

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Гапизов Султан Шахбанович

**ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ 10 ДОМЕНА ФИБРОНЕКТИНА
ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ**

03.01.08 – Биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре биоинженерии Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» и в лаборатории инженерии белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

**Научные
руководители:**

*Долгих Дмитрий Александрович,
доктор биологических наук, профессор*

*Петровская Лада Евгеньевна,
кандидат химических наук*

**Официальные
оппоненты:**

*Богачев Александр Валерьевич,
доктор биологических наук, заведующий отделом
молекулярной энергетики микроорганизмов Научно-
исследовательского института физико-химической
биологии имени А.Н. Белозерского Федерального
государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Московский
государственный университет имени М.В. Ломоносова»*

*Федоров Алексей Николаевич,
доктор биологических наук, заведующий лабораторией
молекулярной биотехнологии, заместитель директора по
научной работе Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской
академии наук*

*Калиниченко Светлана Викторовна,
кандидат биологических наук, научный сотрудник
лаборатории молекулярной онкогенетики Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
«Институт биологии гена» Российской академии наук*

Защита диссертации состоится «9» октября 2019 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.04 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва Ленинские горы, д. 1, стр. 73, Факультет биоинженерии и биоинформатики, ауд. 406.

E-mail: dissovet@belozersky.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/230004821/>

Автореферат разослан «___» сентября 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



И.В. Шаповалова

Принятые сокращения: $^{10}\text{Fn3}$ – 10 домен фибронектина человека III типа; **ABD** – альбумин-связывающий домен; **VEGFR2** – рецептор фактора роста эндотелия сосудов-2; **AT** – аутотранспортер; **ГФБ** – гибридные флуоресцентные белки; **ФНО** – фактор некроза опухоли. **2D** культуры – культуры клеток, выращенные на пластиковой поверхности; **3D** культуры – культуры клеток, выращенные в объеме.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Хронические воспалительные и аутоиммунные заболевания человека представляют собой серьезную медицинскую и социальную проблему, которая может быть решена путем использования современных диагностических и терапевтических подходов. Для процессов воспаления и опухолевого роста характерна повышенная экспрессия на эндотелии сосудов специфических молекул адгезии, в частности, $\alpha_v\beta_3$ -интегрина и рецептора фактора роста эндотелия сосудов-2 (VEGFR2), а также увеличение синтеза фактора некроза опухолей человека (ФНО). ФНО является многофункциональным провоспалительным цитокином, играющим важную роль в развитии таких заболеваний, как псориаз, болезнь Крона, ревматоидный артрит и других. Одним из возможных путей борьбы с вышеперечисленными заболеваниями является подавление активности ФНО и других маркеров воспаления и неоангиогенеза с помощью связывающих белков.

Высокая аффинность, специфичность, длительное время полувыведения и безопасность в применении обеспечивают широкую распространность препаратов на основе рекомбинантных антител, однако для их производства используется эукариотическая система экспрессии, что приводит к увеличению их стоимости. Кроме того, структурные особенности полноразмерных антител затрудняют проникновение в ткани и связывание некоторых типов мишней.

Для получения терапевтических препаратов, обладающих аналогичными связывающими функциями, но лишенных перечисленных недостатков, могут быть использованы альтернативные каркасные белки (АКБ). Это небольшие полипептидные молекулы, определенные участки которых могут варьироваться с целью обеспечения взаимодействия с целевыми лигандами. Одним из наиболее популярных АКБ является 10 домен фибронектина III типа человека ($^{10}\text{Fn3}$), который характеризуется небольшим размером, отсутствием дисульфидных связей, высокой термостабильностью и растворимостью. Высокоаффинные связывающие белки на основе $^{10}\text{Fn3}$ могут быть получены путем отбора из комбинаторных библиотек с последующей экспрессией в клетках бактерий. В частности, селекция комбинаторных библиотек методом бактериального дисплея на основе мембранных белков семейства аутотранспортеров открывает широкие возможности конструирования искусственных связывающих белков с разной специфичностью и высоким уровнем экспрессии в растворимой форме.

