 25 мкг/мл зеоцина. Выросшие клоны анализировали на наличие рекомбинантной плазмиды методом ПЦР колоний в присутствии прямого 423-F и обратного 424-R праймеров. Размер ампликонов определяли электрофорезом в 0.8% агарозном геле. Один из ПЦР-позитивных клонов использовался для препаративной наработки рекомбинантной плазмидной ДНК pPICZαA/IFN-linker-ApoA-I и последующего её выделения методом Генетическая рекомбинантной щелочного лизиса. карта плазмиды pPICZαA/IFN-linker-ApoA-I приведена на Рисунке 17. Общая схема конструкций химерных АроА-І-содержащих цитокинов приведена Рисунке 18.

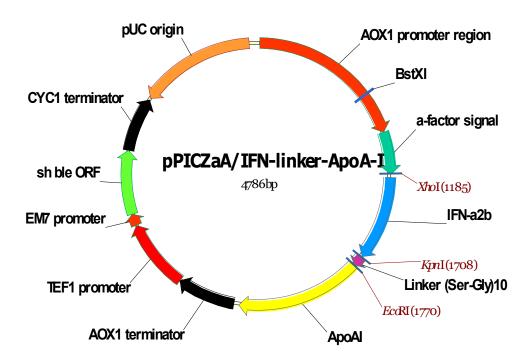


Рисунок 17. Физическая карта рекомбинантной плазмиды pPICZαA/IFN-linker-ApoA-I. IFN-a2b — ген зрелого IFN человека; Linker — серинглициновый линкер; ApoA-I — ген зрелого ApoA-I человека.

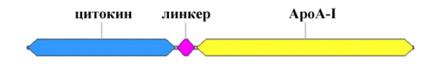


Рисунок 18. Общая схема химерных цитокинов.

3.4.2.2. Репрезентация ЗД структуры химерных белков

При конструировании и получении рекомбинантных химерных белков крайне важно иметь представление о третичной структуре химеры и входящих в её состав белков, то есть насколько пространственная структура отдельного белка, входящего в состав химеры, соответствует конформации его исходной аутентичной форме. На основе степени соответствия этих структур можно предсказать и степень сохранения функциональных свойств этого белка в составе химеры. В этой связи мы провели сравнение третичных структур полученных нами рекомбинантных цитокинов и их химерных форм с АроА-I.

Для построения и визуализации моделей химерных цитокинов был использован программный комплекс RaptorX, доступный на сайте Интернета [393]. Сравнение третичных структур рекомбинантных аутентичных цитокинов со структурами этих же цитокинов, входящих в состав ApoA-I содержащих химер, показало их высокую степень сходства. Результат такого анализа приведён на Рисунке 19 на примере сравнения конформаций аутентичного и химерного IFN. Полученные результаты позволили нам ожидать большого сходства и функциональных активностей обеих форм исследуемых рекомбинантных цитокинов.

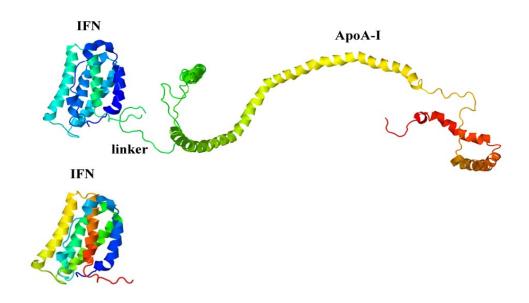


Рисунок 19. Третичные структуры рекомбинантного rhIFN и его химерной формы rhIFN-ApoA-I, полученные с помощью программного приложения RaptorX.

<u>3.4.2.3. Трансформация клеток P. pastoris и скрининг</u> <u>трансформантов</u>

Выделенные плазмиды pPICZαA/IFN и pPICZαA/IFN-ApoA-I обрабатывали рестриктазой BstXI и использовали для трансформации электрокомпетентных клеток дрожжей *Pichia pastoris* X33. Клоны выращивали на агаризованной среде, содержащей 2000 мкг/мл зеоцина. На 4 день после трансформации клеток плазмидами pPICZαA/IFN и pPICZαA/IFN-ApoA-I выросло 28 и 35 колоний, соответственно. Зеоцин-резистентные

трансформанты оценивали на способность синтезировать и секретировать рекомбинантные белки rhIFN и rhIFN-ApoA-I путем их культивирования в 96-луночных планшетах (п. 2.2.4.8) с последующим анализом спектров белков культуральной жидкости электрофорезом SDS-PAG. Bce проанализированные клоны, выросшие после трансформации дрожжей плазмидой pPICZαA/IFN, секретировали белки, мигрирующие электрофорезе в области 19 кДа, что соответствует молекулярной массе природного зрелого IFN; однако количества синтезированных цитокинов значительно отличались (Рисунок 20).

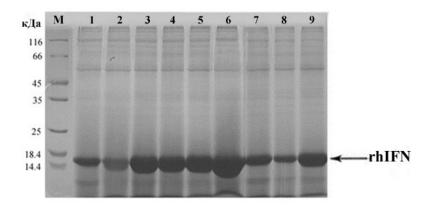


Рисунок 20. Электрофореграмма белков, присутствующих в культуральных жидкостях, клонов *P. pastoris* — анализируемых на продукцию рекомбинантного hIFN после 6-ти суток культивирования в среде BMGY на орбительном шейкере в 96-глубоколуночном планшете. Электрофорез проводили в 12% SDS-PAG. Дорожки: М — маркёр молекулярных масс белков (Fermentas) (12-66 кДа); 1-9 — анализируемые клоны.

Аналогичный анализ, проведённый с рекомбинантными клонами, трансформированными плазмидой рРІСΖαΑ/IFN-АроА-І, показал, что только часть проанализированных клонов синтезировала белки, близкие по молекулярной массе ожидаемому размеру химерного цитокина (Рисунок 21). Количества синтезированных в этих клонах химерного IFN заметно отличались и в целом были ниже, чем в случае синтеза рекомбинантного аутентичного IFN.

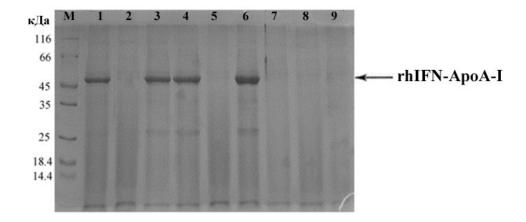


Рисунок 21. Электрофореграмма белков, присутствующих в культуральных жидкостях, клонов *P. pastoris* — анализируемых на продукцию химерного rhIFN-ApoA-I после 6-ти суток культивирования в среде BMGY на орбительном шейкере в 96-глубоколуночном планшете. Электрофорез проводили в 12% SDS-PAG. Дорожки: М — маркёр молекулярных масс белков (Fermentas) (14-116 кДа); 1-9 — анализируемые клоны.

Клоны, продуцирующие наибольшие количества белков с молекулярной массой, соответствующей природному rhIFN или расчётному размеру химеры rhIFN-ApoA-I, отбирали для дальнейших работ - создания глицеринового музея и препаративной наработки соответствующих рекомбинантных цитокинов. Присутствие ApoA-I в химерном белке rhIFN-ApoA-I было подтверждено вестерн-блоттингом с использованием кроличьих анти-ApoA-I IgG (Рисунок 22).

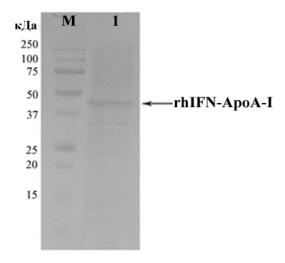


Рисунок 22. Вестерн-блотт белков, присутствующих в культуральной жидкости отобранного клона P. pastoris. Дорожки: M — предокрашенный маркер молекулярных масс (Sib Enzyme) (10-250 кДа); 1 — rhIFN-ApoA-I, продуцируемый P. pastoris.

3.4.2.4. Препаративная наработка и очистка rhIFN и rhIFN-ApoA-I

Полученные штаммы Pichia pastoris, продуцирующие максимальные rhIFN-АроА-І использовали количества цитокинов rhIFN И препаративной наработки в колбах с дефлекторами. Согласно исследованиям [403, 404], внесение неионных детергентов в культуральную среду увеличивает выход секретируемого белка и предотвращает его возможную агрегацию. С целью повышения выхода целевых белков, мы культивировали дрожжевые клетки, продуцирующие rhIFN и его химерную форму на стадии индукции синтеза белка в среде с 0.2% (w/v) неионным детергентом Твин-20. Аликвоты по 300 мкл, отобранные при выращивании с детергентом и без него, использовали для осаждения из них белков 10% ТХУ и последующего анализа осаждённых белков электрофорезом в 12 % SDS-PAG (Рисунок 23). На 4-е сутки после индукции клетки осаждали центрифугированием, а в супернатант вносили сульфат аммония до концентрации 40% от насыщения согласно п. 2.2.6.3.

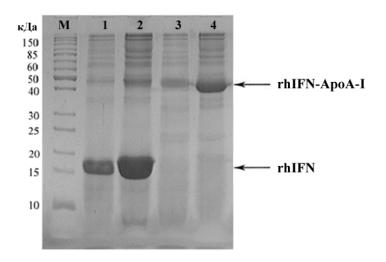


Рисунок 23. Электрофореграмма белков, преципитированных ТХУ, из супернатантов культуральных жидкостей P. pastoris. Образцы сконцентрированы в 15 раз. Электрофорез проводили в 12% SDS-PAG. Дорожки: М — маркер молекулярных масс белков (Thermo Scientific) (10–200 кДа); 1, 2 — белки из супернатантов дрожжей, несущих плазмиду pPICZ α A/IFN, выращенных в отсутствие (1) и в присутствие (2) Твин-20 (0.2% v/v); 3, 4 — белки из супернатантов дрожжей, несущих плазмиду pPICZ α -A/IFN-ApoA-I, выращенных в отсутствие (3) и в присутствие (4) Твин-20 (0.2% v/v).

Как видно из Рисунка 23, внесение неионого детергента Твин-20 в культуральную жидкость в фазе индукции увеличило выход целевых белков примерно в 2.5-3 раза и для rhIFN он составил ~ 120 мг/л, для химеры ~ 30 мг/л.

Хроматографическая очистка rhIFN

Хроматографическую очистку rhIFN проводили последовательно на колонках с DEAE- и SP-Sepharose FF согласно п. 2.2.6.4. Полученные фракции объединяли и анализировали электрофорезом в 12% SDS-PAG. Чистота конечного препарата при описанном способе очистки составила не менее 95-97% по данным денситометрии полиакриламидного геля (Рисунок 24).

Хроматографическая очистка rhIFN-ApoA-I

Химерный rhIFN-ApoA-I очищали методом обращенно-фазовой хроматографии в градиенте ацетонитрила и диализовали как указано в п. 2.2.6.4. Фракции анализировали электрофорезом в 12% SDS-PAG. Чистота конечного препарата составила ~ 90-93% по данным денситометрии полиакриламидного геля (Рисунок 24).

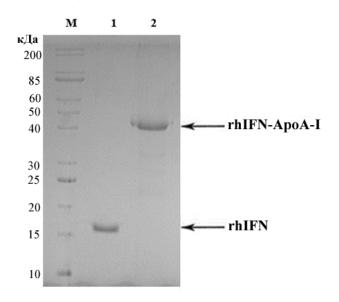


Рисунок 24. Электрофореграмма хроматографически очищенного рекомбинантного rhIFN (1) и химеры rhIFN-ApoA-I (2). Электрофорез проводили в 12% SDS-PAG. Дорожки: М — маркёр молекулярных масс белков (Sib Enzyme) (10-200 кДа).

3.4.2.5. *Масс-спектрометрический анализ rhIFN-ApoA-I*

Очищенный препарат rhIFN-ApoA-I был охарактеризован с помощью MALDI-TOF на идентичность его аминокислотной последовательности с теоретически предсказанной последовательностью rhIFN-ApoA-I. Набор пептидов триптического гидролизата рекомбинантного химерного белка охарактеризованный тандемной времяпролетной rhIFN-ApoA-I, масс-спектрометре Ultraflex III, спектрометрией на сравнивали теоретически рассчитанным набором пептидов химеры. Сравнительный анализ показал 36% сходства (Рисунки 25, 26). Следует отметить, что для небольших белков чаще фиксируется высокое соответствие детектируемыми и расчётными пептидными фрагментами. Однако химерные белки с более высокой молекулярной массой часто имеют более низкий процент перекрытия; в нашем случае он составил 36%.

Помимо основной полосы, соответствующей положению очищенного белка 49.200 rhIFN-ApoA-I c молекулярной массой кДа, на электрофореграмме наблюдалась слабо видимая полоса, соответствующая положению белка с молекулярной массой 41.0-42.0 кДа. Набор пептидов белка триптического гидролизата данной минорной полосы, охарактеризованный масс-спектрометрическим анализом, полностью совпадал с преобладающей массой пептидов химерного белка rhIFN-ApoA-I. Эти результаты свидетельствуют о том, что во время синтеза, накопления и последующей очистки/хранения химерного цитокина имеет место его частичный гидролиз.

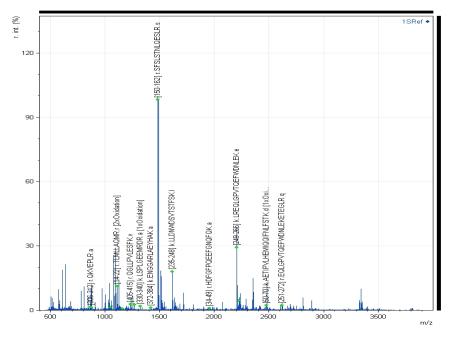


Рисунок 25. Масс-спектр триптического гидролизата химерного белка rhIFN-ApoA-I. Отмечены пики, соответствующие теоретически рассчитанным триптическим фрагментам для АК rhIFN-ApoA-I.

Рисунок 26. Аминокислотная последовательность (АКП) химерного полипептида rhIFN-ApoA-I. Жёлтым цветом выделена АКпоследовательность rhIFN; красным — АКП пептидного линкера; голубым цветом выделена АКП ApoA-I. Дополнительно выделены курсивом пептиды, идентифицированные в масс-спектре. Перекрытие сиквенса — 36.1 %.

3.4.2.6. Анализ препаратов rhIFN и rhIFN-АроА-I электрофорезом в 12% SDS-PAG в редуцирующих и нередуцирующих условиях

В процессе синтеза полипептидных цепей аутентичного rhIFN и rhIFN, входящего в состав химеры в клетках дрожжей их молекулы претерпевают ряд посттрансляционных модификаций, включая отщепление сигнального пептида, О-гликозилирование, фолдинг и образование двух внутримолекулярных дисульфидных мостиков. В случаях, когда самосборка

молекулы нарушается, могут образовываться межмолекулярные дисульфидные связи, а, следовательно, и димерные и мультимерные формы. Известно, что образование таких форм имеет место при синтезе rhIFN в клетках *E. coli*. Для получения однородных форм цитокинов, важно очищать их от примесей и от димерных и мультимерных форм. Один из подходов к определению присутствия ковалентно-сшитых между собой молекул заключается в их анализе с помощью SDS-PAGE в редуцирующих и нередуцирующих условиях.

Анализ rhIFN и rhIFN-ApoA-I на возможное присутствие ковалентно «сшитых» форм проводили согласно п. 2.2.2.7. Исходя из данных электрофореза в SDS-PAG, оба рекомбинантных белка не содержат ковалентно сшитых димерных и мультимерных форм (Рисунок 27).

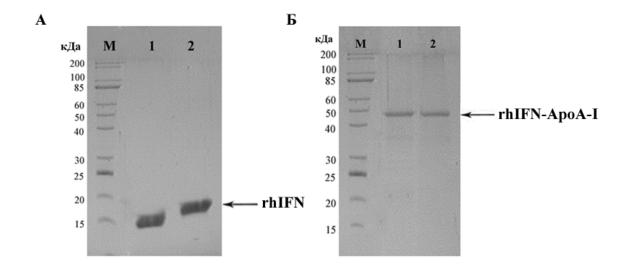


Рисунок 27. Электрофореграмма препаратов rhIFN (A) и rhIFN-ApoA-I (Б), подвергнутых электрофорезу в 12% SDS-PAG в редуцирующих и нередуцирующих условиях. Дорожки: М — маркер молекулярных масс (Sib Enzyme) (10–200 кДа); (A) 1. rhIFN (+MЭ); 2. rhIFN (-MЭ); (Б) 1. rhIFN-ApoA-I (+MЭ); rhIFN-ApoA-I (-MЭ). Обозначения (+MЭ) и (-МЭ) означают инкубацию исследуемых белков при +95°C 10 мин в присутствии и отсутствии 2-меркаптоэтанола, соответственно.

3.4.2.7. Исследование противовирусной активности rhIFN и rhIFN-ApoA-I

Специфическую противовирусную активность rhIFN и его химерной формы определяли по их способности ингибировать цитопатический эффект, вызываемый вирусом везикулярного стоматита лошадей, взятого в дозе, соответствующей 100 ТЦИД50/0,1мл, на перевиваемой линии клеток почек быка MDBK. Препаратом сравнения служил международный стандартный образец человеческого альфа-2 интерферона (MCO1) code: 95/566. Было установлено, что rhIFN и rhIFN-ApoA-I имели сравнимую удельную активность в пределах 1.5-1.3×10⁸ МЕ/мг, что соответствует стандартам Европейской фармакопеи.

3.4.2.8. Исследование фармакокинетики обеих форм rhIFN

Фармакокинетические параметры rhIFN-ApoA-I и rhIFN определяли после подкожной инъекции исследуемых форм интерферона самцам мышей CD1, как указано в методах. Результаты анализа фармакокинетики рекомбинантного химерного rhIFN-ApoA-I приведены на Рисунке 28 и Таблице 1. Фармакокинетические кривые концентрации рекомбинантных белков после однократной подкожной инъекции самцам мышей CD1 показаны на Рисунке 28.

Таблица 1. Фармакокинетические параметры rhIFN и rhIFN-ApoA-I после однократного подкожного введения самцам мышей линии CD-1 в дозах 10 мкг/кг и 25 мкг/кг, соответственно.

параметры	T1/2 (h)	Tmax (h)	Cmax (pg/ml)	SE of Cmax	AUC0-inf_obs	MRT (h)
белки					(pg/ml*h)	
rhIFN	6.701	1.000	37.897	4.715	118.140	6.011
rhIFN-ApoA-I	12.205	4.000	39.771	6.645	445.881	16.296

T1/2 — период полувыведения; Tmax — время достижения максимальной концентрации; Cmax — максимальная концентрация rhIFN в биосубстрате; SE

of Cmax – стандартная ошибка от Cmax; AUC0-inf_obs – площадь под кривой «концентрация – время» от нуля до бесконечности; MRT – среднее время удерживания действующего вещества в крови.

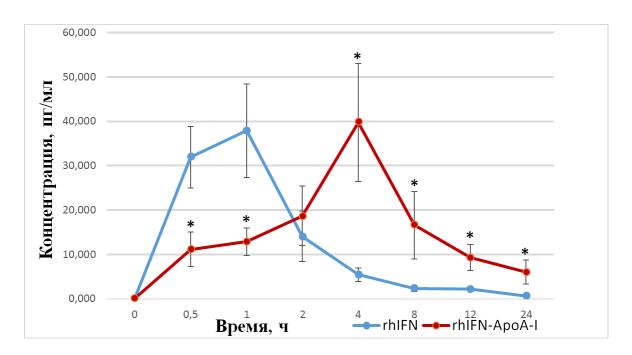


Рисунок 28. Фармакокинетические кривые концентраций rhIFN и rhIFN-ApoA-I в сыворотках крови после их введения в дозах 10 мкг/кг и 25 мкг/кг, соответственно. Числовые данные представлены как $m \pm SD$ (n=5). *p<0.03 в сравнении с rhIFN.