Небольшой размер молекул $^{10}\text{Fn3}$ позволяет модифицировать их структуру путем добавления различных функциональных модулей, например, создавать гибридные

флуоресцентные белки для визуализации маркеров воспаления и неоангиогенеза, а также способствует хорошему проникновению в ткани. Однако он же является причиной короткого времени полувыведения таких белков в организме, в то время как для терапевтического применения требуется поддержание эффективной концентрации действующего вещества в течение продолжительного времени. Для решения этой проблемы необходима разработка различных стратегий увеличения времени циркуляции, позволяющих улучшить фармакокинетику и фармакодинамические свойства рекомбинантных белков.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является конструирование гибридных белков на основе $^{10}\text{Fn3}$ для диагностики и терапии хронических воспалительных заболеваний и исследование их физико-химических и биологических свойств. Выбор данного каркасного белка определяется его свойствами (небольшой размер, высокая растворимость, низкая иммуногенность, высокая термостабильность), а также его широким использованием в качестве основы для получения искусственных связывающих белков. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Конструирование и оптимизация системы бактериального дисплея на основе гибридного аутотранспортера AT877 *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T для получения ФНО-связывающих вариантов $^{10}\text{Fn3}$.
2. Отбор ФНО-связывающих белков из комбинаторной библиотеки вариантов $^{10}\text{Fn3}$ с помощью метода бактериального дисплея. Характеристика их физико-химических и биологических свойств.
3. Конструирование гибридных полипептидов, содержащих флуоресцентный белок mCherry и $\alpha\text{v}\beta3$ -интегрин- или VEGFR2- связывающие белки на основе $^{10}\text{Fn3}$, изучение их свойств и возможностей использования для визуализации маркеров воспаления и неоангиогенеза.
4. Конструирование гибридных белков пролонгированного действия на основе альбумин-связывающего домена (ABD) и $\alpha\text{v}\beta3$ -интегрин-связывающего варианта $^{10}\text{Fn3}$ (JCL), изучение их физико-химических свойств.
5. Исследование фармакокинетики и биораспределения гибридных белков пролонгированного действия в организме мышей.

Научная новизна работы

В результате проделанной работы впервые сконструирована система бактериального дисплея на основе гибридного аутотранспортера AT877 *P. cryohalolentis* K5^T. Установлено, что расположение холодаактивной эстеразы EstPc на N-конце гибридного пассажирского домена AT877 повышает уровень экспонирования $^{10}\text{Fn3}$ в 3 раза по сравнению с другими конструкциями. С использованием данной системы получены новые искусственные связывающие белки, демонстрирующие высокую аффинность к ФНО.

Впервые получен новый тип гибридных молекул, состоящих из красного флуоресцентного белка mCherry и $^{10}\text{Fn3}$. Установлено, что расположение mCherry на N-конце гибридного белка и предложенная нами модификация его N-концевой аминокислотной последовательности способствуют увеличению уровня синтеза гибридного белка в клетках *Escherichia coli* в растворимой форме. На основе предложенной конструкции получены гибридные флуоресцентные белки Cherry-JCL и Cherry-CT322, содержащие $\alpha\text{v}\beta3$ -интегрин- и VEGFR2-связывающие варианты $^{10}\text{Fn3}$ соответственно. Продемонстрирована возможность их использования для визуализации $\alpha\text{v}\beta3$ -интегрина и VEGFR2 на поверхности различных клеточных линий и на образцах ткани рака поджелудочной железы методом конфокальной микроскопии.

Впервые получены гибридные белки, состоящие из ABD и $\alpha\text{v}\beta3$ -интегрин-связывающего варианта $^{10}\text{Fn3}$ и обладающие увеличенным временем циркуляции в кровотоке. Определена оптимальная конфигурация белков-партнеров и длина линкера в составе гибридного белка. Подтверждены высокая аффинность полученных гибридов по отношению к HSA (человеческий сывороточный альбумин) и $\alpha\text{v}\beta3$ -интегрину, а также высокая термическая стабильность белка JCL-L₁₄-ABD, сопоставимая с $^{10}\text{Fn3}$. Результаты экспериментов по изучению фармакодинамики и биораспределения гибридных белков в организме мышей продемонстрировали, что их можно использовать для увеличения времени циркуляции искусственных связывающих белков на основе $^{10}\text{Fn3}$.

Практическая значимость исследования

Полученные в ходе выполнения данной работы результаты могут быть использованы для создания и оптимизации новых средств диагностики и терапии на основе $^{10}\text{Fn3}$, а также других каркасных белков. Система бактериального дисплея на основе аутотранспортера AT877 *P. cryohalolentis* K5^T может быть использована для отбора вариантов $^{10}\text{Fn3}$, связывающих различные целевые лиганды. Гибиды, состоящие из красного флуоресцентного белка mCherry и вариантов $^{10}\text{Fn3}$, связывающих различные мишени, являются перспективными инструментами визуализации белковых маркеров на поверхности клеток с целью диагностики. Конструирование гибридных белков, включающих альбумин-связывающий домен, может быть использовано для увеличения времени циркуляции в кровотоке терапевтических препаратов на основе $^{10}\text{Fn3}$.

Положения, выносимые на защиту

1. Сконструирована новая система бактериального дисплея на основе гибридного аутотранспортера AT877 *P. cryohalolentis* K5^T.
2. Установлено, что расположение холоактивной эстеразы EstPc на N-конце гибридного пассажирского домена AT877 способствует увеличению уровня экспонирования $^{10}\text{Fn3}$ на поверхности клеток *E. coli*.

3. Методом бактериального дисплея из комбинаторной библиотеки генов $^{10}\text{Fn3}$ отобраны белки, обладающие высокой ФНО-связывающей активностью. Получен вариант Fn52 с $K_d = 35 \pm 7 \text{nM}$.
4. Сконструированы гибридные флуоресцентные белки Cherry-JCL и Cherry-CT322, которые связывают $\alpha\text{v}\beta3$ -интегрин и VEGFR2 на поверхности клеток различного происхождения и могут быть использованы для визуализации молекулярных маркеров воспаления и неоангиогенеза ($\alpha\text{v}\beta3$ -интегрина и VEGFR2).
5. Сконструирован гибридный белок, содержащий $\alpha\text{v}\beta3$ -интегрин-связывающий вариант $^{10}\text{Fn3}$ и ABD (JCL-L₁₄-ABD), обладающий повышенной стабильностью и увеличенным временем циркуляции в кровотоке мыши.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на 7 конференциях: XXVI Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, 2014 г.; Международная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, Москва, 2014 г.; XXVIII Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, 2016 г.; 41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better Life, Эфес, Турция, 2016 г.; V съезд биохимиков России, Сочи – Дагомыс, 2016 г.; Объединённый научный форум (Международная научная конференция по биоорганической химии, «XII чтения памяти академика Ю. А. Овчинникова», VIII российский симпозиум «Белки и Пептиды»), Москва, 2017 г.; International Forum «Biotechnology: current state and future development. Life Sciences», Москва, 2018 г. Апробация работы была проведена на межлабораторном семинаре в Институте биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук и на заседании кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Публикации

По результатам работы опубликовано 6 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых Web of Science и Scopus. Все статьи опубликованы в журналах, входящих в перечень, принятый МГУ им. М.В. Ломоносова. Получен Патент РФ.

Личный вклад автора в проведение исследования

Личный вклад заключается в анализе литературных данных, активном участии в сборе материала, постановке экспериментов, обработке полученных экспериментальных данных и их интерпретации, подготовке публикаций, презентации данных на отечественных и международных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация включает разделы: список используемых сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы, состоящий из 244 источников. Работа состоит из 142 страниц машинописного текста, содержит 50 рисунков, 5 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методы исследования

В работе были использованы следующие методы и технологии:

- Методы генной инженерии для создания плазмидных конструкций.
- Экспрессия рекомбинантных белков в клетках *Escherichia coli*.
- Методы выделения и очистки белков: Ni-аффинная хроматография, ультрацентрифугирование, диализ.
- Физико-химические методы анализа белков: гель-электрофорез, аналитическая гель-фильтрация, измерение спектров флуоресценции, оценка термической стабильности по спектрам триптофановой флуоресценции.
- Для изучения биологических свойств белков были использованы методы клеточной биологии, иммуноферментный анализ, Вестерн-блот, МТТ-тест, конфокальная микроскопия и методы работы с лабораторными животными.

Результаты и их обсуждение

1. Конструирование системы бактериального дисплея на основе гибридного аутотранспортера AT877 *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T

Целью данного этапа работы явилось конструирование и оптимизация системы клеточного дисплея 10-го домена фибронектина человека III типа (¹⁰Fn3) на основе аутотранспортера AT877 *P. cryohalolentis* K5^T и получение новых искусственных белков, связывающих ФНО, путем селекции комбинаторной библиотеки вариантов генов ¹⁰Fn3 с использованием данной системы.

По сравнению с наиболее популярной системой дрожжевого дисплея вариантов ¹⁰Fn3, системы бактериального дисплея на основе *E. coli* позволяют проводить скрининг более представительных библиотек благодаря более высокой эффективности трансформации. По сравнению с фаговым дисплеем, число молекул экспонированного на поверхности клеток белка оказывается существенно большим (до 1,5 x 10⁵).