Как видно из Рисунка 28, после однократного подкожного введения rhIFN в дозе 10 мкг/кг, его концентрация в плазме достигла своего максимума через 1 ч (Стах – 37.897±4.715 пг/мл), в то время как при введении 25 мкг/кг rhIFN-ApoA-I, максимум концентрации наблюдался через 4 ч (Стах – 39.771±6.645 пг/мл). Уровни rhIFN в плазме значительно снизились через 8 ч после введения (предел количественного определения 3 пг/мл), тогда как при введении химерного белка спустя 24 ч определялись достаточно высокие значения 6.045 мкг/кг. Полученная АUC0-∞ для rhIFN составила 118.140 пг*ч/мл, для rhIFN-ApoA-I – 445.881 пг*ч/мл, что является важным параметром, определяющим степень всасывания лекарственной формы. Рассчитанная величина МRT0-inf, соответствующая среднему времени удержания действующего вещества в организме, составила для

rhIFN – 6.011 ч, в то время как для rhIFN-ApoA-I – 16.296 ч. То есть время, в течение которого белок будет оказывать свой терапевтический эффект для химерного белка в 2.7 раз превышало этот показатель в сравнении с rhIFN. Период полувыведения химерного белка в 1.8 раз превосходил этот показатель в сравнении с аутентичным IFN.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что ApoA-I в составе химерного белка способствует пролонгированию фармакологических эффектов rhIFN.

3.4.3. Конструирование штаммов P. pastoris, продуцирующих колониестимулирующие факторы (КСФ) rhG-CSF и rhGM-CSF и их химерные формы с ApoA-I

3.4.3.1. Проектирование, синтез и клонирование генов G-CSF и GM-CSF в клетках E. coli в составе вектора pPICZaA

Нуклеотидные последовательности генов зрелого rhG-CSF и rhGM-CSF человека были оптимизированы для экспрессии в клетках *P. pastoris* с помощью программ, указанных в методах (п. 2.2.4.2). Оптимизированные синтетические гены rhG-CSF и rhGM-CSF на 5'-концах содержали сайт рестрикции XhoI и нуклеотидную последовательность, кодирующую сайт протеолиза Kex2 и 2 сайта протеолиза Ste13; на 3'-конце находились сайт рестрикции KpnI, стоп кодон и сайты рестрикции EcoRI и SalI. Оптимизированные гены были синтезированы фирмой DNA2.0 (США) и клонированы в составе вектора pD912 по сайтам XhoI и SalI.

Полученные рекомбинантные плазмиды pD912/G-CSF и pD912/GM-CSF гидролизовали по сайтам XhoI и SalI и подвергали электрофорезу в 0.8% агарозном геле. Фрагменты, содержащие гены G-CSF и GM-CSF, элюировали из соответствующих гелей и лигировали ДНК-лигазой T4 с плазмидой pPICZ α A, предварительно гидролизованной по сайтам XhoI и SalI. Рекомбинантными плазмидами трансформировали компетентные клетки E. coli TOP10. Далее проводили стандартные процедуры селекции

рекомбинантных клеток на агаризованной среде, содержащей 25 мкг/мл зеоцина. Отобранные рекомбинантные клоны использовали для наработки соответствующих плазмид pPICZαA/G-CSF и pPICZαA/GM-CSF с целью их последующего переклонирования в клетках *P. pastoris* шт. X33, а также использования в качестве источника генов rhG-CSF и rhGM-CSF.

3.4.3.2. Конструирование рекомбинантных плазмид pPICZaA/G-CSF-ApoA-I и pPICZaA/GM-CSF-ApoA-I

Перед проведением работ, связанных с конструированием плазмид рРІСZаA/G-CSF-АроА-І и рРІСZаA/GM-CSF-АроА-І, предназначенных для экспрессии в клетках *P. pastoris* шт. X33 генов АроА-І-содержащих химерных цитокинов, был проведен анализ возможных конформаций этих химерных белков. Расчёты возможной пространственной организации химер проводили с применением серверного приложения RaptorX. Результаты этих расчётов приведены на Рисунке 29. Как можно видеть из этих рисунков, молекулы каждого из цитокинов, как и молекулы АроА-І, входящие в химеры, пространственно разобщены друг от друга и, следовательно, с высокой вероятностью не будут влиять на конформации друг друга и на свойственные им функции.

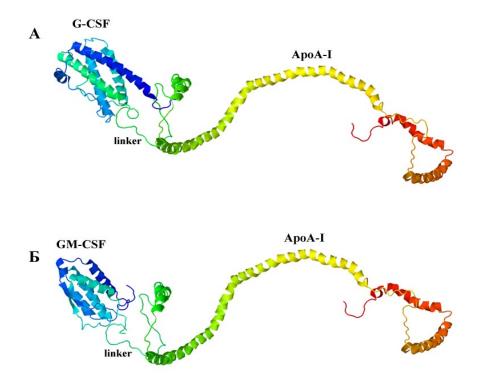


Рисунок 29. Третичные структуры рекомбинантных химерных белков rhG-CSF-ApoA-I (A) и rhGM-CSF-ApoA-I (Б), полученные с помощью серверного приложения RaptorX.

Препараты рекомбинантных плазмид pPICZαA/G-CSF и pPICZαA/GM-CSF гидролизовали по сайтам XhoI и KpnI и вырезанные фрагменты, содержащие последовательности генов зрелых цитокинов G-CSF и GM-CSF, использовали для переклонирования в составе вектора pPICZαA/IFN-ApoA-I, сконструированного как описано в п. 3.4.2.1. Для этих целей ген IFN был удален из этой плазмиды с помощью гидролиза рестриктазами XhoI и KpnI и замещен, соответственно, на гены G-CSF и GM-CSF, которые встраивали по этим же сайтам рестрикции с помощью ДНК-лигазы фага Т4 с образованием рекомбинантных плазмид pPICZaA/G-CSF-ApoA-I и pPICZaA/GM-CSF-ApoA-I. Дальнейшие генно-инженерные процедуры, связанные последовательными клонированиями полученных рекомбинантных плазмид в клетках E. coli шт. TOP10 и в дрожжах P. pastoris шт. X33 проводили по ранее описанной схеме конструирования штамма P. pastoris, несущего вектор pPICZαA/IFN-ApoA-I. Ниже приводим краткое описание этих процедур.

3.4.3.3. Трансформация клеток E. coli и скрининг трансформантов

Электрокомпетентные клетки *E. coli* шт. ТОР 10 готовили в соответствии с инструкциями фирмы-производителя (Invitrogen, США). Полученными лигазными смесями, содержащими векторные конструкции pPICZaA/G-CSF-ApoA-I и pPICZaA/GM-CSF-ApoA-I трансформировали клетки *E. coli* штамм ТОР 10, и затем клетки высевали на чашки Петри с низкосолевой агаризованной средой LB, содержащей 50 мкг/мл зеоцина.

Клоны, выросшие после трансформации лигазными смесями, анализировали методом ПЦР на наличие целевых вставок с помощью прямого AOX1-F и обратного AOX1-R праймеров, специфичных для областей рРІСZαA, фланкирующих встроенные гены G-CSF-ApoA-I и GM-CSF-ApoA-I. Размеры ампликонов определяли электрофорезом в 0.8% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Присутствие вставок генов химерных белков в ПЦР-позитивных клонах, содержащих рекомбинантные плазмиды, определяли рестрикционным анализом.

По одному из ПЦР-позитивных клонов, содержащих вставки G-CSF-АроА-I и GM-CSF-АроА-I, использовали для препаративной наработки соответствующих плазмид pPICZα-A/G-CSF и pPICZα-A/G-CSF-ApoA-I.

<u>3.4.3.4. Трансформация клеток P. pastoris и скрининг</u> трансформантов

Наработанные в клетках *E. coli* плазмиды pPICZαA/G-CSF, pPICZaA/G-CSF-ApoA-I, pPICZαA/GM-CSF и pPICZaA/GM-CSF-ApoA-I (по 10-15 мкг каждой) обрабатывали рестриктазой BstX1 и далее линеаризованными плазмидами трансформировали электрокомпетентные клетки *P. pastoris* шт. X33. После электропорации дрожжевые клетки высевали на чашки Петри с агаризованной средой YPD, содержащей 2000 мкг/мл зеоцина. На 4 день после трансформации клеток указанными плазмидами выросло по 45, 15, 17 и 8 колоний, соответственно.

Все клоны были исследованы на способность продуцировать и секретировать целевые белки с помощью их культивирования в 96-ти глубоколуночных планшетах согласно п. 2.2.4.8. По завершении культивирования спектр белков в культуральных жидкостях оценивали электрофорезом в SDS-PAG. В результате было показано, что часть проанализированных клонов продуцировала белки с молекулярными массами, соответствующими молекулярным массам цитокинов rhG-CSF, rhGM-CSF и их химерным формам с АроА-I (Рисунок 30).

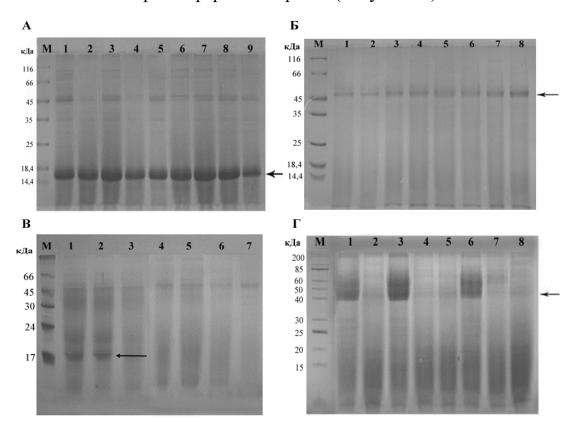


Рисунок 30. Электрофореграмма белков, присутствующих в культуральных клонов Р. анализируемых pastoris продукцию рекомбинантных цитокинов после 6-ти суток культивирования в планшете. SDS-PAG. Стрелками Электрофорез проводили В 12% положения рекомбинантных белков. (A) — Клоны P. pastoris, анализируемые на продукцию rhG-CSF (1-9); М – маркер молекулярных масс белков (Fermentas) (14.4-116 кДа); (Б) – Клоны P. pastoris, анализируемые на продукцию rhG-CSF-ApoA-I (1-8); М – маркер молекулярных масс белков (Fermentas); (B) — Клоны P. pastoris, анализируемые на продукцию rhGM-CSF (1-7); М — маркёр молекулярных масс белков (17, 24, 30, 45, 66 кДа); (Г) — Клоны P. pastoris, анализируемые на продукцию rhGM-CSF-ApoA-I (1-8); М - маркёр молекулярных масс белков (Sib Enzyme) (10-200 кДа).

Следует отметить, что уровень синтеза химеры rhG-CSF-ApoA-I во всех клонах был значительно ниже, чем аутентичного цитокина rhG-CSF (Рисунок 30 Б). Противоположная картина наблюдалась в случае биосинтеза химерного и аутентичного rhGM-CSF (Рисунок 30 В, Γ).

Присутствие ApoA-I в химерных цитокинах подтверждали вестернблоттингом с использованием кроличьего анти-ApoA-I IgG (Рисунок 31, 32).

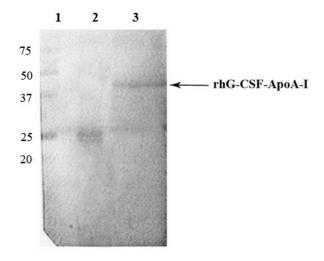


Рисунок 31. Вестерн блотт белков, присутствующих в культуральной жидкости отобранного клона дрожжей *P. pastoris*. Дорожки: 1 — предокрашенный маркер молекулярных масс белков (SibEnzyme) (10-250 кДа); 2 — нативный АроА-I человека; 3 — rhG-CSF-АроА-I, продуцируемый *P. pastoris*.

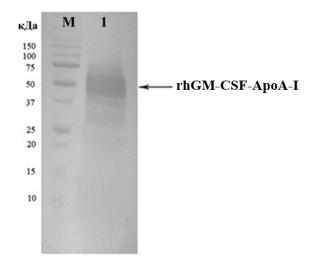


Рисунок 32. Вестерн блотт белков, присутствующих в культуральной жидкости отобранного клона дрожжей P. pastoris. Дорожки: М — предокрашенный маркер молекулярных масс белков (SibEnzyme) (10-250 кДа); 1 - rhGM-CSF-ApoA-I, продуцируемый P. pastoris.

Клоны, продуцирующие наибольшие количества рекомбинантных целевых цитокинов, отбирали для создания глицеринового музея и препаративной наработки этих белков.

3.4.3.5. Препаративная наработка аутентичных и химерных форм rhG-CSF и rhGM-CSF, синтезированных дрожжами P. pastoris

Культивирование штаммов, продуцирующих целевые аутентичные (rhG-CSF, rhGM-CSF) и химерные цитокины (rhCSF-ApoA-I, rhGM-CSF-ApoA-I), проводили в условиях, аналогичных наработке рекомбинантных цитокинов rhIFN и rhIFN-ApoA-I с внесением в культуральную среду на стадии индукции Твин-20 до конечной концентрации 0.2% (w/v). Внесение Твин-20 также, как и в предыдущем случае увеличивало выход каждого из белков приблизительно в 3 раза и конечный выход цитокинов составил: 100-120 мг/л, 5 мг/л, 60 мг/л и 100 мг/л для rhG-CSF, rhCSF-ApoA-I, rhGM-CSF и rhGM-CSF-ApoA-I, соответственно. В качестве примера повышения выхода белка приведен результат культивирования штамма, продуцирующего rhG-CSF (Рисунок 33).

Низкий уровень выхода секретируемых химерных форм цитокинов, возможно, обусловлен, как мы уже отмечали ранее, мембранотропностью ApoA-I в составе химер и связанным с этим затруднением их прохождения через клеточную мембрану и частичным лизисом клеток - продуцентов на этапе индукции метанолом.

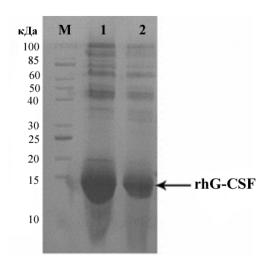


Рисунок 33. Электрофореграмма белков, преципитированных ТХУ из супернатантов культуральных жидкостей P. pastoris. Образцы сконцентрированы в 15 раз. Электрофорез проводили в 12% SDS-PAG. Дорожки: М — маркер молекулярных масс (SibEnzyme) (10—200 кДа); 1, 2 — белки из супернатантов дрожжей, несущих плазмиду pPICZ α A/G-CSF, выращенных в присутствие (1) или отсутствие (2) Твин-20 (0.2% v/v).

После завершения индукции клетки осаждали центрифугированием, а в супернатанты, содержащие аутентичные и химерные цитокины, вносили порошок сульфата аммония до концентрации 50% (при осаждении rhG-CSF и rhG-CSF-ApoA-I) и до 70% (при осаждении rhGM-CSF и rhGM-CSF-ApoA-I) от насыщения и выдерживали ночь при +4°C. Преципитаты белка осаждали центрифугированием, растворяли в буфере №5 и диализовали против данного буфера (п. 2.2.6.3).

<u>3.4.3.6. Хроматографическая очистка рекомбинантных</u> аутентичных и химерных форм КСФ

Хроматографическую очистку rhG-CSF, rhGM-CSF, и rhGM-CSF-АроА-I проводили на смолах с DEAE- и SP-Sepharose FF согласно п. 2.7.4. Элюированные фракции анализировали в 12% SDS-PAG и фракции, наиболее чистые, содержащие наиболее очищенные рекомбинантные цитокины, объединяли. По результатам электрофоретического анализа в 12% SDS-PAG, чистота rhG-CSF, rhGM-CSF и rhGM-CSF-ApoA-I составила около 95% (Рисунок 34).

Очистку rhG-CSF-АроА-I проводили двухэтапной ионообменной хроматографией на смолах с DEAE Sepharose (п. 2.2.6.4). Конечные очищенные препараты белков анализировали электрофорезом в 12% SDS-PAG. Чистота rhG-CSF-АроА-I – около 90% (Рисунок 34).

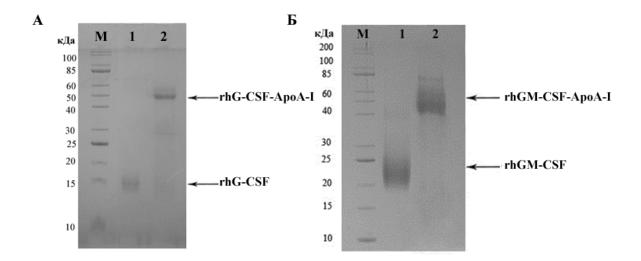


Рисунок 34. Электрофореграмма хроматографически очищенных рекомбинантных цитокинов rhG-CSF, rhG-CSF-ApoA-I (A) и rhGM-CSF, rhGM-CSF-ApoA-I (Б). Электрофорез проводили в 12% SDS-PAG. Дорожки: М – маркер молекулярных масс белков (Sib Enzyme) (10–200 кДа).

Сложность очистки химерного rhG-CSF-ApoA-I была обусловлена как низким уровнем секреции этого белка в культуральную жидкость, так и частичным лизисом клеток-продуцентов и высвобождением в культуральную жидкость внутриклеточных дрожжевых белков.

<u>3.4.3.7. Анализ препаратов КСФ электрофорезом в 12% SDS-PAG в</u> редуцирующих и нередуцирующих условиях

Как уже отмечалось выше, для получения однородных форм цитокинов, важно очищать их от примесей и от возможных димерных и мультимерных форм. Одним из способов обнаружения таких форм является анализ рекомбинантного белка с помощью электрофореза в SDS-PAG в редуцирующих и нередуцирующих условиях. Этот метод был также применен и к полученным колониестимулирующим факторам.

Как можно видеть на Рисунках 35 и 36, rhG-CSF, rhGM-CSF и rhGM-CSF-ApoA-I как в присутствие, так и в отсутствие меркаптоэтанола представлены одной полосой в геле, что свидетельствует об отсутствии

видимого содержания в препаратах димерных или мультимерных форм цитокинов.

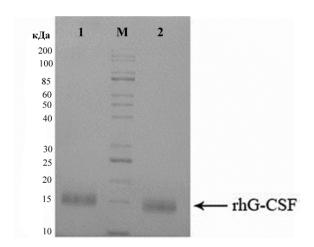


Рисунок 35. Электрофореграмма rhG-CSF подвергнутого электрофорезу в 12% SDS-PAG в редуцирующих (1) и нередуцирующих (2) условиях. М – маркер молекулярных масс белков (SibEnzyme) (10–200 кДа).

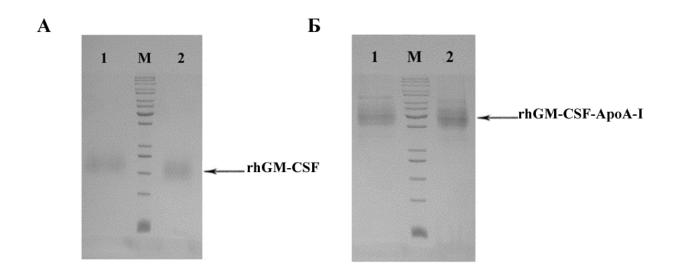


Рисунок 36. Электрофореграмма препаратов rhGM-CSF (A) и rhGM-CSF-ApoA-I (Б), подвергнутых электрофорезу в 12% SDS-PAG в редуцирующих и нередуцирующих условиях. М — маркер молекулярных масс (Sib Enzyme) (10-200 кДа); (A) 1. rhGM-CSF (+MЭ); 2. rhGM-CSF (-MЭ); (Б) 1. rhGM-CSF-ApoA-I (+MЭ); 2. rhGM-CSF-ApoA-I (-MЭ). Обозначения (+МЭ) и (-МЭ) означают инкубацию исследуемых белков при +95°C 10 мин в присутствии и отсутствии 2-меркаптоэтанола, соответственно.

3.4.4. Изучение биологических свойств химерных форм КСФ

3.4.4.1. Сравнительное исследование специфической активности обеих форм рекомбинантного rhG-CSF на ККМ крыс и человека

Исследование биологической активности рекомбинантного химерного и аутентичного rhG-CSF проводили на клетках костного мозга, которые являются прямой мишенью действия КСФ.

Поскольку G-CSF человека не является строго видоспецифичным КСФ, первоначальное исследование rhG-CSF и его химерной формы было проведено на ККМ крыс. Костный мозг крыс выделяли в стерильных условиях из большеберцовой кости и бедренных костей по стандартному протоколу как указано в методах. Влияние рекомбинантных факторов на пролиферацию и дифференцировку ККМ оценивали с помощью проточной цитометрии и подсчетом типов клеток ККМ в окрашенных мазках. Аутентичный rhG-CSF ранее был нами проанализирован в сравнении с коммерческим препаратом Лейкостим (BIOCAD) [405] и в ниже приведенных экспериментах использовался в качестве положительного контроля.