P. cryohalolentis K5^T является грамотрицательной бактерией, которая была выделена из низкотемпературного рассола (криопега) в вечной мерзлоте. Геном этой бактерии содержит ген, кодирующий потенциальную эстеразу, относящуюся к семейству аутотранспортеров (AT877). AT877 состоит из пассажирского эстеразного и транслокаторного доменов (264 и 266 а. о., соответственно), и α-спирального линкера между ними (Рис. 1А). Ранее нами было продемонстрировано, что AT877 успешно экспрессируется в *E. coli* и встраивается во внешнюю мембрану клеток. На первом этапе данной работы была разработана и оптимизирована система клеточного дисплея для ¹⁰Fn3 на основе AT877.

1.1. Экспрессия ¹⁰Fn3 в *E. coli* с использованием транслокаторного домена AT877

Ранее была сконструирована плазмида для экспрессии гена AT877 в клетках *E. coli* под контролем промотора *T7lac*. Для получения гибридного AT, содержащего ¹⁰Fn3 в качестве

пассажирского домена, его кодирующую последовательность объединяли с фрагментом ДНК, соответствующим α -спиральному линкеру и транслокаторному домену AT877 с гексагистидиновым участком (His₆) на С-конце (Рис. 1А). Анализ с помощью белкового электрофореза в SDS-ПААГ индуцированных клеток *E. coli* C41(DE3), содержащих плазмиду pFn877, подтвердил высокий уровень синтеза рекомбинантного белка с электрофоретической подвижностью, соответствующей расчетной молекулярной массе зрелого гибридного AT (Fn877) (Рис. 1Б). Методом Вестерн-блота с использованием антител против His₆ обнаружено, что он детектировался в мембранный фракции (Рис. 1В), однако в основном присутствовал во фракции нерастворимых клеточных белков (тельца включения) (Рис. 1Г).

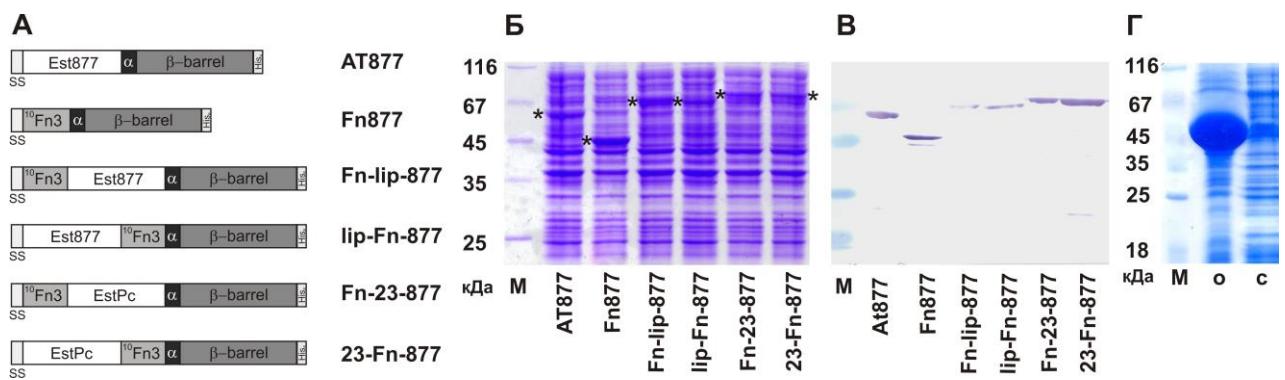


Рисунок 1. Экспрессия гибридных AT в клетках *E. coli*. (А) Схемы строения гибридных AT. SS, сигнальный пептид PelB; Est877, нативный пассажирский домен AT877; ¹⁰Fn3, 10-й домен человеческого фибронектина III типа; EstPc, эстераза *P. cryohalolentis* K5^T; α , α -спиральный линкер; β -barrel, транслокаторный домен AT877; His₆ - гексагистидиновая последовательность. (Б) Электрофорез в SDS-ПААГ по Лэммли лизатов клеток *E. coli* C41(DE3), экспрессирующих указанные варианты AT. * обозначены полосы рекомбинантных гибридных AT. (В) Вестерн-блот с анти-His₆-антителами фракции внешней мембраны клеток *E. coli* C41(DE3), экспрессирующих различные варианты AT. М – стандарты молекулярной массы белков. (Г) SDS-ПААГ лизата клеток *E. coli* C41(DE3), экспрессирующих Fn877 после индукции и обработки ультразвуком, о – осадок, с – супернатант.

Для доказательства поверхностной локализации пассажирского домена Fn877 в клетках *E. coli* мы провели цельноклеточную ELISA с использованием специфических моноклональных антител против ¹⁰Fn3. Сигнал, обеспечиваемый клетками, экспрессирующими данный AT, был только в 3,5 раза выше, чем сигнал от неиндуцированных контрольных клеток (Рис. 2А), что указывало на низкий уровень экспонирования ¹⁰Fn3 на поверхности. Известно, что ¹⁰Fn3 обладает высокой скоростью сворачивания и стабильной пространственной структурой, что, вероятно, может создавать препятствия для его секреции.

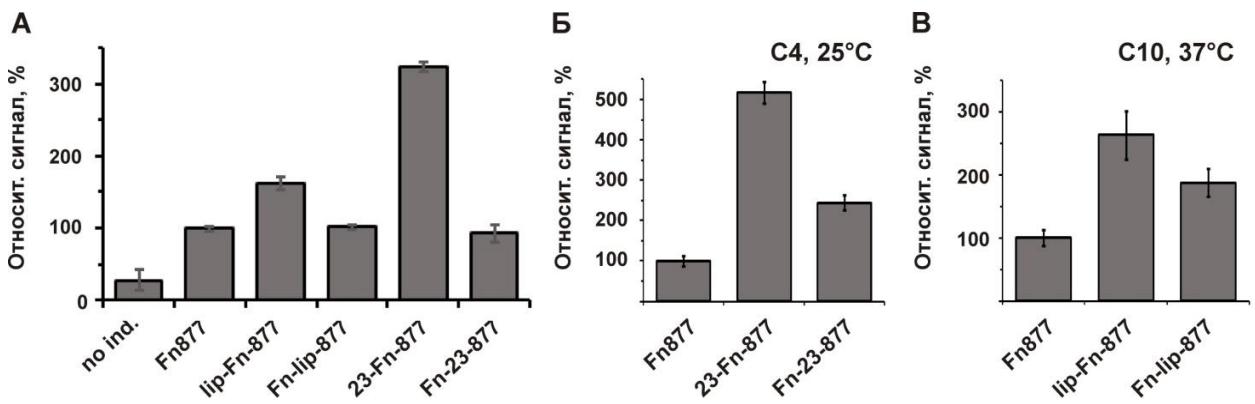


Рисунок 2. Поверхностная локализация AT, содержащих гибридные пассажирские домены. (А) Цельноклеточная ELISA с антителами к $^{10}\text{Fn3}$ клеток *E. coli* C41(DE3), экспрессирующих различные гибридные AT. Сигналы нормализованы к сигналам клеток, экспрессирующих Fn877. (Б, В) Эстеразная активность клеток *E. coli*, экспрессирующих гибридные пассажирские домены $^{10}\text{Fn3}$ с EstPc (Б) или Est877 (В), анализировали с использованием п-нитрофенилбутират (C4) или п-нитрофенилдеканоата (C10) при указанных температурах, соответственно. Приведены средние результаты трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение.

1.2. Экспрессия AT с гибридными пассажирскими доменами, включающими $^{10}\text{Fn3}$ и Est877 или EstPc

Ранее было продемонстрировано, что, в отличие от $^{10}\text{Fn3}$, природный пассажирский домен AT877 Est877 и холодаактивная эстераза EstPc из той же бактерии эффективно экспонируются на клеточной поверхности *E. coli* с помощью транслокаторного домена AT877. Чтобы оценить возможность использования этих полипептидов для увеличения уровня экспонирования $^{10}\text{Fn3}$, мы сконструировали несколько гибридных AT, которые содержали Est877 или EstPc и $^{10}\text{Fn3}$ в составе гибридных пассажирских доменов. В разных генетических конструкциях гены, кодирующие эстеразу, помещали в 5'- или 3'-положение относительно гена $^{10}\text{Fn3}$ (Рис. 1А). Белки-партнеры были разделены линкером (Gly₄Ser)₂, чтобы обеспечить их независимое сворачивание.

Анализ с помощью белкового электрофореза в SDS-ПААГ индуцированных клеток, содержащих указанные варианты гибридных AT, продемонстрировал, что уровень их экспрессии несколько ниже по сравнению с клетками, экспрессирующими Fn877 (Рис. 1Б). Анализ фракций наружной мембранны клеток *E. coli* методом Вестерн-блота с антителами против His₆ показал, что гибридный AT, содержащий EstPc на N-конце пассажирского домена (23-Fn-877), накапливается во внешней мембране клеток в большем количестве, чем другие варианты (Рис. 1В).