Анализ ККМ крыс методом проточной цитометрии

Методом проточной цитометрии было показано, что как rhG-CSF, так и его химерная форма стимулируют созревание и пролиферацию клеток гранулоцитарного ростка костного мозга крыс.

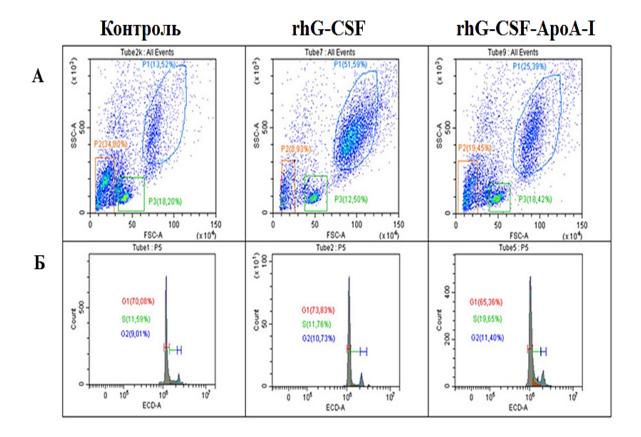


Рисунок 37. Анализ ККМ крыс методом проточной цитометрии (A): P1 – гейт гранулоцитарных клеток, P2 – гейт лимфоцитов, апоптозных, мелких клеток, P3 – гейт моноцитарных и бластных лимфоцитарных клеток; распределение ККМ по фазам клеточного цикла (Б).

Процентное содержание клеток гранулоцитарного ряда через 24 ч инкубации под действием rhG-CSF-ApoA-I было в 2 раза меньше, чем в случае с rhG-CSF, но в 1.8 раза больше, чем в контроле (Рисунок 37 A).

Анализ клеточного цикла ККМ показал, что в присутствии rhG-CSF-ApoA-I процентное содержание клеток, находящихся в фазах S- и G_2 М (31.05±0.72), было выше, чем в контроле (20.6±0.6) и в присутствии rhG-CSF (22.49±0.55) (Рисунок 37 Б), что свидетельствует о поддержании rhG-CSF-ApoA-I жизнеспособности и пролиферации бластных ККМ крыс. Следует отметить, что в присутствие химерной формы пролиферация клеток моноцитарного ряда была также выше (фаза S+ G_2 М была в 1.5 раза выше, чем в присутствие rhG-CSF). Таким образом, химерная форма, стимулируя

пролиферацию клеток данного гейта, проявляла свойства, отличные от исходного КСФ.

Анализ ККМ человека методом проточной цитометрии

Несмотря на высокую степень сходства рецептора к G-CSF у крыс и человека, мы решили исследовать действие rhG-CSF-ApoA-I также на гомологичных клетках - ККМ человека. Образец костного мозга человека имел характерные изменения гранулопоэза, выраженные в повышенном количестве бластов, миелоцитов и гипосегментированных нейтрофилов и, соответственно, в более низком содержании зрелых сегментированных нейтрофилов.

В контрольных образцах как через 24, так и через 48 часов инкубации сохранялось низкое количество клеток гранулоцитарного ряда. Оба фактора на 48 ч инкубации в одинаковой степени повышали как общее количество клеток, так и количество зрелых сегментированных нейтрофилов (в контроле – 22.1±0.6%), под действием rhG-CSF и rhG-CSF-ApoA-I – 32.6±0.45% и 33.6±0.5%, соответственно. Процентное содержание клеток гранулоцитарного ряда в данном случае было выше в 1.5 раза в присутствии КСФ по сравнению с контролем.

Оба фактора поддерживали жизнеспособность ККМ человека, снижая гибель клеток в 1.7 раз по сравнению с контролем (p<0.001, n=3) (Рисунок 38, гейт Р). Общее количество клеток в присутствии КСФ было статистически значимо выше по сравнению с контролем, с преимущественной разницей в случае rhG-CSF-ApoA-I (в 1.5 раза выше контрольных значений).

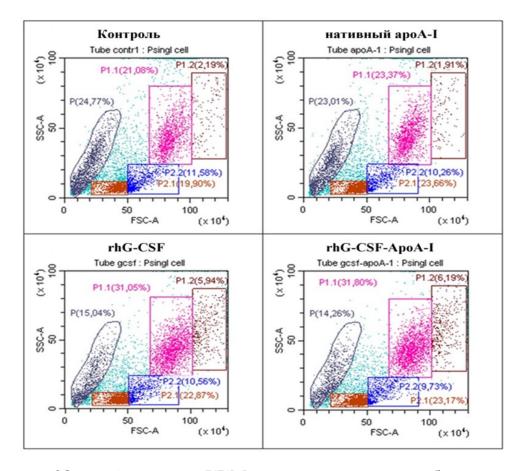


Рисунок **38.** ККМ Анализ человека, инкубированных колониестимулирующими факторами и с нативным АроА-І на 48 Гейт P1.1 популяция гранулоцитов; инкубации. зрелых _ P2.1 гранулоцитарные прогениторы; лимфоциты, оксифильные. полихроматофильные нормоциты; Р2.2 – моноцитарные клетки и бластные клетки без гранул (лимфобласты, монобласты). Р - клеточный дебрис и мелкие ККМ.

АроА-I, взятый в количестве, применимом для цитокинов – 50 нг/мл, не оказывал статистически значимого влияния на ККМ человека (Рисунок 38).

Был также проведен анализ клеточного цикла ККМ человека, инкубируемых в присутствии исследуемых факторов в течение 24 ч.

Анализ клеточного цикла ККМ человека

Исследование фаз клеточного цикла ККМ человека показало, что химерная форма G-CSF, также как и в случае с ККМ крыс, значительнее активировала пролиферацию ККМ, чем его аутентичная форма, что

способствовало приросту общего количества клеток в присутствии химеры (Рисунок 39).

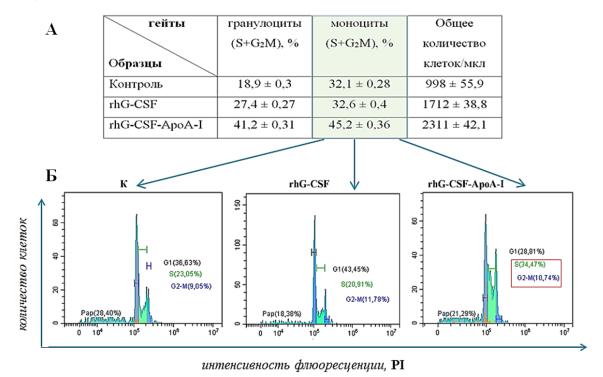


Рисунок 39. Клеточные циклы гранулоцитарного и моноцитарного гейтов ККМ человека, инкубированных в присутствие rhG-CSF и rhG-CSF-ApoA-I (A) — процентное распределение клеток в S- и G_2 M-фазах клеточного цикла; (Б) — клеточные циклы моноцитарного гейта.

Процентное содержание клеток в S- и G_2 М-фазах в присутствии химеры rhG-CSF-АроА-I было выше не только для клеток гранулоцитарного ростка, но и для клеток моноцитарного ряда, что подтверждает полученные ранее результаты на ККМ крыс. В моноцитарном гейте в фазе S+ G_2 М содержалось $45.2\pm0.36\%$ клеток в присутствие rhG-CSF-АроА-I, в то время как в контроле — $32.1\pm0.28\%$. RhG-CSF не оказывал влияния на клетки моноцитарного ряда и не отличался в данном случае от контроля (Рисунок 39).

Это также интересный факт, учитывая ранее обнаруженное в работах нашего института [406] влияние АроА-І на пролиферацию клеток моноцитарного ряда. Но в наших экспериментах АроА-І, взятый в нанограммовых количествах, используемых для оценки активности

цитокинов, не оказывал статистически значимого влияния на ККМ (Рисунок 38).

Миелограмма гранулоцитарного ряда ККМ человека

Миелограмма позволяет более точно увидеть разницу в действии изучаемых факторов, поэтому был сделан подробный анализ ККМ человека. Анализ окрашенных мазков ККМ человека показал, что в контроле через 24 ч инкубации сохраняется нарушение созревания нейтрофилов со сдвигом влево, гранулоцитарный росток составлял ~ 27% от всех клеток и содержал повышенное количество молодых и бластных форм гранулоцитов. В образцах, обработанных rhG-CSF и rhG-CSF-АроА-I, гранулоцитарный росток составляет – 41% и 36%, соответственно (процентное соотношение клеток гранулоцитарного ряда посчитано из общего количества клеток миелограммы). Колониестимулирующие факторы существенно активировали пролиферацию прогениторов, увеличивая количество зрелых сегментированных нейтрофилов в 2.7 раз по сравнению с контролем, снижая нейтрофилов, гипосегментированных количество нормализовали гранулопоэз.

Для более четкого представления данных миелограммы, клетки были сгруппированы в 4 группы по степени зрелости гранулоцитов (Рисунок 40).

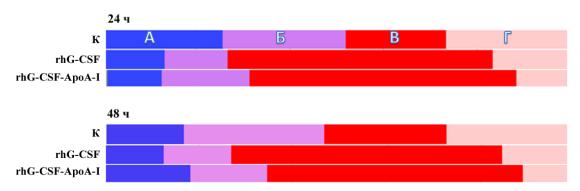


Рисунок 40. Распределение клеток гранулоцитарного ряда костного мозга человека, инкубированных в течение 24 и 48 ч в присутствие rhG-CSF и rhG-CSF-ApoA-I. Группа «А» – бласты (миелобласт, промиелоцит, миелоцит), «Б» – молодые клетки (метамиелоцит, палочкоядерный нейтрофил), «В» –

зрелые (сегментоядерные нейтрофилы), « Γ » — аномальный фенотип (палочкоядерные и 2-х сегментные нейтрофилы с менее зрелым ядром).

Как видно из Рисунка 40, в контрольных образцах сохраняется нарушение гранулопоэза в течение всего времени эксперимента (48 ч), характеризуемое низким содержанием зрелых нейтрофилов (контроль 24ч «В» − 21.3±0.35%, контроль 48ч «В» − 26.2±0.2%) и повышенным содержанием аномальных гипосегментированных нейтрофилов (контроль 24ч «Г» − 26±0.35%, контроль 48ч «Г» − 27.3±0.3%). Оба фактора статистически значимо повышают содержание зрелых сегментированных нейтрофилов: в случае rhG-CSF − на 24ч инкубации − 56.8±0.4% (24ч «В»), rhG-CSF-АроА-I − 58.1±0.36%. Оба фактора также снижают число аномальных нейтрофилов: в случае с rhG-CSF − 16.4±0.27%, с rhG-CSF-АроА-I − 10.8±0.25%. Химерная форма более эффективно нормализует гранулопоэз, статистически значимо отличаясь и от аутентичной формы (р<0.01).

На Рисунке 40 также видно, что химерная форма поддерживает бластные клетки гранулоцитарного ростка (rhG-CSF-ApoA-I 48ч «А» – $18.2\pm0.26\%$) на 48 ч инкубации. В контроле (48ч «А» – $16.6\pm0.25\%$ против 24ч «А» – 25.5 ± 0.32 %) и в присутствии rhG-CSF (48ч «А» – 12.6 ± 0.26 % против 244 «А» – 13.1 ± 0.23 %) идет снижение процентного содержания клеток, способных К делению. Эти данные свидетельствуют пролонгированном действии химерного цитокина на клетки гранулоцитарного ряда, обусловленном, вероятно, большей устойчивостью химеры к гидролитическим ферментам.

Примечательно также, что в присутствие rhG-CSF-ApoA-I наблюдался более выраженный фагоцитоз клеточного дебриса. Этот факт представляет интерес, в частности для изучения возможности использования rhG-CSF-ApoA-I в терапии плохо заживающих трофических язв с нарушенной

фагоцитарной функцией в зоне бактериального обсеменения язвы ран у пациентов с сахарным диабетом.

Таким образом, АроА-I в составе химеры модулировал действие G-CSF, пролонгируя пролиферацию клеток гранулоцитарного ростка и нормализуя сегментацию нейтрофилов в случае аномалии их созревания и сегментации. Кроме того, химерная форма проявляла более широкий спектр активности, в сравнении с аутентичным КСФ, увеличивая в 1.4 раза пролиферацию клеток моноцитарного ряда, а также поддерживая жизнеспособность и пролиферацию клеток других ростков костного мозга.

<u>3.4.4.2. Сравнительное исследование специфической активности</u> обеих форм рекомбинантного rhGM-CSF

Исследование эритроид-стимулирующей активности rhGM-CSF и rhGM-CSF-ApoA-I на линии клеток TF-1

Известно, что GM-CSF поддерживает пролиферацию и жизнеспособность как миелодных клеток- предшественников, так и является мощным стимулятором пролиферации эритроидных бурст-формирующих единиц (BFU-E) и колоний мегакариоцитов, образующих (CFU-MK).

В связи с этим, биологическую активность rhGM-CSF и rhGM-CSF-АроА-I первоначально исследовали на линии клеток эритролейкемии человека ТF-1, которая является GM-CSF-зависимой и пролиферирует в присутствии GM-CSF и некоторых других цитокинов. В качестве положительного контроля для количественной оценки стимулирующей пролиферацию активности исследуемых факторов, использовали препарат rhGM-CSF, полученный экспрессией в клетках *E. coli* [396]. Эксперименты проводили в широком диапазоне концентраций калибровочного белка rhGM-CSF.

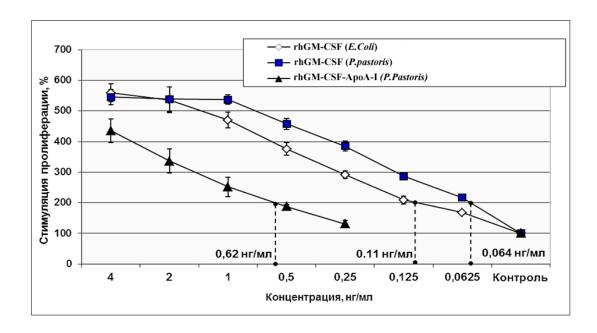


Рисунок 41. Стимулирующее влияние рекомбинантных КСФ, полученных синтезом в дрожжах P. pastoris и в E. coli, на пролиферацию клеток TF-1.

На Рисунке 41 показано влияние полученных рекомбинантных hGM-CSF и hGM-CSF-АроА-I на пролиферацию клеток TF-1 в сравнении с контрольным «бактериальным» rhGM-CSF. Как можно видеть, двукратный стимулирующий пролиферацию эффект на клетки TF-1 достигался при концентрации «бактериального» rhGM-CSF — 0.11 нг/мл, тогда как для достижения аналогичного эффекта, вызываемого «дрожжевым» rhGM-CSF, требовалось всего 0.064 нг/мл. Таким образом, «дрожжевой» rhGM-CSF является более мощным стимулятором пролиферации эритроидных единиц (ВFU-E) по сравнению с контрольным «бактериальным» rhGM-CSF, проявляя в 1.7 раза большую стимулирующую активность на клетках TF-1.

Наблюдаемая более высокая стимулирующая активность «дрожжевого» rhGM-CSF, по-видимому, обусловлена тем, что он, как и природный hGM-CSF, является гликозилированным белком. Химерный «дрожжевой» rhGM-CSF-АроА-I также активировал пролиферацию клеток TF-1, но проявлял существенно меньшую активность по сравнению с «бактериальным» и «дрожжевым» препаратами GM-CSF — 2-кратный пролиферативный эффект на клетках TF-1 достигался при концентрации 0.62

нг/мл. Снижение стимулирующей пролиферацию активности химеры, повидимому, обусловлено экранирующим влиянием ApoA-I на её взаимодействие с белками мембраны клеток TF-1.

Исследование миелостимулирующей активности rhGM-CSF и rhGM-CSF-ApoA-I на ККМ человека

Рекомбинантный GM-CSF наиболее широко используется для профилактики нейтропении и нейтропенических осложнений у пациентов с пониженным количеством нейтрофилов в крови. В связи с этим, в качестве образца для исследования рекомбинантных КСФ был взят костный мозг человека с пониженным количеством нейтрофилов и нарушением их созревания.

ККМ инкубировали с колониестимулирующими факторами в течение 48 ч. Действие rhGM-CSF-АроА-I в сравнении с rhGM-CSF оценивали первоначально с помощью проточной цитометрии.

Анализ ККМ человека методом проточной цитометрии

Анализ ККМ проточной цитометрией показал, что под действием обоих факторов увеличивалось общее количество жизнеспособных ККМ, особенно эта разница была выражена в случае с rhGM-CSF-ApoA-I. Хотя в процентном соотношении общее количество клеток гранулоцитарного ряда под действием rhGM-CSF и rhGM-CSF-ApoA-I было практически одинаковым, анализ клеточного цикла показал, что в присутствие химеры количество клеток в активном цикле было значительно больше (фазы S + G₂M) – 19.6% по сравнению с rhGM-CSF (12.66%) и контролем (8.3%) (Рисунок 42 II). Кроме того, при инкубации с rhGM-CSF-ApoA-I количество апоптотических клеток было в 1.6 раз меньше, чем в случае с rhGM-CSF и в 1.8 раз меньше, чем в контроле (Рисунок 42 II).

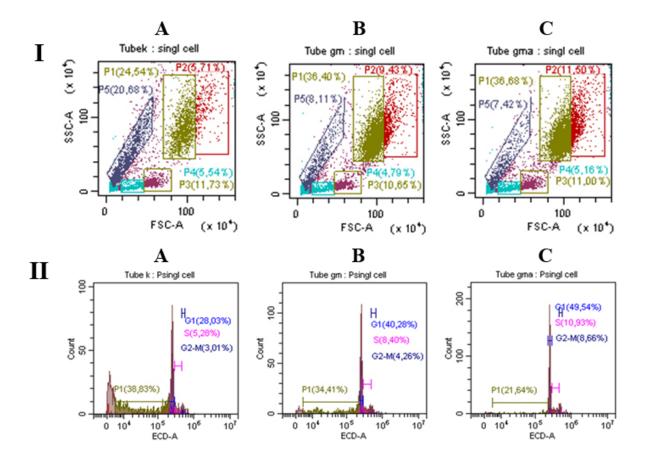


Рисунок 42. (I) — Анализ ККМ человека на 48 ч инкубации с rhGM-CSF (B) и rhGM-CSF-ApoA-I (C) в сравнении с контролем (A). Гейт P1 — популяция зрелых гранулоцитов; P2 — гранулоцитарные прогениторы; P3 — моноцитарные клетки и бластные клетки без гранул (лимфобласты, монобласты); P4 — лимфоциты, оксифильные, полихроматофильные нормоциты; P5 — клеточный дебрис и мелкие ККМ. (II) — Клеточный цикл всех популяций ККМ человека.

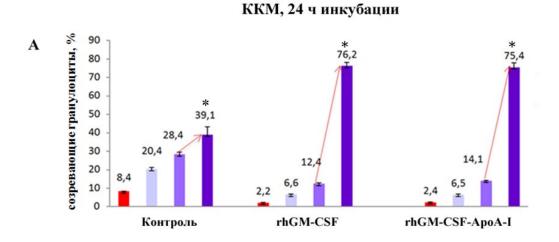
Более значительное снижение апоптоза и увеличение уровня пролиферации в присутствии rhGM-CSF-АроА-I обусловливает увеличение общего количества жизнеспособных клеток по сравнению как с аутентичной формой, так и с контролем (1340±167 – в контрольных образцах; 1885±75 и 2055±61 для rhGM-CSF и rhGM-CSF-АроА-I, соответственно. В этом случае, вероятно, проявляется аддитивный эффект АроА-I и GM-CSF. Известно, что АроА-I увеличивает жизнеспособность клеток, хотя в этих случаях он используется в микрограммовых количествах. В наших исследованиях оба фактора использовались в нанограммовых количествах.

Миелограмма гранулоцитарного и эритроидного ряда ККМ человека

Анализ окрашенных мазков образцов ККМ человека показал, что оба фактора значительно увеличивали количество клеток гранулоцитарного ряда (до $51\pm6\%$) (данные взяты из полной миелограммы).