С использованием цельноклеточной ELISA с антителами против $^{10}\text{Fn3}$ было показано, что клетки, которые экспрессировали AT с пассажирскими доменами Fn-23 и Fn-lip (Рис. 1А), демонстрируют уровень экспонирования $^{10}\text{Fn3}$ на поверхности клеток *E. coli*, аналогичный установленному ранее для Fn877 (Рис. 2А). Экспрессия AT с гибридным пассажиром Lip-Fn привела к увеличению уровня поверхностной локализации данного белка в 1,6 раз, а в случае с пассажирским доменом 23-Fn – в 3 раза по сравнению с клетками, экспрессирующими Fn877. Следует отметить, что именно N-концевое положение эстеразы EstPc в составе гибридного пассажирского домена обеспечило повышенную поверхностную локализацию целевого белка,

поскольку АТ с пассажирским доменом Fn-23 продемонстрировал сигнал, который был сопоставим с сигналом от клеток, экспрессирующих Fn877.

Для подтверждения полученных данных были проведены исследования эстеразной активности клеток *E. coli*, экспрессирующих варианты АТ с различными пассажирскими доменами. Клетки, которые экспрессировали 23-Fn-877, проявляли в 5,2 раза более высокую активность по сравнению с клетками, экспрессирующими Fn877 (отрицательный контроль), и в 2 раза – по сравнению с Fn-23-877 (**Рис. 2Б**).

Эстеразная активность клеток, содержащих АТ Lip-Fn-877 оказалась в 1,4 раза выше, чем у клеток с АТ Fn-lip-877 (**Рис. 2В**). Пассажирские домены, содержащие липазу Est877 в обеих ориентациях, показали активность соответственно в 2,6 и 1,9 раз выше, чем контрольные клетки (**Рис. 2В**). Эти результаты не могут быть объяснены различиями в их уровне экспрессии, поскольку все рекомбинантные АТ демонстрируют примерно одинаковый уровень синтеза в клетках бактерий (**Рис. 1Б**).

Таким образом, в результате проделанной работы установлено, что расположение на N-конце гибридного пассажирского домена АТ877 аминокислотной последовательности эстеразы EstPc *P. cryohalolentis* K5^T, которая относится к холдоактивным ферментам, существенно повышает эффективность экспорта ¹⁰Fn3 на поверхность бактериальных клеток. Соответствующая генетическая конструкция (в составе плазмида pEFN877) была использована для отбора ФНО-связывающих вариантов ¹⁰Fn3 из комбинаторной библиотеки методом клеточного дисплея.

1.3. Конструирование и экспрессия комбинаторной библиотеки вариантов генов ¹⁰Fn3 в плазмиде pEFN877

Для получения искусственных связывающих белков на основе ¹⁰Fn3 в результате рандомизации участков, кодирующих петли BC и FG, была сконструирована комбинаторная библиотека генов. В качестве праймеров для ПЦР использовали олигонуклеотиды, синтезированные из тримерных фосфорамидитных блоков. Соотношение кодонов в их составе отражало аминокислотный состав участков, определяющих комплементарность (CDR) природных антител (Тут 20%, Ser и Gly по 15%, 16 прочих а.о., за исключением цистеина, – по 3,1% каждого). Праймер Bcd обеспечивал рандомизацию семи аминокислотных остатков, образующих петлю BC, а праймер Fgd – восьми остатков, входящих в петлю FG (**Рис. 3А**). В следующем раунде ПЦР-фрагменты с рандомизированными участками были объединены с фрагментом, кодирующим N-концевую часть ¹⁰Fn3, в результате чего была получена комбинаторная библиотека.

Для последующей селекции ФНО-связывающих вариантов ¹⁰Fn3 мы клонировали комбинаторную библиотеку в вектор pEFN877 (**Рис. 3Б**) вместо гена ¹⁰Fn3 дикого типа. Итоговый размер библиотеки определялся стадией лигирования, в которой было использовано 3 мкг вектора. Таким образом, размер полученной библиотеки составил $\sim 4,8 \times 10^9$ вариантов, а с учетом эффективности трансформации клеток *E. coli* и доли правильных нуклеотидных последовательностей – $2,5 \times 10^8$ вариантов. Полученной суммарной плазмидной ДНК, содержащей

набор генов гибридных аутотранспортеров, трансформировали клетки *E. coli* штамма BL21(DE3)pLysS. В результате анализа клеточных лизатов после индукции с помощью белкового электрофореза, а также методом Вестерн-блота с антителами к His₆ показано, что выращивание клеток в присутствии ИПТГ сопровождается синтезом белка, электрофоретическая подвижность которого соответствует расчетной молекулярной массе гибридного аутотранспортера (78 кДа) (Рис. 4А, Б дорожка 1).

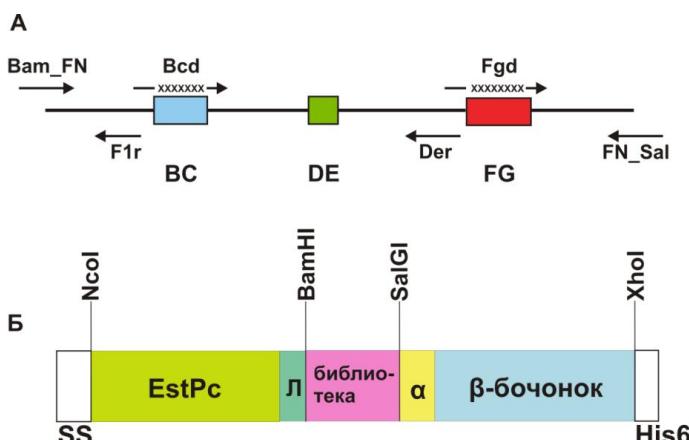


Рисунок 3. (А) Схема расположения праймеров, использованных для конструирования комбинаторной библиотеки генов ¹⁰Fn3. BC, DE, FG – последовательности, кодирующие петли ¹⁰Fn3; X – рандомизированные участки. (Б) Схема строения гена гибридного аутотранспортера в составе плазмиды pEFN877. Л - глицил-сериновый линкер.

1.4. Селекция комбинаторной библиотеки методом бактериального дисплея

Для отбора клонов *E. coli*, экспонирующих ФНО-связывающие варианты ¹⁰Fn3 на поверхности клеток, селекцию проводили в два этапа. На первом этапе с целью устранения из библиотеки белковых последовательностей, обладающих неспецифическим сродством к стрептавидину, культуру клеток после индукции инкубировали с суспензией магнитных шариков, не содержащих биоФНО. На следующем этапе клетки из супернатаанта, не связавшиеся со стрептавидином, инкубировали с 50 нМ биоФНО, после чего добавляли магнитные шарики. Клетки в составе образовавшихся комплексов подрашивали в культуральной среде, а затем повторяли индукцию и раунды селекции.

Анализ методом Вестерн-блота лизатов клеток, обработанных указанным способом, продемонстрировал, что уровень экспрессии гибридных аутотранспортеров в клонах даже после одного раунда селекции существенно повышается по сравнению с контрольными клетками, не подвергшимися отбору (Рис. 4А, Б, дорожки 1, 2). Исследование клеток *E. coli*, экспонирующих на поверхности библиотеку вариантов генов ¹⁰Fn3, после каждого раунда методом иммуноферментного анализа показало, что в результате отбора происходит постепенное повышение эффективности взаимодействия клеток с ФНО (Рис. 4В).

После завершения третьего раунда селекции из суммарной плазмидной ДНК, кодирующей библиотеку ФНО-связывающих белков в составе гибридного аутотранспортера, были амплифицированы гены вариантов ¹⁰Fn3, которые клонировали в плазмиду pET32a с получением соответствующей библиотеки для цитоплазматической экспрессии в клетках штамма *E. coli* BL21(DE3). В результате выращивания отдельных колоний в лунках планшета, содержащих среду для аутоиндукции, и анализа связывающей активности лизатов полученных культур методом

ELISA были отобраны 5 клонов, продуцирующих варианты $^{10}\text{Fn3}$ с наиболее высокой ФНО-связывающей активностью. Секвенирование этих клонов показало наличие различных вариантов генов $^{10}\text{Fn3}$, содержащих измененные последовательности петель BC и FG.