Для визуализации динамики изменений (24-48 ч) клеточного состава гранулоцитов под действием КСФ, клетки были разделены на группы:

- а) бластные формы гранулоцитарных клеток (миелобласты, промиелоциты);
 - б) молодые формы (миелоциты материнские и дочерние);
- в) созревающие клетки (метамиелоциты, палочкоядерные нейтрофилы);
- г) зрелые формы гранулоцитов (сегментированные нейтрофилы) (Рисунок 43).



ККМ, 48 ч инкубации созревающие гранулоциты, % Б 58,9 58,1 60 бластные клетки 50 41,2 миелоцитыметамиелоциты +палочк. нейтр зрелые нейтрофилы 40 30,6 26,9 30 20,6 20 16,1 10 2,9 3,3 1,25 rhGM-CSF rhGM-CSF-ApoA-I Контроль

Рисунок 43. Динамика изменения клеточного состава гранулоцитарного ряда костного мозга в течение 24-48 ч инкубации с rhGM-CSF и rhGM-CSF-ApoA-I. RhGM-CSF и rhGM-CSF-ApoA-I достоверно отличаются от контроля, *p<0.005; rhGM-CSF-ApoA-I достоверно отличается от rhGM-CSF, **p<0.005.

Как видно из Рисунка 43, в контрольных образцах созревание нейтрофилов заметно нарушено, поскольку количество палочкоядерных И метамиелоцитов практически равнялось сегментированных нейтрофилов на 24 и 48 ч инкубации. Оба фактора значительно стимулировали нормальное созревание нейтрофилов, удваивая количество сегментированных нейтрофилов в течение 24 ч инкубации. В процессе созревания уменьшается количество аномальных нейтрофилов и бластных клеток. В присутствие rhGM-CSF снижается количество увеличение количества зрелых гранулоцитов в течение 1 дня инкубации сопровождалось дальнейшим уменьшением количества бластных форм на 48 ч инкубации, в то время как химерная форма аналогичным образом стимулировала созревание гранулоцитов, слегка увеличивая количество бластных форм на второй день инкубации (увеличение с 2.4% до 3.3%) (Рисунок 43). Химера лучше поддерживала жизнеспособность клеток и более высокий уровень пролиферации на 48 ч инкубации (Рисунок 42 II и 43 Б).

По миелограммы было отмечено, ЧТО оба данным активировали бластные клетки эритроидной линии, однако действие rhGM-CSF было более эффективным на первые сутки (3.9±0.14% клеток были проэритробластами), в то время как в присутствии химерной формы количество проэритробластов было меньше (1.1±0.08%). К 48 ч инкубации количество бластных эритроидных клеток под действием обоих факторов $6.1\pm0.3\%$. Аутентичная сравнялось И составило форма rhGM-CSF продемонстрировала полный спектр полилинейной дифференциации; наблюдалось небольшое количество мегакариобластов, в то время как в присутствие rhGM-CSF-ApoA-I эти клетки не наблюдались.

Следует отметить, что химера хорошо поддерживала жизнеспособность ретикулярно-стромальной системы костного мозга. Возможно, этот эффект связан с присутствием АроА-I в составе химерного белка.

Таким образом, химерный белок, как и rhGM-CSF, проявляет свойства ростового фактора, поддерживая жизнеспособность ККМ человека в течение 48 ч инкубации. Оба фактора нормализовали гранулоцитопоэз, уменьшая количество гипосегментированных нейтрофилов, увеличивая общее количество клеток гранулоцитарного ряда при сохранении количества бластных форм. Кроме того, пролиферативная активность клеток в присутствии химеры была выше, апоптозная гибель ниже, чем в случае rhGM-CSF, что способствовало увеличению общего количества клеток.

Исследование способности rhGM-CSF и rhGM-CSF-ApoA-I индуцировать созревание дендритных клеток

Биологическую активность rhGM-CSF-ApoA-I в сравнении с rhGM-CSF способности индуцировать дифференцировку оценивали также ПО дендритных клеток (ДК), полученных из моноцитов крови человека путем культивирования адгезивной фракции мононуклеарных клеток с КСФ и IFNа с последующим дозреванием в присутствии ЛПС. Эффективность индукции ДК оценивали по экспрессии маркеров моноцитов (CD14), костимуляторных (CD86) и зрелых ДК (CD83). Оценивалась также способность ДК стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток. В контроля качестве положительного использовали коммерческий бактериальный rhGM-CSF, а также полученный нами «дрожжевой» rhGM-CSF.

Было обнаружено, что при инкубации мононуклеаров крови в присутствие обоих форм «дрожжевых» GM-CSF и индукции ЛПС происходило снижение маркеров моноцитов (CD14) и возрастание маркеров зрелых ДК, костимуляторных (CD86) и антигенпрезентирующих молекул

(HLA-DR). ДК, полученные при инкубации с обеими формами rhGM-CSF, оказывают схожий эффект с коммерческим GM-CSF по способности индуцировать пролиферацию лимфоцитов (Рисунок 44). Статистически достоверной разницы между 3 колониестимулирующими факторами не наблюдалось.

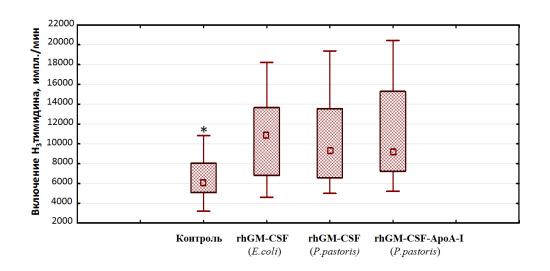


Рисунок 44. Аллостимуляторная активность дендритных клеток, генерированных в присутствии различных GM-CSF. Контроль достоверно отличался от всех тестируемых КСФ (*p<0.01).

Таким образом, полученный химерный rhGM-CSF-АроА-I проявлял свойства ростового фактора, стимулируя созревание клеток гранулоцитарного и эритроидного ряда сопоставимо с аутентичной формой rhGM-CSF на ККМ человека. Кроме того, химерная форма GM-CSF более эффективно поддерживала жизнеспособность ККМ за счет уменьшения апоптоза и поддержания пролиферативного потенциала клеток в течение более длительного времени. На мононуклеарах человека rhGM-CSF-ApoA-I индуцировал созревание ДК сопоставимо с аутентичным rhGM-CSF и коммерческим препаратом rhGM-CSF. Эритроид-стимулирующая активность rhGM-CSF-ApoA-I на клеточной линии TF-1 хоть и была снижена практически на порядок, в сравнении с аутентичным rhGM-CSF, однако оставалась в концентрациях, используемых для цитокинов.

Получение генно-инженерных конструкций на основе АроА-І получение химерных полипептидов получение химерных для модуляции и пролонгации цитокинов полипептидов для переноса генов сборка конструкции трансформация трансформация отбор клонов Очищенны химеры фармакокинетика наработка и rhG-CSF-ApoA-I rhGM-CSF-ApoA-I очистка белков rhIFN-ApoA-I Действие на Действие зараженные на ККМ вирусом клетки трансфекция • сохранение активности 100% сохранение цитокинов противовирусной активности модуляция действия цитокинов в составе химеры Продление периода Эффективность трансфекции ~ 5% полужизни в 1,8 раз

Рисунок 45. Дизайн исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа посвящена исследованию АроА-І человека в гибридных генно-инженерных конструкциях в качестве белка-протектора и средства доставки биомакромолекул в клетки млекопитающих. Работа состоит из двух больших блоков — блока, связанного с переносом генетического материала в клетки эукариот и блока, посвящённого созданию цитокин-содержащих конструкций пролонгированного действия со сниженной токсичностью.

Для трансфекции ДНК в клетки эукариот были сконструированы мультидоменные полипептиды, содержащие домены гистона H2A, обеспечивающие связывание и интернализацию ДНК в ядро, пептида PTD-4, способствующего внутриклеточной интернализации полноразмерного зрелого АроА-I, экранирующего ДНК от действия нуклеаз. Полученные полипептиды хоть и уступали по эффективности системам доставки ДНК на основе вирусных векторов ИЛИ синтетических трансфектантов (Lipofectin, Lipofectamine и др.), однако их применение является более безопасным. В целом, сконструированные мультидоменные полипептиды могут рассматриваться в качестве прообраза потенциальных будущих невирусных систем переноса (доставки) генов в клетки эукариот.

Основная часть работы была посвящена созданию гибридных конструкций на основе АроА-I для возможной пролонгации и снижения токсичности широко используемых в терапии цитокинов – IFN, G-CSF и GM-CSF. Как известно, серьезным недостатком большинства используемых терапевтических белков является их короткий период полужизни в организме пациента (3-5 ч) и оказываемое ими множество побочных эффектов. В настоящей работе в целях увеличения времени полужизни и снижения токсичности цитокинов были созданы химерные рекомбинантные АроА-I - содержащие полипептиды.

Анализ химерных колониестимулирущих факторов показал, что АроА-I в составе химерных конструкций не только не снизил специфические активности свойственные слитым с ним цитокинам, но также модифицировал некоторые их свойства. Химерные колониестимулирующие факторы rhG-CSF-ApoA-I и rhGM-CSF-ApoA-I повышали жизнеспособность и снижали апоптоз клеток костного мозга. АроА-I в составе химеры rhG-CSF-ApoA-I расширил спектр биологических активностей G-CSF, в результате чего химерный цитокин увеличивал пролиферацию не только гранулоцитарных клеток, но и клеток моноцитарного ряда. Кроме того, было показано, что rhG-CSF-ApoA-I нормализовал сегментацию нейтрофилов, в 1.5 раза эффективнее снижая количество аномалий на клетках костного мозга человека с нарушением гранулопоэза.

При исследовании химерной формы rhIFN было установлено, что IFN в составе химеры с АроА-I полностью сохранил свои противовирусные свойства, а изучение фармакокинетических параметров химерного белка на линии мышей показало, что период полужизни химеры был в 1.8 раз больше, чем у аутентичного rhIFN. Этот результат свидетельствует о перспективности использования АроА-I в качестве белка-протектора в химерных конструкциях наряду с традиционно используемыми для этих целей длительно циркулирующими белками плазмы крови (альбумин, иммуноглобулины, трансферрин).

Вышеизложенное позволяет сделать вывод, что создание химерных цитокинов на основе АроА-I способствует не только продлению времени их полужизни, но и существенно снижает их цитотоксическое действие.

Таким образом, конструирование на основе АроА-І химерных полипептидов с целью защиты, пролонгации и модуляции действия цитокинов перспективным направлением медицинской является биотехнологии быть И может положено основу создания иммунотерапевтических препаратов нового поколения.

ВЫВОДЫ

- 1. По данным ИК-Фурье спектроскопии и гель-ретардации, ApoA-I связывается с плазмидной ДНК за счёт слабых межмолекулярных взаимодействий.
- 2. Сконструированы штаммы *Escherichia coli* BL21(DE3), продуцирующие химерные полипептиды PTD-ApoAI-H2A, H2A-ApoAI-H2A и гистон H2A. Полученные рекомбинантные полипептиды способны образовывать стабильные комплексы с ДНК и обеспечивать трансфекцию плазмидной ДНК в клетки НЕК 293T, с эффективностью, составляющей 3-5%.
- 3. Генно-инженерными методами получены штаммы *Pichia pastoris* X33 продуценты рекомбинантных аутентичных и химерных форм цитокинов человека: rhIFN, rhIFN-ApoA-I, rhG-CSF, rhG-CSF-ApoA-I, rhGM-CSF, rhGM-CSF-ApoA-I. Рекомбинантные цитокины в составе химерных форм в полной мере сохраняют биологические функции, свойственные их аутентичным аналогам.
- 4. АроА-I в составе химерных колониестимулирующих факторов модулирует специфические активности слитых с ним rhG-CSF и rhGM-CSF, в результате чего химерные цитокины эффективнее повышают общую жизнеспособность клеток, снижают апоптоз (особенно в случае rhGM-CSF-ApoA-I) и пролонгируют действие прогениторных форм клеток костного мозга. Кроме того, химерный rhG-CSF в 1.5 раза эффективнее, чем аутентичная форма, нормализует пролиферацию, созревание и сегментацию нейтрофилов на клетках костного мозга человека с нарушением гранулопоэза.
- 5. Химера rhG-CSF-АроА-I проявляет расширенный спектр действия в отличие от rhG-CSF, увеличивая в 1.4 раза пролиферацию клеток моноцитарного ряда костного мозга.

6. По результатам экспериментов на мышах линии CD1, химерный rhIFN-ApoA-I обладает в 1.8 раз более продолжительным временем полужизни, чем rhIFN.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКП – аминокислотная последовательность

а.о. – аминокислотный остаток

ГСК – гемопоэтические стволовые клетки

ДК – дендритные клетки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид

ИФА – иммуноферментный анализ

КСФ – колониестимулирующий фактор

ЛП – липопротеины

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПС – липополисахарид

ЛХАТ – лецитинхолестеринацилтрансфераза

МДСК – малодифференцированные супрессорные клетки миелодного происхождения

МНК – мононуклеарные клетки

МСК – мезенхимальные стволовые клетки

 $O\Pi$ – оптическая плотность

п.н. – пара нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

 $\Pi \Im \Gamma$ – полиэтиленгликоль

РНКаза – рибонуклеаза

ТЕМЕД - N, N, N', N' - тетраметилэтилендиамин

ТФУ – трифторуксусная кислота

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ApoA-I – аполипопротеин A-I

BSA – bovine serum albumin, бычий сывороточный альбумин

- BFU-E- Burst-forming unit-erythroid эритроидные бурст, формирующие единицы
- G-CSF (rhG-CSF) рекомбинантный гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека
- rhG-CSF-ApoA-I химера, содержащая слитые последовательности рекомбинантных G-CSF и ApoA-I человека
- GM-CSF (rhGM-CSF) рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека
- rhGM-CSF-АроА-I химера, содержащая слитые последовательности рекомбинантных GM-CSF и АроА-I человека
- CPPs cell-penetrating peptides, пептиды, проникающие в клетки
- FBS fetal bovine serum, сыворотка крови крупного рогатого скота
- GFP green fluorescent protein, зеленый флюоресцирующий белок
- HSA human serum albumin, сывороточный альбумин человека
- Н2А гистон Н2А человека
- H2A-ApoAI-H2A рекомбинантный полипептид, содержащий слитые последовательности H2A, ApoA-I и H2A человека
- IFNα-2b лейкоцитарный интерферон альфа 2b человека
- IFN (rhIFN) рекомбинантный интерферон-α2b человека
- rhIFN-ApoA-I химера, содержащая слитые последовательности рекомбинантных IFN и ApoA-I человека
- MALDI Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, матричноактивированная лазерная десорбция/ионизация
- 2-MeEtOH 2-меркаптоэтанол
- PBS phosphate buffered saline, натрий фосфатный буфер
- PI propidium iodide, йодид пропидия
- PTD protein transduction domain, домен белковой трансдукции
- PTD-АроАІ-Н2А рекомбинантный полипептид, содержащий слитые последовательности PTD, АроА-I и H2A человека

SDS – sodium dodecyl sulfate, додецилсульфат натрия

SDS-PAG – SDS-полиакриламидный гель

SDS-PAGE – электрофорез в SDS-полиакриламидном геле

SR-B1 – Scavenger receptor class B type 1, скавенджер рецептор B1

TLRs – toll-like receptors, толл-подобные рецепторы

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Khan S., Ullah M.W., Siddique R., и др. Role of Recombinant DNA Technology to Improve Life // Int. J. Genomics. 2016. –2405954.
- Russell D.W. AAV vectors, insertional mutagenesis, and cancer // Mol. Ther.
 2007. Vol. 15. №. 10. P. 1740-1743.
- 3. Raad Md., Teunissen E.A., Mastrobattista E. Peptide vectors for gene delivery: from single peptides to multifunctional peptide nanocarriers // Nanomedicine (Lond). 2014. Vol. 9. №. 14. P. 2217-2232.
- 4. Usmani S.S., Bedi G., Samuel J.S., и др. THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics // PLoS One. 2017. Vol. 12. №. 7. e0181748.
- 5. Tang L., Persky A.M., Hochhaus G., и др. Pharmacokinetic aspects of biotechnology products // J. Pharm. Sci. 2004. Vol. 93. №. 9. Р. 2184-2204.
- 6. Chi E.Y., Krishnan S., Randolph T.W., и др. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation // Pharm. Res. 2003. Vol. 20. №. 9. Р. 1325-1336.
- 7. Baldo B.A. Side effects of cytokines approved for therapy // Drug Saf. 2014. Vol. 37. №. 11. P. 921-943.
- 8. Strohl W.R. Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetter // BioDrugs − 2015. Vol. 29. №. 4. P. 215-239.
- 9. Jafari R., Zolbanin N.M., Rafatpanah H., и др. Fc-fusion Proteins in Therapy: An Updated View // Curr. Med. Chem. 2017. Vol. 24. №. 12. Р. 1228-1237.
- 10. Rogers B., Dong D., Li Z., и др. Recombinant human serum albumin fusion proteins and novel applications in drug delivery and therapy // Curr. Pharm. Des. 2015. Vol. 21. №. 14. Р. 1899-907.

- 11. Kuai R., Li D., Chen Y.E., и др. High-Density Lipoproteins: Nature's Multifunctional Nanoparticles // ACS Nano. 2016. Vol. 10. №. 3. Р. 3015–3041.
- 12. Lavker R.M., Kaplan N., McMahon K.M., и др. Synthetic high-density lipoprotein nanoparticles: Good things in small packages // Ocul. Surf. 2021. Vol. 21. P. 19-26.
- 13. Chuang S.T., Cruz S., Narayanaswami V. Reconfiguring Nature's Cholesterol Accepting Lipoproteins as Nanoparticle Platforms for Transport and Delivery of Therapeutic and Imaging Agents // Nanomaterials (Basel). − 2020. − Vol. 10. − №. 5:906.
- 14. Garner B., Waldeck A.R., Witting P.K., и др. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. №. 11. P. 6088–6095.
- 15. Karjalainen M.K., Holmes M.V., Wang Q., и др. Apolipoprotein A-I concentrations and risk of coronary artery disease: A Mendelian randomization study // Atherosclerosis. 2020. Vol. 299. P. 56-63.
- 16. Mineo C., Deguchi H., Griffin J.H., и др. Endothelial and antithrombotic actions of HDL // Circ. Res. 2006. Vol. 98. №. 11. Р. 1352-1364.
- 17. Zamanian-Daryoush M., Lindner D., Tallant T.C., и др. The cardioprotective protein apolipoprotein A1 promotes potent anti-tumorigenic effects // J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288. №. 29. P. 21237-21252.
- 18. Catapano A.L., Pirillo A., Bonacina F., и др. HDL in innate and adaptive immunity // Cardiovasc. Res. 2014. Vol. 103. №. 3. P. 372–383.
- 19. Segrest J.P., Garber D.W., Brouillette C.G., и др. The amphipathic alpha helix: a multifunctional structural motif in plasma apolipoproteins // Adv. Protein Chem. 1994. Vol. 45. P. 303-369.
- 20. Kingwell B.A., Chapman M.J., Kontush A., и др. HDL-targeted therapies: progress, failures and future // Nat. Rev. Drug Discov. 2014. Vol. 13. №. 6. Р. 445-464.

- 21. Takahashi Y., Smith J.D. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1999. Vol. 96. №. 20. P. 11358-11363.
- 22. Pollard R.D., Fulp B., Sorci-Thomas M.G., и др. High-Density Lipoprotein Biogenesis: Defining the Domains Involved in Human Apolipoprotein A-I Lipidation // Biochemistry. 2016. Vol. 55. №. 35. Р. 4971-4981.
- 23. Hamilton R.L. Synthesis and secretion of plasma lipoproteins // Adv. Exp. Med. Biol. 1972. Vol. 26. №. 0. P. 7-24.
- 24. Marcel Y.L., Kiss R.S. Structure-function relationships of apolipoprotein A-I: a flexible protein with dynamic lipid associations // Curr. Opin. Lipidol. 2003. Vol. 14. №. 2. P.151-157.
- 25. Brouillette C.G., Anantharamaiah G.M., Engler J.A., и др. Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review // Biochim. Biophys. Acta. 2001. Vol. 1531. №. 1-2. Р. 4-46.
- 26. Brewer H.B. Jr., Fairwell T., LaRue A., и др. The amino acid sequence of human ApoA-I, an apolipoprotein isolated from high density lipoproteins // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978. Vol. 80. №. 3. Р. 623–630.
- 27. McLachlan A.D. Repeated helical pattern in apolipoprotein-A-I // Nature. 1997. Vol. 267. №. 5610. P. 465-466.
- 28. Pollard R.D., Fulp B., Samuel M.P., и др. The conformation of lipid-free human apolipoprotein A-I in solution // Biochemistry. 2013. Vol. 52. №. 52. Р. 9470-9481.
- 29. Jayaraman S., Abe-Dohmae S., Yokoyama S., и др. Impact of self-association on function of apolipoprotein A-I // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286. №. 41. P. 35610-35623.
- 30. Mizuguchi C., Nakagawa M., Namba N., и др. Mechanisms of aggregation and fibril formation of the amyloidogenic N-terminal fragment of apolipoprotein A-I // J. Biol. Chem. 2019. Vol. 294. №. 36. Р. 13515-13524.

- 31. Ji Y., Jonas A. Properties of an N-terminal proteolytic fragment of apolipoprotein AI in solution and in reconstituted high density lipoproteins //
 J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. №. 19. P.11290–11297.
- 32. Sorci-Thomas M.G., Kearns M.W., Lee J.P. Apolipoprotein A-I domains involved in lecithin-cholesterol acyltransferase activation. Structure–function relationships // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268. №. 28. P. 21403-21409.
- Sorci-Thomas M.G., Bhat S., Thomas M.J. Activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by HDL apoA-I central helices // Clin. Lipidol. 2009. Vol. 4. №. 1. P. 113-124.
- 34. Nagao K., Hata M., Tanaka K., и др. The roles of C-terminal helices of human apolipoprotein A-I in formation of high-density lipoprotein particles // Biochim. Biophys. Acta. 2014. Vol. 1841. №. 1. P. 80-87.
- Davidson W.S., Silva R. A. Apolipoprotein structural organization in high density lipoproteins: belts, bundles, hinges and hairpins // Curr. Opin. Lipidol.
 2005. Vol. 16. №. 3. P. 295-300.
- 36. Gursky O. Apolipoprotein structure and dynamics // Curr. Opin. Lipidol. 2005. Vol. 16. №. 3. P. 287-294.
- 37. Sparks D.L., Lund-Katz S., Phillips M.C. The charge and structural stability of apolipoprotein A-I in discoidal and spherical recombinant high density lipoprotein particles // J. Biol. Chem. − 1992. − Vol. 267. − №. 36. − P. 25839-25847.
- 38. Schaefer E.J., Levy R.I. Composition and metabolism of high-density lipoproteins // Prog. Biochem. Pharmacol. 1979. Vol. 15. P. 200-215.
- 39. Gursky O. Structural stability and functional remodeling of high-density lipoproteins // FEBS Lett. 2015. Vol. 589. 19 Pt A. P. 2627-2639.
- 40. Rothblat G.H., Phillips M.C. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport // Curr. Opin. Lipidol. 2010. Vol. 21. №. 3. P. 229-238.

- 41. Silva R.A., Huang R., Morris J., и др. Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2008. Vol. 105. №. 34. P. 12176-12181.
- 42. Kontush A., Lhomme M., Chapman M.J. Unraveling the complexities of the HDL lipidome // J. Lipid Res. 2013. Vol. 54. №. 11. P. 2950-63.
- 43. Rosenson R.S., Brewer H.B Jr., Chapman M.J., и др. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events // Clin. Chem. 2011. Vol. 57. №. 3. P. 392-410.
- 44. Shah A.S., Tan L., Long J.L., и др. Proteomic diversity of high density lipoproteins: our emerging understanding of its importance in lipid transport and beyond // J. Lipid Res. 2013. Vol. 54. №. 10. P. 2575-2585.
- 45. Singh S.A., Aikawa M. Unbiased and targeted mass spectrometry for the HDL proteome // Curr. Opin. Lipidol. 2017. Vol. 28. №. 1. P. 68-77.
- 46. Chiesa S.T., Charakida M. High-Density Lipoprotein Function and Dysfunction in Health and Disease // Cardiovasc. Drugs Ther. 2019. Vol. 33. № 2. P. 207-219.
- 47. Kim J.Y., Lee E.Y., Park J.K., и др. Patients with Rheumatoid Arthritis Show Altered Lipoprotein Profiles with Dysfunctional High-Density Lipoproteins that Can Exacerbate Inflammatory and Atherogenic Process // PLoS One. 2016. Vol. 11. №. 10:e0164564.
- 48. Ganjali S., Dallinga-Thie G.M., Simental-Mendía L.E., и др. HDL functionality in type 1 diabetes // Atherosclerosis. 2017. Vol. 267. Р. 99-109.
- 49. Ganjali S., Shirmohammadi L., Read M.I., и др. High-density lipoprotein functionality in systemic lupus erythematosus // Semin Arthritis Rheum. 2020. Vol. 50. №. 4. Р. 769-775.
- 50. Charakida M., Besler C., Batuca J.R., и др. Vascular abnormalities, paraoxonase activity, and dysfunctional HDL in primary antiphospholipid syndrome // JAMA. 2009. Vol. 302. №. 11. Р. 1210-1217.

- 51. Barter P.J., Rye K.A. High density lipoproteins and coronary heart disease //
 Atherosclerosis. 1996. Vol. 121. №. 1. P. 1-12.
- 52. Sposito A.C., de Lima-Junior J.C., Moura F.A., и др. Reciprocal Multifaceted Interaction Between HDL (High-Density Lipoprotein) and Myocardial Infarction // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2019. Vol. 39. №. 8. Р. 1550-1564.
- 53. Rothblat G.H., Bamberger M., Phillips M.C. Reverse cholesterol transport // Methods Enzymol. 1986. Vol. 129. P. 628-644.
- 54. Fielding C.J., Fielding P.E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport // J. Lipid Res. 1995. Vol. 36. №. 2. P. 211-228.
- 55. Lee J.Y., Parks J.S. ATP-binding cassette transporter AI and its role in HDL formation // Curr. Opin. Lipidol. 2005. Vol. 16. №. 1. P. 19-25.
- 56. Wang N., Lan D., Chen W., и др. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2004. Vol. 101. №. 26. P. 9774-9779.
- 57. Francone O.L., Gurakar A., Fielding C. Distribution and functions of lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in plasma lipoproteins. Evidence for a functional unit containing these activities together with apolipoproteins AI and D that catalyzes the esterification and transfer of cellderived cholesterol // J. Biol. Chem. − 1989. − Vol. 264. − №. 12. − P. 7066-7072.
- 58. Glomset J.A. The plasma lecithins:cholesterolacyltransferase reaction // J. Lipid Res. 1968. Vol. 9. №. 2. P. 155-167.
- 59. Acton S., Rigotti A., Landschulz K.T., и др. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor // Science. 1996. Vol. 271. №. 5248. P. 518-520.
- 60. Hansson G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease // N. Engl. J. Med. 2005. Vol. 352. №. 16. P. 1685-1695.
- 61. Navab M., Imes S.S., Hama S.Y., и др. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall

- cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein // J. Clin. Invest. 1991. Vol. 88. N_{\odot} . 6. P. 2039-2046.
- 62. Murphy A.J., Woollard K.J., Suhartoyo A., и др. Neutrophil activation is attenuated by high-density lipoprotein and apolipoprotein A-I in in vitro and in vivo models of inflammation // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2011. Vol. 31. №. 6. P. 1333-1341.
- 63. Kitchens R.L., Thompson P.A., Munford R.S., и др. Acute inflammation and infection maintain circulating phospholipid levels and enhance lipopolysaccharide binding to plasma lipoproteins // J. Lipid Res. 2003. Vol. 44. №. 12. P. 2339-2348.
- 64. Chien J.Y., Jerng J.S., Yu C.J., и др. Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis // Crit. Care Med. 2005. Vol. 33. № 8. Р. 1688-1693.
- 65. Tsai M.H., Peng Y.S., Chen Y.C., и др. Low serum concentration of apolipoprotein A-I is an indicator of poor prognosis in cirrhotic patients with severe sepsis // J. Hepatol. 2009. Vol. 50. №. 5. P. 906-915.
- 66. Bashtovyy D., Jones M.K., Anantharamaiah G.M., и др. Sequence conservation of apolipoprotein A-I affords novel insights into HDL structure-function // J. Lipid Res. 2011. Vol. 52. №. 3. Р. 435-450.
- 67. Gu X., Huang Y., Levison B.S., и др. Identification of critical paraoxonase 1 residues involved in high density lipoprotein interaction // J. Biol. Chem. 2016. Vol. 291. №. 4. Р. 1890-1904.
- 68. Panzenbock U., Stocker R. Formation of methionine sulfoxide-containing specific forms of oxidized high-density lipoproteins // Biochim. Biophys. Acta. 2005. Vol. 1703. №. 2. P. 171-181.
- 69. Shao B., Bergt C., Fu X., и др. Tyrosine 192 in apolipoprotein A-I is the major site of nitration and chlorination by myeloperoxidase, but only chlorination markedly impairs ABCA1-dependent cholesterol transport // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280. №. 7. P. 5983-5993.

- 70. Miroshnichenko S., Usynin I., Dudarev A., и др. Apolipoprotein A-I Supports MSCs Survival under Stress Conditions // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21. №. 11:4062.
- 71. Asztalos B.F., Cupples L.A., Demissie S., и др. High-density lipoprotein subpopulation profile and coronary heart disease prevalence in male participants of the Framingham Offspring Study // Arterioscler. Thromb. Vasc. 2004. Vol. 24. №. 11. P. 2181-2187.
- 72. Doggen C.J., Smith N.L., Lemaitre R.N., и др. Serum lipid levels and the risk of venous thrombosis // Arterioscler. Thromb. Vasc. 2004. Vol. 24. №. 10. Р. 1970-1975.
- 73. Nofer J. R., Brodde M. F., Kehrel B. E. High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2010. Vol. 37. №. 7. P. 726-735.
- 74. Nofer J.R., Kehrel B., Fobker M., и др. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport // Atherosclerosis. 2002. Vol. 161. №. 1. P. 1-16.
- 75. Uittenbogaard A., Shaul P.W., Yuhanna I.S., и др. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein- induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. №. 15. P. 11278-11283.
- 76. Grunfeld C., Feingold K.R. HDL and innate immunity: a tale of two apolipoproteins // J. Lipid Res. 2008. Vol. 49. №. 8. P. 1605-1606.
- 77. Norata G.D., Pirillo A., Ammirati E., и др. Emerging role of high density lipoproteins as a player in the immune system // Atherosclerosis. 2012. Vol. 220. №. 1. Р. 11-21.
- 78. Vilahur G. High-density lipoprotein benefits beyond the cardiovascular system: A potential key role for modulating acquired immunity through cholesterol efflux // Cardiovasc. Res. 2017. Vol. 113. №. 13:e51–e53.
- 79. Villarroel F., Bastías A., Casado A., и др. Apolipoprotein A-I, an antimicrobial protein in Oncorhynchus mykiss: evaluation of its expression in

- primary defence barriers and plasma levels in sick and healthy fish // Fish Shellfish. Immunol. -2007. Vol. 23. No. 1. P. 197-209.
- 80. Levine D.M., Parker T.S., Donnelly T.M., и др. In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1993. Vol. 90. №. 24. Р. 12040-12044.
- 81. Grunfeld C., Marshall M., Shisenega J.K., и др. Lipoproteins inhibit macrophage activation by lipoteichoic acid // J. Lipid Res. 1999. Vol. 40. №. 2. Р. 245-252.
- 82. Norata G.D., Marchesi P., Pirillo A., и др. Long pentraxin 3, a key component of innate immunity, is modulated by high-density lipoproteins in endothelial cells // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2008. Vol. 28. №. 5. Р. 925-931.
- 83. Singh I.P., Chopra A.K., Coppenhaver D.H., и др. Lipoproteins account for part of the broad non-specific antiviral activity of human serum // Antiviral Res. 1999. Vol. 42. №. 3. P. 211-218.
- 84. Srinivas R.V., Venkatachalapathi Y.V., Rui Z., и др. Inhibition of virus-induced cell fusion by apolipoprotein A-I and its amphipathic peptide analogs // J. Cell Biochem. 1991. Vol. 45. №. 2. Р. 224-237.
- 85. Simons K., Toomre D. Lipid rafts and signal transduction // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. − 2000. − Vol. 1. − №. 1. − P. 31-39.
- 86. Morgan P.K., Fang L., Lancaster G.I., и др. Hematopoiesis is regulated by cholesterol efflux pathways and lipid rafts: connections with cardiovascular diseases // J. Lipid Res. 2020. Vol. 61. №. 5. P. 667-675.
- 87. Ruysschaert J.M., Lonez C. Role of lipid microdomains in TLR-mediated signalling // Biochim. Biophys. Acta. 2015. Vol. 1848. №. 9. P. 1860-1867.
- 88. Kabouridis P.S., Jury E.C. Lipid rafts and T-lymphocyte function: Implications for autoimmunity // FEBS Lett. 2008. Vol. 582. №. 27. P. 3711–3718.

- 89. Gupta N., DeFranco A.L. Lipid rafts and B cell signaling // Semin Cell Dev. 2007. Vol. 18. №. 5. P. 616-626.
- 90. Cheng A.M., Handa P., Tateya S., и др. Apolipoprotein A-I attenuates palmitate-mediated NF-кВ activation by reducing Toll-like receptor-4 recruitment into lipid rafts // PLoS One. 2012. Vol. 7. №. 3:e33917.
- 91. Whitmore M.M., Iparraguirre A., Kubelka L., и др. Negative regulation of TLR-signaling pathways by activating transcription factor-3 // J. Immunol. 2007. Vol. 179. №. 6. Р. 3622-3630.
- 92. Wilhelm A.J., Zabalawi M., Owen J.S., и др. Apolipoprotein A-I modulates regulatory T cells in autoimmune LDLr-/-, ApoA-I-/- mice // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285. №. 46. Р. 36158-36169.
- 93. Kim K.D., Lim H.Y., Lee H.G., и др. Apolipoprotein A-I induces IL-10 and PGE2 production in human monocytes and inhibits dendritic cell differentiation and maturation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. Vol. 338. №. 2. P. 1126-1136.
- 94. Gardner L.A., Levin M.C. Importance of Apolipoprotein A-I in Multiple Sclerosis // Front Pharmacol. 2015. Vol. 6:278.
- 95. Zhong Y.H., Liu J., Li M., и др. Distinct serum apolipoprotein A-I levels in neuromyelitis optica and acute transverse myelitis // Lipids Health Dis. 2013. 12:150.
- 96. Oliviero F., Sfriso P., Baldo G., и др. Apolipoprotein A-I and cholesterol in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis // Clin. Exp. Rheumatol. 2009. Vol. 27. №. 1. P. 79-83.
- 97. Zhu X., Parks J.S. New roles of HDL in inflammation and hematopoiesis // Annu. Rev. Nutr. 2012. Vol. 32. P. 161-182.
- 98. Feng Y., Schouteden S., Geenens R., и др. Hematopoietic stem/progenitor cell proliferation and differentiation is differentially regulated by high-density and low-density lipoproteins in mice // PLoS One. 2012. Vol. 7. №. 11:e47286.

- 99. Gao M., Zhao D., Schouteden S., и др. Regulation of high-density lipoprotein on hematopoietic stem/progenitor cells in atherosclerosis requires scavenger receptor type BI expression // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2014. Vol. 34. №. 9. P. 1900-1909.
- 100. Yvan-Charvet L., Pagler T., Gautier E.L., и др. ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation // Science. 2010. Vol. 328. №. 5986. Р. 1689-1693.
- 101. Yvan-Charvet L., Ranalletta M., Wang N., и др. Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice // J. Clin. Invest. 2007. Vol. 117. №. 12:3900-3908.
- 102. Ivan-Charvet L., Wang N., Tall A.R. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses //Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2010. Vol. 30. №. 2. P.139-143.
- 103. Plebanek M.P., Bhaumik D., Thaxton C.S. HDL and the golden key to cancer immunity? // Oncoscience. 2018. Vol. 5. №. 5-6. P. 164-166.
- 104. Chandler P.D., Song Y., Lin J., и др. Lipid biomarkers and long-term risk of cancer in the Women's Health Study //Am. J. Clin. Nutr. 2016. Vol. 103. №. 6. P. 1397-1407.
- 105. Yin W., Li Z., Zhang W. Modulation of Bone and Marrow Niche by Cholesterol // Nutrients. 2019. Vol. 11. №. 6:1394.
- 106. Clarke C.H., Yip C., Badgwell D., и др. Proteomic biomarkers apolipoprotein A1, truncated transthyretin and connective tissue activating protein III enhance the sensitivity of CA125 for detecting early stage epithelial ovarian cancer // Gynecol. Oncol. 2011. Vol. 122. №. 3. P. 548-553.
- 107. Chung L., Moore K., Phillips L., и др. Novel serum protein biomarker panel revealed by mass spectrometry and its prognostic value in breast cancer // Breast Cancer Res. 2014. Vol. 16. №. 3:R63.

- 108. Ma X.L., Gao X.H., Gong Z.J., и др. Apolipoprotein A1: a novel serum biomarker for predicting the prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection // Oncotarget. 2016. Vol. 7. №. 43. Р. 70654-70668.
- 109. Guo S., He X., Chen Q., и др. The Effect of Preoperative Apolipoprotein A-I on the Prognosis of Surgical Renal Cell Carcinoma: A Retrospective Large Sample Study // Medicine (Baltimore). 2016. Vol. 95. №. 12:e3147.
- 110. Chong P.K., Lee H., Zhou J., и др. Reduced plasma APOA1 level is associated with gastric tumor growth in MKN45 mouse xenograft model // J. Proteomics. 2010. Vol. 73. №. 8. P. 1632-1640.
- 111. Ganapathy E., Su F., Meriwether D., и др. D-4F, an apoA-I mimetic peptide, inhibits proliferation and tumorigenicity of epithelial ovarian cancer cells by upregulating the antioxidant enzyme MnSOD // Int. J. Cancer. 2012. Vol. 130. №. 5. P. 1071-1081.
- 112. Gao F., Vasquez S.X., Su F., и др. L-5F, an apolipoprotein A-I mimetic, inhibits tumor angiogenesis by suppressing VEGF/basic FGF signaling pathways // Integr. Biol. (Camb). 2011. Vol. 3. №. 4. P. 479-489.
- 113. Peng M., Zhang Q., Cheng Y., и др. Apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F suppresses tumor-associated macrophages and pancreatic cancer progression // Oncotarget. 2017. Vol. 8. №. 59. Р. 99693-99706.
- 114. Su F., Kozak K.R., Imaizumi S., и др. Apolipoprotein A-I (apoA-I) and apoA-I mimetic peptides inhibit tumor development in a mouse model of ovarian cancer // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2010. Vol. 107. №. 46. P. 19997-20002.
- 115. Wang W., Shi X., Yuan Y., и др. Inhibitory effect of apolipoprotein A-I on matrix metalloproteinase-2 expression in vivo and in vitro // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). 2013. Vol. 45. № 3. Р. 194-202.
- 116. Scanu A., Toth J., Edelstein C., и др. Fractionation of human serum high density lipoprotein in urea solutions. Evidence for polypeptide heterogeneity // Biochemistry. 1969. Vol. 8. № 8. Р. 3309-3316.

- 117. McPherson P.A., Young I.S., McKibben B., и др. High density lipoprotein subfractions: isolation, composition, and their duplicitous role in oxidation // J. Lipid Res. 2007. Vol. 48. № 1. Р. 86-95.
- 118. Morrison J.R., Fidge N.H., Grego B. Studies on the formation separation, and characterization of cyanogen bromide fragments of human AI apolipoprotein // Anal. Biochem. 1990. Vol. 186. №. 1. P. 145-152.
- 119. Raynes J.G., McAdam K.P. Purification of serum amyloid A and other high density apolipoproteins by hydrophobic interaction chromatography // Anal. Biochem. 1988. Vol. 173. №. 1. P. 116-124.
- 120. Mallory J.B., Kushner P.J., Protter A.A., и др. Expression and characterization of human apolipoprotein A-I in Chinese hamster ovary cells // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262. №. 9. P. 4241-4247.
- 121. Chiaiese P., Minutolo M., Arciello A., и др. Expression of human apolipoprotein A-I in Nicotiana tabacum // Biotechnol. Lett. 2011. Vol. 33. №. 1. P. 159-165.
- 122. Sorci-Thomas M.G., Parks J.S., Kearns M.W., и др. High level secretion of wild-type and mutant forms of human proapoA-I using baculovirus-mediated Sf-9 cell expression // J. Lipid Res. 1996. Vol. 37. № 3. Р. 673-683.
- 123. Ryan R.O., Forte T.M., Oda M.N. Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A-I // Protein Expr. Purif. 2003. Vol. 27. №. 1. P. 98-103.
- 124. Feng M.Q., Cai Q.S., Song D.X., и др. High yield and secretion of recombinant human apolipoprotein AI in Pichia pastoris // Protein Expr. Purif. 2006. Vol. 46. №. 2. Р. 337-342.
- 125. McMahon K.M., Thaxton C.S. High-density lipoproteins for the systemic delivery of short interfering RNA // Expert Opin Drug Deliv. 2014. Vol. 11. №. 2. P. 231-247.
- 126. Li J., Han M., Li J., и др. Sterically stabilized recombined HDL composed of modified apolipoprotein A-I for efficient targeting toward glioma cells // Drug Deliv. 2020. Vol. 27. №. 1. Р. 530-541.

- 127. Kim S.I., Shin D., Choi T.H., и др. Systemic and Specific Delivery of Small Interfering RNAs to the Liver Mediated by Apolipoprotein A-I // Mol. Ther. 2007. Vol. 15. №. 6. Р. 1145-1152.
- 128. Jomard A., Osto E. High Density Lipoproteins: Metabolism, Function, and Therapeutic Potential // Front. Cardiovasc. Med. 2020. Vol. 7. №. 6:39.
- 129. Javaheri A., Kolansky D.M., Cuchel M. Reconstituted high-density lipoprotein therapies: a cause for optimism // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2014. Vol. 34. № 9 P. 1800-1802.
- 130. Ding Y., Wang W., Feng M., и др. A biomimetic nanovector-mediated targeted cholesterol-conjugated siRNA delivery for tumor gene therapy // Biomaterials. 2012. Vol. 33. №. 34. Р. 8893-8905.
- 131. Shahzad M.M., Mangala L.S., Han H.D., и др. Targeted delivery of small interfering RNA using reconstituted high-density lipoprotein nanoparticles // Neoplasia. 2011. Vol. 13. №. 4. Р. 309-319.
- 132. McConathy W.J., Nair M.P., Paranjape S., и др. Evaluation of synthetic/reconstituted high-density lipoproteins as delivery vehicles for paclitaxel //Anti-cancer drugs. 2008. Vol. 19. №. 2. Р. 183-188.
- 133. Sabnis N., Nair M., Israel M., и др. Enhanced solubility and functionality of valrubicin (AD-32) against cancer cells upon encapsulation into biocompatible nanoparticles // Int. J. Nanomedicine. 2012. Vol. 7. P. 975-983.
- 134. Zhang X.B., Chen B.S. Recombinant High Density Lipoprotein Reconstituted with Apolipoprotein AI Cysteine Mutants as Delivery Vehicles for 10-Hydroxycamptothecin // Cancer Lett. − 2010. − Vol. 298. − №. 1. − P. 26-33.
- 135. Feng M.Q., Cai Q.S., Shi X.L., и др. Recombinant High-Density Lipoprotein Complex as a Targeting System of Nosiheptide to Liver Cells // J. Drug Target. 2008. Vol. 16. №. 6. Р. 502-508.
- 136. Huang C., Jin H., Qian Y., и др. Hybrid Melittin Cytolytic Peptide-Driven Ultrasmall Lipid Nanoparticles Block Melanoma Growth in Vivo // Acs. Nano. 2013. Vol. 7. №. 7. Р. 5791-5800.

- 137. Kratzer I., Wernig K., Panzenboeck U., и др. Apolipoprotein A-I coating of protamine-oligonucleotide nanoparticles increases particle uptake and transcytosis in an in vitro model of the blood-brain barrier // J. Control Release. 2007. Vol. 117. №. 3. P. 301-311.
- 138. Kim S.I., Shin D., Lee H., и др. Targeted delivery of siRNA against hepatitis C virus by apolipoprotein A-I-bound cationic liposomes // J. Hepatol. 2009. Vol. 50. №. 3. Р. 479-488.
- 139. Fioravanti J., Medina-Echeverz J., Ardaiz N., и др. The fusion protein of IFN-α and apolipoprotein A-I crosses the blood-brain barrier by a saturable transport mechanism // J. Immunol. 2012. Vol. 188. №. 8. Р. 3988-3992.
- 140. Ochoa M.C., Fioravanti J., Rodriguez I., и др. Antitumor immunotherapeutic and toxic properties of an HDL-conjugated chimeric IL-15 fusion protein // Cancer Res. 2013. Vol. 73. № 1. Р. 139-149.
- 141. Medina-Echeverz J., Fioravanti J., Díaz-Valdés N., и др. Harnessing high density lipoproteins to block transforming growth factor beta and to inhibit the growth of liver tumor metastases // PLoS One. 2014. Vol. 9. №. 5:e96799.
- 142. Fioravanti J., González I., Medina-Echeverz J., и др. Anchoring interferon alpha to apolipoprotein A-I reduces hematological toxicity while enhancing immunostimulatory properties // Hepatology. 2011. Vol. 53. №. 6. 1864-1873.
- 143. Alvarez-Sola G., Uriarte I., Latasa M.U. и др. Fibroblast growth factor 15/19 (FGF15/19) protects from diet-induced hepatic steatosis: development of an FGF19-based chimeric molecule to promote fatty liver regeneration // Gut. 2017. Vol. 66. №. 10. P. 1818-1828.
- 144. Ardaiz N., Gomar C., Vasquez M., и др. Insulin Fused to Apolipoprotein A-I Reduces Body Weight and Steatosis in DB/DB Mice // Front Pharmacol. 2021. Vol. 11:591293.

- 145. Schrijver D.P., Dreu A. de, Hofstraat S.R.J., и др. Nanoengineering Apolipoprotein A1-Based Immunotherapeutics // Adv. Therap. 2021:2100083.
- 146. Getz G.S., Reardon C.A. The structure/function of apoprotein A-I mimetic peptides: an update // Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. 2014. Vol. 21. №. 2. P. 129-133.
- 147. Navab M., Anantharamaiah G.M., Reddy S.T., и др. Human apolipoprotein AI mimetic peptides for the treatment of atherosclerosis // Curr. Opin. Investig. Drugs. 2003. Vol. 4. №. 9. Р. 1100-1104.
- 148. Cedó L., García-León A., Baila-Rueda L., и др. ApoA-I mimetic administration, but not increased apoA-I-containing HDL, inhibits tumour growth in a mouse model of inherited breast cancer // Sci. Rep. 2016. Vol. 6:36387.
- 149. Chattopadhyay A., Yang X., Mukherjee P., и др. Treating the Intestine with Oral ApoA-I Mimetic Tg6F Reduces Tumor Burden in Mouse Models of Metastatic Lung Cancer // Sci Rep. 2018. Vol. 8. №. 1:9032.
- 150. Handattu S.P., Garber D.W., Monroe C.E., и др. Oral apolipoprotein A-I mimetic peptide improves cognitive function and reduces amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease // Neurobiol. Dis. 2009. Vol. 34. № 3. Р. 525-534.
- 151. Meriwether D., Sulaiman D., Volpe C., и др. Apolipoprotein A-I mimetics mitigate intestinal inflammation in COX2-dependent inflammatory bowel disease model // J. Clin. Invest. 2019. Vol. 129. №. 9. Р. 3670-3685.
- 152. Yao X., Gordon E.M., Barochia A.V., и др. The A's Have It: Developing Apolipoprotein A-I Mimetic Peptides Into a Novel Treatment for Asthma // Chest. 2016. Vol. 150. №. 2. Р. 283-188.
- 153. Панин JI.Е., Поляков JI.М., Розуменко А.А., и др. Транспорт стероидных гормонов липопротеидами сыворотки крови // Вопросы медицинской химии. 1988. №. 5. С. 56-58.

- 154. Поляков Л.М., Часовских М.И., Панин Л.Е. Липопротеины уникальная транспортная система для ксенобиотиков и биологически активных веществ // Успехи современной биологии 1992. Т. 112. №. 4. С. 601-608.
- 155. Панин Л.Е., Тузиков Ф.В., Тузикова Н.А., и др. Взаимодействие комплекса тетрагидрокортизол-аполипопротеин А-I с эукариотической ДНК и одноцепочечными олигонуклеотидами // Молекулярная биология. 2002. Т. 36. №. 1. С. 96-102.
- 156. Панин Л.Е., Тузиков Ф.В., Тузикова Н.А., и др. Особенности взаимодействия комплексов кортизол-аполипопротеин А-I и тетрагидрокортизол-аполипопротеин А-I с эукариотической ДНК // Молекулярная биология. 2006. Т. 40. №. 2. С. 300–309.
- 157. Panin L.E., Kunitsyn V.G., Tuzikov F.V. Effect of glucocorticoids and their complexes with apolipoprotein A-I on secondary structure of eukaryotic DNA // Int. J. Quantum Chem. 2005. Vol. 101. №. 4. P. 450-67.
- 158. Панин JI.Е., Русских Г.С., Поляков JI.М. Обнаружение иммунореактивности к- аполипопротеинам А-I, В и Е в ядрах клеток тканей крыс // Биохимия. 2000. Т. 65. №. 12. С. 1684-1689.
- 159. Панин Л.Е., Поляков Л.М., Кузьменко А.П., и др. Обнаружение апопротеин А-1-иммунореактивности в хроматине ядер гепатоцитов крыс // Биохимия. 1992. Т. 57. №. 6. С. 826-831.
- 160. Sung Y.K., Kim S.W. Recent advances in the development of gene delivery systems // Biomater. Res. 2019. Vol. 23:8.
- 161. Chen Y.H., Keiser M.S., Davidson B.L. Viral Vectors for Gene Transfer // Curr. Protoc. Mouse Biol. 2018. Vol. 8. №. 4:e58.
- 162. Bessis N., GarciaCozar F.J., Boissier M.C. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms // Gene Ther. – 2004. Suppl 1:S10-7.
- 163. Atasheva S., Shayakhmetov D.M. Adenovirus sensing by the immune system // Curr. Opin. Virol. 2016. Vol. 21. P. 109-113.

- 164. Rossi A., Salvetti A. Integration of AAV vectors and insertional mutagenesis // Med. Sci (Paris). 2016. Vol. 32. №. 2. P. 167-174.
- 165. Zu H., Gao D. Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects // AAPS J. 2021. Vol. 23. №. 4:78.
- 166. Alsaggar M., Liu D. Physical methods for gene transfer // Adv. Genet. 2015. Vol. 89. P. 1-24.
- 167. Al-Dosari M.S., Gao X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress // AAPS J. 2009. Vol. 11. №. 4. P. 671-681.
- 168. McCaffrey J., Donnelly R.F., McCarthy H.O. Microneedles: an innovative platform for gene delivery // Drug Deliv. Transl. Res. 2015. Vol. 5. №. 4. P. 424-437.
- 169. Young J.L., Dean D.A. Electroporation-mediated gene delivery // Adv. Genet. 2015. Vol. 89. P. 49-88.
- 170. Tsunoda S., Mazda O., Oda Y., и др. Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. Vol. 336. №. 1. P. 118-127.
- 171. Aravindaram K., Yin S.Y., Yang N.S. Biolistic transfection of tumor tissue samples // Methods Mol. Biol. 2013. Vol. 940. P. 133-143.
- 172. Singh G., Gao X., Song Y.K., и др. Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery // Gene Ther. 2004. Vol. 11. №. 8. Р. 675-682.
- 173. Maitani Y., Igarashi S., Sato M., и др. Cationic liposome (DC-Chol/DOPE=1:2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression // Int. J. Pharm. 2007. Vol. 342. №. 1-2. Р. 33-39.
- 174. Buck J., Mueller D., Mettal U., и др. Improvement of DNA Vector Delivery of DOTAP Lipoplexes by Short-Chain Aminolipids // ACS Omega. 2020. Vol. 5. №. 38. P. 24724-24732.
- 175. Neuberg P., Kichler A. Recent developments in nucleic acid delivery with polyethylenimines // Adv. Genet. 2014. Vol. 88. P. 263–288.

- 176. Pandey A.P., Sawant K.K. Polyethylenimine: A versatile, multifunctional non-viral vector for nucleic acid delivery // Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 2016. Vol. 68. P. 904-918.
- 177. Kadlecova Z., Rajendra Y., Matasci M., и др. DNA delivery with hyperbranched polylysine: a comparative study with linear and dendritic polylysine // J. Contr. Release. 2013. Vol. 169. №. 3. P. 276-288.
- 178. Rodier J.T., Tripathi R., Fink M.K., и др. Linear Polyethylenimine-DNA Nanoconstruct for Corneal Gene Delivery // J. Ocul. Pharmacol. 2019. Vol. 35. №. 1. P. 23-31.
- 179. Bofinger R., Zaw-Thin M., Mitchell N.J., и др. Development of lipopolyplexes for gene delivery: A comparison of the effects of differing modes of targeting peptide display on the structure and transfection activities of lipopolyplexes // J. Pept. Sci. 2018. Vol. 24. №. 12:e3131.
- 180. Sokolova V., Epple M. Inorganic nanoparticles as carriers of nucleic acids into cells // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2008. Vol. 47. №. 8. P. 1382-1395.
- 181. Thapa R.K., Sullivan M.O. Gene delivery by peptide-assisted transport // Curr. Opin. Biomed. Eng. 2018. Vol. 7. P. 71-82.
- 182. Cheraghi R., Nazari M., Alipour M., и др. Stepwise Development of Biomimetic Chimeric Peptides for Gene Delivery // Protein Pept. Lett. 2020. Vol. 27. № 8. Р. 698-710.
- 183. Mangipudi S.S., Canine B.F., Wang Y., и др. Development of a genetically engineered biomimetic vector for targeted gene transfer to breast cancer cells // Mol. Pharm. 2009. Vol. 6. №. 4. Р. 1100-1109.
- 184. Soltani F., Sankian M., Hatefi A., и др. Development of a novel histone H1-based recombinant fusion peptide for targeted non-viral gene delivery // Int. J. Pharm. 2013. Vol. 441. №. 1-2. P. 307-315.
- 185. Balicki D., Beutler E. Histone H2A significantly enhances in vitro DNA transfection // Mol. Med. 1997. Vol. 3. №. 11. P. 782-787.

- 186. Puebla S., Esseghir A., Mortlock A., и др. A recombinant H1 histone-based system for efficient delivery of nucleic acids // J. Biotechnol. 2003. Vol. 105. №. 3. P. 215-226.
- 187. Wagstaff K.M., Glover D.J., Tremethick D.J., и др. Histone-mediated transduction as an efficient means for gene delivery // Mol. Ther. 2007. Vol. 15. №. 4. Р. 721-731.
- 188. Palau J., Climent F., Avilés F.J., и др. Interactions of histones and histone peptides with DNA Thermal denaturation and solubility studies // Biochim. Biophys. Acta. 1977. Vol. 476. №. 2. Р. 108-121.
- 189. Isenberg I. Histones // Annu. Rev. Biochem. 1979. Vol. 48. P. 159-191.
- 190. Baake M., Doenecke D., Albig W. Characterisation of nuclear localisation signals of the four human core histones // J. Cell Biochem. 2001. Vol. 81. №. 2. P. 333-346.
- 191. Zaitsev S., Buchwalow I., Haberland A., и др. Histone H1-mediated transfection: role of calcium in the cellular uptake and intracellular fate of H1-DNA complexes // Acta Histochem. 2002. Vol. 104. №. 1. P. 85-92.
- 192. Haberland A., Knaus T., Zaitsev S.V., и др. Histone H1-mediated transfection: serum inhibition can be overcome by Ca2+ ions // Pharm Res. 2000. Vol. 17. № 2. P. 229-235.
- 193. Böttger M., Zaitsev S.V., Otto A., и др. Acid nuclear extracts as mediators of gene transfer and expression // Biochim. Biophys. Acta. 1998. Vol. 1395. №. 1. Р. 78-87.
- 194. Dai F.H., Chen Y., Ren C.C., и др. Construction of an EGF receptor-mediated histone H1(0)-based gene delivery system // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2003. Vol. 129. №. 8. Р. 456-462.
- 195. Balicki D., Putnam C.D., Scaria P.V., и др. Structure and function correlation in histone H2A peptide-mediated gene transfer // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2002. Vol. 99. №. 11. P. 7467-7471.

- 196. Wang Y., Mangipudi S.S., Canine B.F., и др. A designer biomimetic vector with a chimeric architecture for targeted gene transfer // J. Control. Release. 2009. Vol. 137. №. 1. Р. 46-53.
- 197. Demirhan I., Hasselmayer O., Chandra A., и др. Histone-mediated transfer and expression of the HIV-1 tat gene in Jurkat cells // J. Hum. Virol. 1998. Vol. 1. №. 7. Р. 430-440.
- 198. Hasselmayer O., Demirhan I., Chandra A., и др. Inhibition of histonemediated gene transfer in eucaryotic cells by anti-histone IgG // Anticancer Res. 2001. Vol. 21. №. 4A. Р. 2377-2386.
- 199. Wang C.Y., Zhang Y.J. Fusion Wheat Histone H4 Protein Increases Transfection Efficiency of Non-viral DNA Vector // Chem. Res. Chinese Universities. 2011. Vol. 27. №. 2. P. 264-268.
- 200. Kamiya H., Goto H., Kanda G., и др. Transgene expression efficiency from plasmid DNA delivered as a complex with histone H3 // Int. J. Pharm. 2010. Vol. 392. №. 1-2. P. 249-253.
- 201. Mosammaparast N., Jackson K.R., Guo Y., и др. Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins // J. Cell Biol. 2001. Vol. 153. №. 2. P. 251-262.
- 202. Mosammaparast N., Guo Y., Shabanowitz J., и др. Pathways mediating the nuclear import of histones H3 and H4 in yeast // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. №. 1. P. 862-868.
- 203. Hariton-Gazal E., Rosenbluh J., Graessmann A., и др. Direct translocation of histone molecules across cell membranes // J. Cell Sci. 2003. Vol. 116. Pt 22. P. 4577-4586.
- 204. Fritz J.D., Herweijer H., Zhang G., и др. Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA // Hum. Gene Ther. 1996. Vol. 7. №. 12. Р. 1395-1404.
- 205. Scheule R.K., St George J.A., Bagley R.G., и др. Basis of pulmonary toxicity associated with cationic lipid-mediated gene transfer to the mammalian lung // Hum. Gene Ther. 1997. Vol. 8. №. 6. Р. 689-707.

- 206. Tousignant J.D., Gates A.L., Ingram L.A., и др. Comprehensive analysis of the acute toxicities induced by systemic administration of cationic lipid:plasmid DNA complexes in mice // Hum. Gene Ther. 2000. Vol. 11. №. 18. P. 2493-2513.
- 207. Filion M.C., Phillips N.C. Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells // Biochim. Biophys. Acta. − 1997. Vol. 1329. № 2. P. 345-356.
- 208. Iborra S., Soto M., Carrión J., и др. Vaccination with a plasmid DNA cocktail encoding the nucleosomal histones of Leishmania confers protection against murine cutaneous leishmaniosis // Vaccine. 2004. Vol. 22. №. 29-30. P. 3865-3876.
- 209. Kardani K., Milani A., Shabani H.S., и др. Cell penetrating peptides: the potent multi-cargo intracellular carriers // Expert Opin. Drug Deliv. 2019. Vol. 16. №. 11. Р. 1227-1258.
- 210. Taylor R.E., Zahid M. Cell Penetrating Peptides, Novel Vectors for Gene Therapy // Pharmaceutics. 2020. Vol. 12. №. 3:225.
- 211. Frankel A.D., Pabo C.O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus // Cell. 1988. Vol. 55. №. 6. P. 1189-1193.
- 212. Vivès E., Brodin P., Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. №. 25. P. 16010-16017.
- 213. Nagahara H., Vocero-Akbani A.M., Snyder E.L., и др. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration // Nat. Med. 1998. Vol. 4. №. 12. Р. 1449-1452.
- 214. Milletti F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and cur-rent landscape // Drug Discov. Today − 2012. − Vol. 17. − №. 15-16. − P. 850-860.
- 215. Del Gaizo V., MacKenzie J.A., Payne R.M. Targeting proteins to mitochondria using TAT // Mol. Genet. Metab. 2003. Vol. 80. №. 1-2. P. 170-180.

- 216. Kaplan I.M., Wadia J.S., Dowdy S.F. Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by micropinocytosis // J. Control. Release. – 2005. – Vol. 102. – №. 1. – P. 247-253.
- 217. Li Q., Hao X., Zaidi SSA., и др. Oligohistidine and targeting peptide functionalized TAT-NLS for enhancing cellular uptake and promoting angiogenesis in vivo // J. Nanobiotechnology. 2018. Vol. 16. №. 1:29.
- 218. Zhou H.H., Zhang L., Zhang H.X., и др. Chimeric Peptide Tat-HA-NR2B9c Improves Regenerative Repair after Transient Global Ischemia // Front. Neurol. 2017. Vol. 8:509.
- 219. Gupta B., Levchenko T.S., Torchilin V.P. TAT peptide-modified liposomes provide enhanced gene delivery to intracranial human brain tumor xenografts in nude mice // Oncol. Res. 2007. Vol. 16. №. 8. P. 351-359.
- 220. Ho A., Schwarze S.R., Mermelstein S.J., и др. Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo // Cancer Res. 2001. Vol. 61. № 2. Р. 474-477.
- 221. Madani F., Lindberg S., Langel U., и др. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides // J. Biophys. 2011;2011:414729.
- 222. Choi Y.S., David A.E. Cell penetrating peptides and the mechanisms for intracellular entry // Curr. Pharm. Biotechnol. 2014. Vol. 15. №. 3. P. 192-199.
- 223. Fonseca S.B., Pereira M.P., Kelley S.O. Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2009. Vol. 61. №. 11. P. 953-964.
- 224. Matsuzaki K., Yoneyama S., Murase O., и др. Transbilayer transport of ions and lipids coupled with mastoparan X translocation // Biochemistry. 1996. Vol. 35. №. 25. Р. 8450-8456.
- 225. Pouny Y., Rapaport D., Mor A., и др. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes // Biochemistry. 1992. Vol. 31. №. 49. Р. 12416-12423.

- 226. Lee M.T., Hung W.C., Chen F.Y., и др. Many-body effect of antimicrobial peptides: on the correlation between lipid's spontaneous curvature and pore formation // Biophys. J. 2005. Vol. 89. №. 6. Р. 4006-4016.
- 227. Fittipaldi A., Ferrari A., Zoppé M., и др. Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. №. 36. Р. 34141-34149.
- 228. Wadia J.S., Stan R.V., Dowdy S.F. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft micropinocytosis // Nat. Med. 2004. Vol. 10. №. 3. P. 310-315.
- 229. Saar K., Lindgren M., Hansen M. и др. Cell-penetrating peptides: a comparative membrane toxicity study // Anal. Biochem. 2005. Vol. 345. №1. Р. 55-65.
- 230. Кетлинский, С.А. Цитокины / Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. СПб: Фолиант, 2008. 552 с.
- 231. Wetzel R. Assignment of the disulphide bonds of leukocyte interferon // Nature. 1981. Vol. 289. №. 5798. P. 606-607.
- 232. Morehead H., Johnston P.D., Wetzel R. Roles of the 29-138 disulfide bond of subtype A of human alpha interferon in its antiviral activity and conformational stability // Biochemistry. − 1984. − Vol. 23. − №. 11. − P. 2500-2507.
- 233. Bekisz J., Baron S., Balinsky C., и др. Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon // Pharmaceuticals (Basel). 2010. Vol. 3. №. 4. P. 994-1015.
- 234. Scagnolari C., Antonelli G. Antiviral activity of the interferon alpha family: biological and pharmacological aspects of the treatment of chronic hepatitis C // Expert. Opin. Biol. Ther. − 2013. − Vol. 13. − №. 5. − P. 693-711.
- 235. Bekisz J., Sato Y., Johnson C., и др. Immunomodulatory effects of interferons in malignancies // J. Interferon Cytokine Res. 2013. Vol. 33. №. 4. Р. 154-161.

- 236. Stanifer M.L., Pervolaraki K., Boulant S. Differential Regulation of Type I and Type III Interferon Signaling // Int. J. Mol. Sci. 2019. Vol. 20. №. 6:1445.
- 237. Серебряная Н.Б., Кетлинский С.А. Использование препаратов интерферона альфа в медицине: настоящее и будущее // Медицинский академический журнал. 2002. Т. 2. № 4. С. 101-102.
- 238. Barnes E., Webster G., Jacobs R., и др. Long-term efficacy of treatment of chronic hepatitis C with alpha interferon or alpha interferon and ribavirin // J. Hepatol. 1999. Vol. 31. (Suppl 1) P. 244-249.
- 239. Tarhini A.A., Gogas H., Kirkwood, J.M. IFN-α in the Treatment of Melanoma // J. Immunol. 2012. Vol. 189. №. 8. P. 3789-3793.
- 240. Krown S.E., Lee J.Y., Lin L., и др. Interferon-alpha2b with protease inhibitor-based antiretroviral therapy in patients with AIDS-associated Kaposi sarcoma: an AIDS malignancy consortium phase I trial // J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 2006. Vol. 41. №. 2. P. 149-153.
- 241. Ishitsuka K., Tsukasaki K., Tamura K. Interferon alfa and antiretroviral agents: a treatment option for adult T-cell leukemia/lymphoma // Drugs Today (Barc). 2011. Vol. 47. №. 8. P. 615-623.
- 242. Park K.C., Ahn P.S., Lee Y.S., и др. Treatment of angioblastoma with recombinant interferon-alpha 2 // Pediatr. Dermatol. 1995. Vol. 12. №. 2. Р. 184-186.
- 243. Wills R.J. Clinical pharmacokinetics of interferons // Clin. Pharmacokinet. 1990. Vol. 19. №. 5. P. 390-399.
- 244. Sleijfer S., Bannink M., Van Gool A.R., и др. Side effects of interferon-alpha therapy // Pharm. World Sci. 2005. Vol. 27. №. 6. Р. 423-431.
- 245. Fritz-French C., Tyor W. Interferon-alpha (IFNalpha) neurotoxicity // Cytokine Growth Factor Rev. 2012. Vol. 23. №. 1-2. P. 7-14.
- 246. Nicola N.A., Metcalf D., Matsumoto M., и др. Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells.

- Identification as granulocyte colony-stimulating factor // Journal of Biological Chemistry. − 1983. − Vol. 258. − №. 14. − P. 9017-9023.
- 247. Nagata S., Tsuchiya M., Asano S., и др. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor // Nature. 1986. Vol. 319. №. 6052. P. 415-418.
- 248. Kubota N., Orita T., Hattori K., и др. Structural characterization of natural and recombinant human granulocyte colony-stimulating factors // J. Biochem. 1990. Vol. 107. №. 3. Р. 486-492.
- 249. Oh-eda M., Hasegawa M., Hattori K., и др. O-linked sugar chain of human granulocyte colony-stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265. №. 20. P. 11432-11435.
- 250. Ono M., Oh-eda M., Kamachi S., и др. Structure of G-CSF: significance of the sugar chain // J. Nutr. Sci.Vitaminol. (Tokyo). 1992. Spec No:337-40.
- 251. Carter C.R., Whitmore K.M., Thorpe R. The significance of carbohydrates on G-CSF: differential sensitivity of G-CSFs to human neutrophil elastase degradation // J. Leukoc. Biol. 2004. Vol. 75. №. 3. P. 515-522.
- 252. Demetri G.D., Griffin J.D. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor // Blood. − 1991. − Vol. 78. − №. 11. − P. 2791-2808.
- 253. Prakash A., Medhi B., Chopra K. Granulocyte colony stimulating factor (GCSF) improves memory and neurobehavior in an amyloid-β induced experimental model of Alzheimer's disease // Pharmacol. Biochem. Behav. 2013. Vol. 110. P. 46-57.
- 254. Lu C-Z., Xiao B-G. G-CSF and neuroprotection: a therapeutic perspective in cerebral ischaemia // Biochem. Soc. Trans. 2006. Vol. 34 (Pt 6). P. 1327-1333.
- 255. Takano H., Qin Y., Hasegawa H., и др. Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction // J. Mol. Med. (Berl). 2006. Vol. 84. №. 3. Р. 185-193.

- 256. Smith M.A., Smith J.G. Clinical experience with the use of rhG-CSF in secondary autoimmune neutropenia // Clin. Lab. Haematol. 2002. Vol. 24. №. 2. P. 93-97.
- 257. Kuwabara T., Kobayashi S., Sugiyama Y. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor // Drug Metab. Rev. 1996. Vol. 28. №. 4. P. 625-658.
- 258. Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells // Nature. − 1989. − Vol. 339. − №. 6219. − P. 27-30.
- 259. Wong G.G., Witek J.S., Temple P.A., и др. Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins // Science. 1985. Vol. 228. №. 4701. P. 810-815.
- 260. Kaushansky K., Lopez J.A., Brown C.B. Role of carbohydrate modification in the production and secretion of human granulocyte macrophage colony-stimulating factor in genetically engineered and normal mesenchymal cells // Biochemistry. − 1992. − Vol. 31. − №. 6. − P. 1881-1886.
- 261. Das K.M., Banerjee S., Shekhar N., и др. Cloning, soluble expression and purification of high yield recombinant hGMCSF in Escherichia coli // Int. J. Mol. Sci. 2011. Vol. 12. №. 3. Р. 2064-2076.
- 262. Damiani G., McCormick T.S., Leal L.O., и др. Recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor expressed in yeast (sargramostim): A potential ally to combat serious infections // Clin. Immunol. 2020. Vol. 210:108292.
- 263. Cebon J., Nicola N., Ward M., и др. Granulocyte macrophage colony stimulating factor from human lymphocytes. The effect of glycosylation on receptor binding and biological activity // J. Biol. Chem. − 1990. − Vol. 265. − №. 8 − P. 4483-4491.
- 264. Moonen P., Mermod J.J., Ernst J.F., и др. Increased biological activity of deglycosylated recombinant human granulocyte/macrophage colony-

- stimulating factor produced by yeast or animal cells // Proc. Natl Acad. Sci. USA. − 1987. − Vol. 84. − №. 13. − P. 4428-4431.
- 265. Okamoto M., Nakai M., Nakayama C., и др. Purification and characterization of three forms of differently glycosylated recombinant human granulocyte—macrophage colony-stimulating factor // Arch. Biochem. Biophys. 1991. Vol. 286. №. 2. P. 562-568.
- 266. Donahue R.E., Wang E.A., Kaufman R.J., и др. Effects of N-linked carbohydrates on the in vivo properties of human GMCSF // Cold Spring Harbor Sym. Quant. 1986. Vol. 51. Pt 1. P. 685-692.
- 267. Miyajima A., Mui A.L., Ogorochi T., и др. Receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5 //Blood. 1993. Vol. 82. №. 7. Р. 1960-1974.
- 268. Shanafelt A.B., Johnson K.E., Kastelein R.A. Identification of critical amino acid residues in human and mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and their involvement in species specificity // J. Biol. Chem. − 1991. − Vol. 266. − №. 21 − P. 13804-13810.
- 269. Lifton R., Bennet J.M. Clinical use of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in neutropenia associated with malignancy // Hematol. Oncol. Clin. North. Am. − 1996. − Vol. 10. − №. 4. − P. 825-839.
- 270. Schäbitz W.R., Krüger C., Pitzer C., и др. A neuroprotective function for the hematopoietic protein granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) // J. Cereb. Blood Flow Metab. 2008. Vol. 28. №. 1. Р. 29-43.
- 271. Yan W.L., Shen K.Y., Tien C.Y., и др. Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy // Immunotherapy. 2017. Vol. 9. №. 4. Р. 347-360.
- 272. Bhattacharya P., Thiruppathi M., Elshabrawy H.A., и др. GM-CSF: An Immune Modulatory Cytokine that can Suppress Autoimmunity // Cytokine. 2015. Vol. 75. №. 2. P. 261-271.

- 273. Ganesh B.B., Cheatem D.M., Sheng J.R., и др. GM-CSF-induced CD11c1CD8a—dendritic cells facilitate Foxp31 and IL-101 regulatory T cell expansion resulting in suppression of autoimmune thyroiditis // Int. Immunol. 2009. Vol. 21. №. 3. P. 269-282.
- 274. Shultz S.R., Tan X.L., Wright D.K., и др. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is neuroprotective in experimental traumatic brain injury // J. Neurotrauma. 2014. Vol. 31. №. 10. Р. 976-983.
- 275. Brem H., Howell R., Criscitelli T., и др. Practical Application of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) in Patients with Wounds // Surg. Technol. Int. 2018. Vol. 32. P. 61-66.
- 276. Stern A.C., Jones T.C. The side-effect profile of GM-CSF // Infection. 1992. Vol. 20. Suppl 2:S124-127.
- 277. Yu T.W., Chueh H.Y., Tsai C.C., и др. Novel GM-CSF-based vaccines: One small step in GM-CSF gene optimization, one giant leap for human vaccines // Hum. Vaccin. Immunother. 2016. Vol. 12. №. 12. Р. 3020-3028.
- 278. Conti L., Gessani S. GM-CSF in the generation of dendritic cells from human blood monocyte precursors: recent advances // Immunobiology. 2008. Vol. 213. №. 9-10. P. 859-870.
- 279. Suzuki H., Katayama N., Ikuta Y., и др. Activities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on monocytes // Am. J. Hematol. 2004. Vol. 75. №. 4. Р. 179-189.
- 280. Antignani A., Youle R.J. The cytokine, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), can deliver Bcl-XL as an extracellular fusion protein to protect cells from apoptosis and retain differentiation induction // J. Biol. Chem. − 2007. − Vol. 282. − №. 15. − P. 11246-11254.
- 281. Curtis B.M., Williams D.E., Broxmeyer H.E., и др. Enhanced hematopoietic activity of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-interleukin 3 fusion protein // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. − 1991. Vol. 88. №. 13. P. 5809-5813.

- 282. Williams P., Galipeau J. GM-CSF-based fusion cytokines as ligands for immune modulation // J. Immunol. 2011. Vol. 186. №. 10. P. 5527-5532.
- 283. Diao L., Meibohm B. Pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides // Clin. Pharmacokinet. 2013. Vol. 52. №. 10. P. 855-868.
- 284. Holst J.J. The physiology of glucagon-like peptide 1 // Physiol. Rev. 2007. Vol. 87. №. 4. P. 1409-1439.
- 285. Kontermann R.E. Half-life extended biotherapeutics // Expert Opin. Biol. Ther. 2016. Vol. 16. №. 7. P. 903-915.
- 286. Zaman R., Islam R.A., Ibnat N., и др. Current strategies in extending half-lives of therapeutic proteins // J. Control. Release. 2019. Vol. 301. Р. 176-189.
- 287. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018 // Nat. Biotechnol. 2018. Vol. 36. №. 12. P. 1136-1145.
- 288. Eppstein D.A., Marsh Y.V., van der Pas M., и др. Biological activity of liposome-encapsulated murine interferon gamma is mediated by a cell membrane receptor // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1985. Vol. 82. №. 11. P. 3688-3692.
- 289. Qiu J., Wei X.H., Geng F., и др. Multivesicular liposome formulations for the sustained delivery of interferon alpha-2b // Acta Pharmacol. Sin. 2005. Vol. 26. №. 11. Р. 1395-1401.
- 290. Nii A., Fan D., Fidler I.J. Cytotoxic potential of liposomes containing tumor necrosis factor-alpha against sensitive and resistant target cells // J. Immunother. 1991. Vol. 10. №. 1. P. 13-19.
- 291. Anderson P.M., Hanson D.C., Hasz D.E., и др. Cytokines in liposomes: preliminary studies with IL-1, IL-2, IL-6, GM-CSF and interferon-gamma // Cytokine. 1994. Vol. 6. №. 1. P. 92-101.
- 292. Nishikawa K., Arai H., Inoue K. Scavenger receptor-mediated uptake and metabolism of lipid vesicles containing acidic phospholipids by mouse

- peritoneal macrophages // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265. №. 9. P. 5226-5231.
- 293. Chonn A., Cullis P.R., Devine D.V. The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes // J. Immunol. 1991. Vol. 146. №. 12. P. 4234-4241.
- 294. Marjan J., Xie Z., Devine D.V. Liposome-induced activation of the classical complement pathway does not require immunoglobulin // Biochim. Biophys. Acta. − 1994. − Vol. 1192. − №. 1. − P. 35-44.
- 295. Lagarce F., Garcion E., Faisant N, и др. Development and characterization of interleukin-18-loaded biodegradable microspheres // Int. J. Pharm. 2006. Vol. 314. №. 2. P. 179-188.
- 296. Saez V., Ramón J., Peniche C., и др. Microencapsulation of alpha interferons in biodegradable microspheres // J. Interferon Cytokine Res. 2012. Vol. 32. №. 7. Р. 299-311.
- 297. Thomas T.T., Kohane D.S., Wang A., и др. Microparticulate formulations for the controlled release of interleukin-2 // J. Pharm. Sci. 2004. Vol. 93. №. 5. Р. 1100-1109.
- 298. Mandal B., Kempf M., Merkle H.P., и др. Immobilisation of GM-CSF onto particulate vaccine carrier systems // Int. J. Pharm. 2004. Vol. 269. №. 1. P. 259-265.
- 299. Yang J., Cleland J.L. Factors affecting the in vitro release of recombinant human interferon-gamma (rhIFN-gamma) from PLGA microspheres // J. Pharm. Sci. 1997. Vol. 86. №. 8. P. 908-914.
- 300. Halpern W., Riccobene T.A., Agostini H., и др. Albugranin, a recombinant human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) genetically fused to recombinant human albumin induces prolonged myelopoietic effects in mice and monkeys // Pharm. Res. 2002. Vol. 19. №. 11. P. 1720-1729.
- 301. Zhao S., Zhang Y., Tian H., и др. Extending the serum half-life of G-CSF via fusion with the domain III of human serum albumin // Biomed. Res. Int. 2013:107238.

- 302. Osborn B.L., Olsen H.S., Nardelli B., и др. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2002. Vol. 303. № 2. P. 540-548.
- 303. Heinzelman P., Priebe M.C. Engineering superactive granulocyte macrophage colony-stimulating factor transferrin fusion proteins as orally-delivered candidate agents for treating neurodegenerative disease // Biotechnol. Prog. − 2015. − Vol. 31. − № 3. − P. 668-677.
- 304. Bai Y., Ann D.K., Shen W.C. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor-transferrin fusion protein as an oral myelopoietic agent // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2005. Vol. 102. №. 20. P. 7292-7296.
- 305. Cox G.N., Smith D.J., Carlson S.J., и др. Enhanced circulating half-life and hematopoietic properties of a human granulocyte colony-stimulating factor/immunoglobulin fusion protein // Exp. Hematol. 2004. Vol. 32. № 5. Р. 441-449.
- 306. Rath T., Baker K., Dumont J.A., и др. Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics // Crit. Rev. Biotechnol. 2015. Vol. 35. №. 2. P. 235-254.
- 307. Bain V.G., Kaita K.D., Yoshida E.M., и др. A phase 2 study to evaluate the antiviral activity, safety, and pharmacokinetics of recombinant human albumin-interferon alfa fusion protein in genotype 1 chronic hepatitis C patients // J. Hepatol. 2006. Vol. 44. №. 4. P. 671-678.
- 308. Chaudhury C., Brooks C.L., Carter D.C., и др. Albumin binding to FcRn: distinct from the FcRn-IgG interaction // Biochemistry. 2006. Vol. 45. №. 15. Р. 4983-4990.
- 309. Fusion polypeptides comprising human serum albumin, nucleic acid encoding same, and recombinant expression thereof: пат. US 5876969 A: Reinhard F., Fournier A., Guitton J.D., Jung G., Yeh P. опубл. 02.03.1999.

- 310. Chen X., Zaro J.L., Shen W.C. Fusion protein linkers: property, design and functionality // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2013. Vol. 65. №. 10. P. 1357-1369.
- 311. Naseem M.U., Ahmed N., Khan M.A., и др. Production of potent long-lasting consensus interferon using albumin fusion technology in Pichia pastoris expression system // Protein Expr. Purif. 2020. Vol.166:105509.
- 312. Chang S.H., Gong X., Yang Z.Y., и др. Expression in Pichia pastoris and properties of human serum albumin-interferon alpha2b chimera // Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2006. Vol. 22. №. 2. Р. 173-179.
- 313. Schellenberger V., Wang C.W., Geething N.C. и др. A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner // Nat. Biotechnol. 2009. Vol. 27. №. 12. Р. 1186-1190.
- 314. Yuen K.C., Conway G.S., Popovic V. и др. A long-acting human growth hormone with delayed clearance (VRS-317): results of a double-blind, placebo-controlled, single ascending dose study in growth hormone-deficient adults // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2013. Vol. 98. №. 6. Р. 2595-25603.
- 315. MacEwan S.R., Chilkoti A. Applications of elastin-like polypeptides in drug delivery // J. Control. Release. 2014. Vol. 190. P. 314-330.
- 316. Conrad U., Plagmann I., Malchow S., и др. ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock // Plant Biotechnol. J. 2011. Vol. 9. №. 1. P. 22-31.
- 317. Schlapschy M., Binder U., Börger C., и др. PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins // Protein Eng. Des. Sel. 2013. Vol. 26. № 8. Р. 489-501.
- 318. Harari D., Kuhn N., Abramovich R., и др. Enhanced in vivo efficacy of a type I interferon superagonist with extended plasma half-life in a mouse model of multiple sclerosis // J. Biol. Chem. 2014. Vol. 289. №. 42. Р. 29014-29029.

- 319. Schlapschy M., Theobald I., Mack H., и др. Fusion of a recombinant antibody fragment with a homo-amino-acid polymer: effects on biophysical properties and prolonged plasma half-life // Protein Eng. Des. Sel. 2007. Vol. 20. №. 6. Р. 273-284.
- 320. Li H., d'Anjou M. Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins // Curr. Opin. Biotechnol. 2009. Vol. 20. №. 6. P. 678-684.
- 321. Sola R.J., Griebenow K. Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy // Bio. Drugs − 2010. − Vol. 24. №. 1. − P. 9-21.
- 322. Ceaglio N., Etcheverrigaray M., Conradt H.S., и др. Highly glycosylated human alpha interferon: an insight into a new therapeutic candidate // J. Biotechnol. 2010. Vol. 146. №. 1-2. Р. 74-83.
- 323. Zündorf I., Dingermann T. PEGylation--a well-proven strategy for the improvement of recombinant drugs // Pharmazie. 2014. Vol. 69. №. 5. P. 323-326.
- 324. Ginn C., Khalili H., Lever R., и др. PEGylation and its impact on the design of new protein-based medicines // Future Med. Chem. 2014. Vol. 6. №. 16. Р. 1829-1846.
- 325. Maullu C., Raimondo D., Caboi F., и др. Site-directed enzymatic PEGylation of the human granulocyte colony-stimulating factor // FEBS J. 2009. Vol. 276. №. 22. P. 6741-6750.
- 326. Perry C.M., Jarvis B. Peginterferon-alpha-2a (40 kD): a review of its use in the management of chronic hepatitis C // Drugs − 2001. − Vol. 61. − №. 15. − P. 2263-2288.
- 327. Glue P., Fang J.W., Rouzier-Panis R., и др. Pegylated interferon-alpha2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group // Clin. Pharmacol. Ther. 2000. Vol. 68. №. 5. P. 556-567.

- 328. Molineux G. Pegfilgrastim: using pegylation technology to improve neutropenia support in cancer patients // Anticancer Drugs. 2003. Vol. 14 №. 4. P. 259-264.
- 329. Pasut G., Veronese F.M. Second-Generation Pharmaceutical Proteins-EUFEPS Workshop on Optimizing Biotech Medicines // IDrugs. – 2007. – Vol. 10. – №. 3. – P. 162-164.
- 330. Pannuzzo M., Esposito S., Wu L.P., и др. Overcoming Nanoparticle-Mediated Complement Activation by Surface PEG Pairing // Nano Lett. 2020. Vol. 20. №. 6. Р. 4312-4321.
- 331. Kozma G.T., Shimizu T., Ishida T., и др. Anti-PEG antibodies: Properties, formation, testing and role in adverse immune reactions to PEGylated nanobiopharmaceuticals // Adv. Drug Deliv. Rev. 2020. –154-155:163-175.
- 332. Grace M.J., Lee S., Bradshaw S., и др. Site of pegylation and polyethylene glycol molecule size attenuate interferon-alpha antiviral and antiproliferative activities through the JAK/STAT signaling pathway // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280. № 8. P. 6327-6336.
- 333. Almond A. Hyaluronan // Cell Mol. Life Sci. 2007. Vol. 64. №. 13. P. 1591-1596.
- 334. Yang J.A., Park K., Jung H., и др. Target specific hyaluronic acid-interferon alpha conjugate for the treatment of hepatitis C virus infection // Biomaterials 2011. Vol. 32. №. 33. Р. 8722-8729.
- 335. Gregoriadis G., Jain S., Papaioannou I., и др. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: a role for polysialic acids // Int. J. Pharm. 2005. Vol. 300. №. 1-2. Р. 125-130.
- 336. Jain S., Hreczuk-Hirst D.H., McCormack B., и др. Polysialylated insulin: synthesis, characterization and biological activity in vivo // Biochim. Biophys. Acta. 2003. Vol. 1622. №. 1. P. 42-9.
- 337. Xie D., Yao C., Wang L., и др. An albumin-conjugated peptide exhibits potent anti-HIV activity and long in vivo half-life // Antimicrob. Agents Chemother. 2010. Vol. 54. №. 1. P. 191-196.

- 338. Hollander P.A. Insulin detemir for the treament of obese patients with type 2 diabetes // Diabetes Metab. Syndr. Obes. 2012. Vol. 5. P. 11-19.
- 339. Schmidt S.R. Fusion-proteins as biopharmaceuticals--applications and challenges // Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 2009. Vol. 12. №. 2. P. 284-295.
- 340. Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003. Vol. 60. №. 5. P. 523-533.
- 341. Tsien R.Y. The green fluorescent protein // Annu. Rev. Biochem. 1998. Vol. 67. P. 509-544.
- 342. Pedelacq J-D., Cabantous S., Tran T., и др. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein // Nat. Biotechnol. 2006. Vol. 24. №. 1. P. 79-88.
- 343. Oliveira C., Carvalho V., Domingues L., и др. Recombinant CBM-fusion technology Applications overview // Biotechnol. Adv. 2015. Vol. 33. №. 3-4. Р. 358-369.
- 344. Amaro F., Turkewitz A.P., Martín-González A., и др. Functional GFP-metallothionein fusion protein from Tetrahymena thermophila: a potential whole-cell biosensor for monitoring heavy metal pollution and a cell model to study metallothionein overproduction effects // Biometals. 2014. Vol. 27. №. 1. Р. 195-205.
- 345. Peppel K., Crawford D., Beutler B. A tumor necrosis factor (TNF) receptor-IgG heavy chain chimeric protein as a bivalent antagonist of TNF activity // J. Exp. Med. 1991. Vol. 174. №. 6. P. 1483-1489.
- 346. Ding Y., Peng Y., Deng L., и др. The effects of fusion structure on the expression and bioactivity of human brain natriuretic peptide (BNP) albumin fusion proteins // Curr. Pharm. Biotechnol. 2014. Vol. 15. №. 9. Р. 856-863.
- 347. Zhao H.L., Xue C., Wang Y., и др. Circumventing the heterogeneity and instability of human serum albumin-interferon-alpha2b fusion protein by

- altering its orientation // J. Biotechnol. 2007. Vol. 131. \mathbb{N}_{2} . 3. P. 245-252.
- 348. Zhu R.Y., Xin X., Dai H.Y., и др. Expression and purification of recombinant human serum albumin fusion protein with VEGF165b in Pichia pastoris // Protein Expr. Purif. 2012. Vol. 85. №. 1. P. 32-37.
- 349. Wriggers W.S., Chakravarty P.A., Jennings A. Control of protein functional dynamics by peptide Linkers // Biopolymers 2005. Vol. 80. №. 6. P. 736-746.
- 350. Sabourin M., Tuzon C.T., Fisher T.S., и др. A flexible protein linker improves the function of epitope-tagged proteins in Saccharomyces cerevisiae // Yeast. 2007. Vol. 24. №. 1. P. 39-45.
- 351. Maeda Y., Ueda H., Kazami J., и др. Engineering of functional chimeric protein G-Vargula luciferase // Anal. Biochem. 1997. Vol. 249. №. 2. Р. 147-152.
- 352. Arai R., Ueda H., Kitayama A., и др. Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein // Protein Eng. 2001. Vol. 14. №. 8. P. 529-532.
- 353. Amet N., Lee H.F., Shen W.C. Insertion of the designed helical linker led to increased expression of tf-based fusion proteins // Pharm. Res. 2009. Vol. 26. №. 3. P. 523-528.
- 354. McCormick A.L., Thomas M.S., Heath A.W. Immunization with an interferon-gamma-gp120 fusion protein induces enhanced immune responses to human immunodeficiency virus gp120 // J. Infect. Dis. 2001. Vol. 184. №. 11. P. 1423-1430.
- 355. Amet N., Wang W., Shen W.C. Human growth hormone-transferrin fusion protein for oral delivery in hypophysectomized rats // J. Control. Release. 2010. Vol. 141. №. 2. P. 177-182.
- 356. Chen X., Bai Y., Zaro J.L., и др. Design of an in vivo cleavable disulfide linker in recombinant fusion proteins // Biotechniques. 2010. Vol. 49. №. 1. Р. 513-518.

- 357. Z H.L., Xue C., Du J.L., и др. Balancing the pharmacokinetics and pharmacodynamics of interferon-α2b and human serum albumin fusion protein by proteolytic or reductive cleavage increases its in vivo therapeutic efficacy // Mol. Pharm. 2012. Vol. 9. №. 3. P. 664-670.
- 358. Aroul-Selvam R., Hubbard T., Sasidharan R. Domain insertions in protein structures // J. Mol. Biol. 2004. Vol. 338. №. 4. P. 633-641.
- 359. Kanwar M., Wright R.C., Date A., и др. Protein switch engineering by domain insertion // Methods Enzymol. 2013. Vol. 523. P. 369-388.
- 360. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. Vol. 72. №. 2. P. 211-222.
- 361. Pérez-Pérez J., Martínez-Caja C., Barbero J.L., и др. DnaK/DnaJ supplementation improves the periplasmic production of human granulocyte-colony stimulating factor in Escherichia coli // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. Vol. 210. №. 2. P. 524-529.
- 362. Babaeipour V., Khanchezar S., Mofid M.R., и др. Efficient process development of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rh-GCSF) production in Escherichia coli // Iran Biomed. J. 2015. Vol. 19. №. 2. Р. 102-110.
- 363. Welte K., Gabrilove J., Bronchud M.H., и др. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years // Blood. 1996. Vol. 88. №. 6. Р. 1907-1929.
- 364. Hovgaard D.J. Molgramostim (rhGM-CSF) -a hematopoietic growth factor for the treatment of neutropenia // Ugeskr Laeger. 1994. Vol. 156. №. 4. P. 494-500.
- 365. Dorr R.T. Clinical properties of yeast-derived versus Escherichia coli-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // Clin. Ther. − 1993. − Vol. 15. − №. 1. − P. 19-29.

- 366. Lundell D., Lunn C., Greenberg R., и др. Exploiting the cell membrane for the production of heterologous proteins in Escherichia coli // Biotechnol. Appl. Biochem. 1990. Vol. 12. №. 5. Р. 567-578.
- 367. Singh S.M., Panda A.K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins // J. Biosci. Bioeng. 2005. Vol. 99. №. 4. P. 303-310.
- 368. Tarnowski S.J., Roy S.K., Liptak R.A., и др. Large-scale purification of recombinant human leukocyte interferons // Methods Enzymol. 1986. Vol. 119. №. 4. Р. 153-65.
- 369. Rossmann C., Sharp N., Allen G., и др. Expression and purification of recombinant, glycosylated human interferon alpha 2b in murine myeloma NSo cells // Protein Expr. Purif. 1996. Vol. 7. №. 4. P. 335-342.
- 370. Loignon M., Perret S., Kelly J., и др. Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFNalpha2b in HEK293 cells // BMC Biotechnol. 2008. Vol. 8:65.
- 371. Ono M. Physicochemical and biochemical characteristics of glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim) // Eur. J. Cancer. 1994. –30A(3):7-11.
- 372. Wadhwa M., Bird C., Fagerberg J., и др. Production of neutralizing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) antibodies in carcinoma patients following GM-CSF combination therapy // Clin. Exp. Immunol. 1996. Vol. 104. № 2. P. 351-358.
- 373. Weinacker D., Rabert C., Zepeda A.B., и др. Applications of recombinant Pichia pastoris in the healthcare industry // Braz. J. Microbiol. 2014. Vol. 44. № 4. Р. 1043-1048.
- 374. Karbalaei M., Rezaee S.A., Farsiani H. Pichia pastoris: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins // J. Cell Physiol. 2020. Vol. 235. №. 9. P. 5867-5881.
- 375. Yang Z., Zhang Z. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in Pichia pastoris: A review // Biotechnol. Adv. 2018. Vol. 36. №. 1. P. 182-195.

- 376. Cregg J.M., Barringer K.J., Hessler A.Y., и др. Pichia pastoris as a host system for transformations // Mol. Cell Biol. 1985. Vol. 5. №. 12. Р. 3376-3385.
- 377. Cregg J.M., Madden K.R., Barringer K.J., и др. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast Pichia pastoris // Mol. Cell Biol. 1989. Vol. 9. №. 3. Р. 1316-1323.
- 378. Shu M., Shen W., Yang S., и др. High-level expression and characterization of a novel serine protease in Pichia pastoris by multi-copy integration // Enzyme Microb. Technol. 2016. Vol. 92. P. 56-66.
- 379. Shen W., Shu M., Ma L., и др. High level expression of organophosphorus hydrolase in Pichia pastoris by multicopy ophcM assembly // Protein Expr. Purif. 2016. Vol. 119. P. 110-116.
- 380. Clare J.J., Rayment F.B., Ballantine S.P., и др. High-level expression of tetanus toxin fragment C in Pichia pastoris strains containing multiple tandem integrations of the gene // Biotechnology (N Y). 1991. Vol. 9. №. 5. Р. 455-460.
- 381. Sreekrishna K., Potenz R.H., Cruze J.A., и др. High level expression of heterologous proteins in methylotrophic yeast Pichia pastoris // J. Basic. Microbiol. 1988. Vol. 28. №. 4. Р. 265-278.
- 382. Stratton J., Chiruvolu V., Meagher M. High cell-density fermentation // Methods Mol. Biol. 1988. Vol. 103. P. 107-120.
- 383. Bretthauer R.K., Castellino F.J. Glycosylation of Pichia pastoris-derived proteins // Biotechnol. Appl. Biochem. 1999. Vol. 30. №. 3. P. 193-200.
- 384. Tschopp J. F., Sverlow G., Kosson R., и др. High-Level Secretion of Glycosylated Invertase in the Methylotrophic Yeast, Pichia Pastoris // Bio/Technology. 1987. Vol. 5. Р. 1305-1308.
- 385. Paifer E., Margolles E., Cremata J., и др. Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in Pichia pastoris using two different signal sequences // Yeast. 1994. Vol. 10. №. 11. P. 1415-1419.

- 386. Hatch F.T., Lees R.S. Practical method for plasma lipoprotein analysis // Adv. Lipid Res. 1986. Vol. 6. P. 1-68.
- 387. Lund A.H., Duch M., Pedersen F.S. Increased cloning efficiency by temperature-cycle ligation // Nucleic Acids Res. 1996. Vol. 24. №. 4. P. 800-801.
- 388. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. // Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984. 480 с.
- 389. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. №. 5259. P. 680-685.
- 390. Walker John M. The Protein Protocols Handbook. New Jersey: Humana Press Inc. 1996. 349 c.
- 391. Hatfield G.W., Roth D.A. Optimizing scaleup yield for protein production: Computationally Optimized DNA Assembly (CODA) and Translation Engineering // Biotechnol. Annu. Rev. 2007. Vol. 13. P. 27-42.
- 392. Jung S.K., McDonald K. Visual Gene Developer: a fully programmable bioinformatics software for synthetic gene optimization // BMC Bioinformatics 12(1), 340, 2011. URL: http://www.visualgenedeveloper.net/
- 393. Källberg M., Wang H., Wang S., и др. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server // Nature Protocols 7, 1511-1522, 2012. URL: http://raptorx.uchicago.edu/
- 394. Randall L.L., Hardy S.J.S. Correlation of competence for export with lack of tertiary structure of the mature species: A study in vivo of maltose-binding protein in E.coli // Cell. 1986. Vol. 46. №. 6. P. 921-928.
- 395. Meirelles Lda S., Nardi N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization // Br. J. Haematol. 2003. Vol. 123. №. 4. P. 702-711.
- 396. Toporkova L.B., Orlovskaya I.A., Sennikov S.V., и др. In vitro study of the biological properties of the recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // Immunology. 2009. №. 4. Р. 203-205.

- 397. Zhang, Y., Huo, M., Zhou, и др. J. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. Comput. Methods Programs Biomed. 2010. Vol. 99. №. 3. Р. 306-314.
- 398. Панин Л. Е., Шабалина И. Г., Шалбуева Н. И., и др. Изменение эффекта пальмитоил-КоА на окислительное фосфорилирование митохондрий печени крысы под влиянием апопротеинов высокой и очень низкой плотности // Бюллетень СО РАМН. 1998. №. 3. С. 57-62.
- 399. Brace R.J., Sorrenson B., Sviridov D., и др. A gel-based method for purification of apolipoprotein A-I from small volumes of plasma // J. Lipid Res. 2010. Vol. 51. №. 11. Р. 3370-3376.
- 400. Cham B.E., Knowles B.R. A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation // J. Lipid Res. − 1976. − Vol. 17. − №. 2. − P. 176-181.
- 401. Ge X., Wei M., He S., и др. Advances of Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes) and Their Application in Drug Delivery // Pharmaceutics. 2019. Vol. 11. №. 2:55.
- 402. Мамаев А.Л., Беклемишев А.Б. Клонирование и анализ экспрессии синтетических генов аполипопротеина А-І человека в клетках Escherichia coli и метилотрофных дрожжей Pichia pastoris // Сибирский научный медицинский журнал. 2014. Т. 34. №. 5. С. 37-42.
- 403. Bae C.S., Yang D.S., Lee J., и др. Improved process for production of recombinant yeast-derived monomeric human G-CSF // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. Vol. 52. №. 3. Р. 338-344.
- 404. Bahrami A., Shojaosadati S.A., Khalilzadeh R., и др. Prevention of human granulocyte colony-stimulating factor protein aggregation in recombinant Pichia pastoris fed-batch fermentation using additives // Biotechnol. Appl. Biochem. 2009. Vol. 52 (Pt 2). P. 141-148.
- 405. Pykhtina M. B., Romanov V.P., Miroshnichenko S.M., Beklemishev A.B. Construction of a Pichia pastoris strain efficiently producing recombinant

human granulocyte-colony stimulating factor (rhG-CSF) and study of its biological activity on bone marrow cells // Molecular Biology Reports. $-2020. - \text{Vol.} 47. - \text{N}\underline{\circ}. 1. - \text{P.} 607-620.$

406. Usynin I.F., Dudarev A.N. Gorodetskaya A.Yu., и др. Apolipoprotein A-I Stimulates Cell Proliferation in Bone Marrow Cell Culture // Bull. Exp. Biol. Med. – 2018. – Vol. 164. – №. 3. – Р. 308-311.