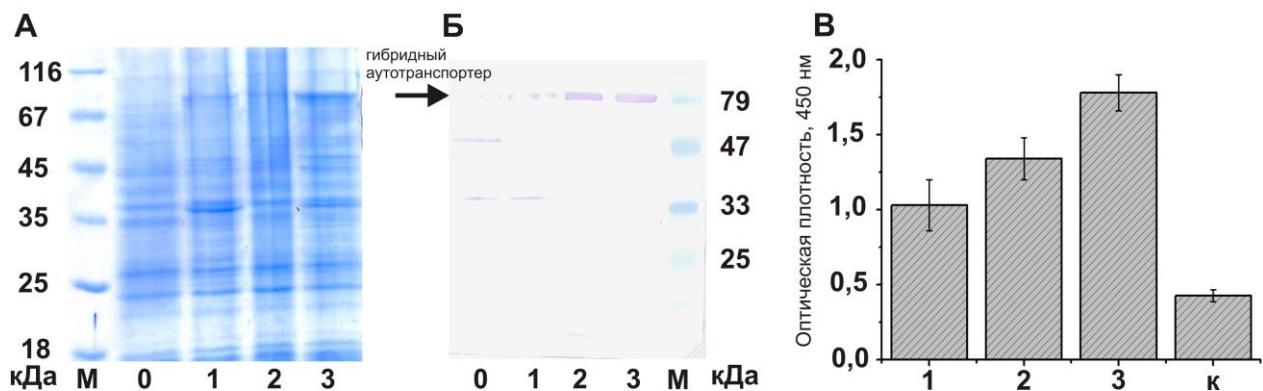


Рисунок 4. Анализ экспрессии комбинаторной библиотеки вариантов генов $^{10}\text{Fn3}$. Электрофорез в 12% SDS-ПААГ по Лэммли (А) и Вестерн-блот с анти-His₆ антителами (Б) лизатов клеток BL21(DE3)pLysS, трансформированных суммарной плазмидной ДНК, содержащей библиотеку в векторе pEFN877, до индукции (дорожка 0), после индукции и до отбора (дорожка 1), после одного (дорожка 2) и двух (дорожка 3) раундов отбора. М – маркеры молекулярного веса белков. (В) Анализ методом ELISA ФНО-связывающей активности клеток BL21(DE3)pLysS, экспрессирующих на поверхности библиотеку генов $^{10}\text{Fn3}$. Приведены средние результаты трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение.

1.5. Получение и характеристика ФНО-связывающих белков

Анализ локализации полученных рекомбинантных белков после индукции и обработки клеток ультразвуком показал, что все они полностью или преимущественно растворимы в цитоплазме бактериальных клеток (Рис. 5А). С помощью металло-аффинной хроматографии ФНО-связывающие варианты $^{10}\text{Fn3}$ FN9, FN13, FN19, FN52, FN66 были выделены в количестве 1–2 мг с высокой степенью чистоты ($\geq 90\%$) (Рис. 5Б). Выход белков составил 20–30 мг/л бактериальной культуры.

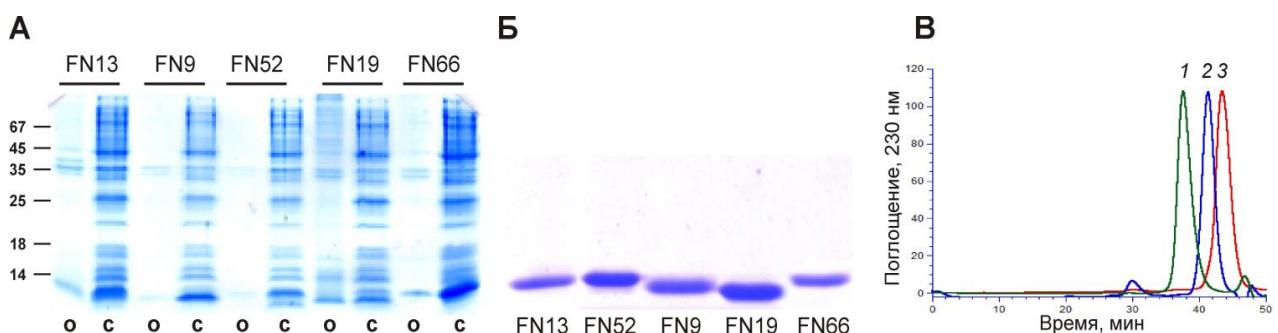


Рисунок 5. Электрофорез в 14% SDS-ПААГ по Лэммли (А) осадков (о) и супернатантов (с) после обработки CellLytic культур, экспрессирующих различные варианты $^{10}\text{Fn3}$; (Б) очищенных вариантов $^{10}\text{Fn3}$. (В) Гель-фильтрационный анализ очищенных препаратов ФНО-связывающих вариантов $^{10}\text{Fn3}$ на колонке Superdex 75. 1 – FN52, 2 – FN9, 3 – FN19.

При помощи аналитической гель-фильтрации на предварительно откалиброванной колонке Superdex 75 (Рис. 5В) в большей части препаратов обнаружено преимущественное наличие мономерной или димерной формы белка, а в некоторых случаях и высокомолекулярных агрегатов. В дальнейшей работе использовали варианты, не содержащие высокомолекулярную фракцию.

Определение ФНО-связывающей активности полученных белков методом ELISA с использованием биоФНО и конъюгата нейтравидина с HRP показало, что связывание с биоФНО домена фибронектина дикого типа, а также связывание всех полученных вариантов с BSA (отрицательный контроль) находится на уровне фона. С помощью данного подхода удалось установить, что наиболее высокой ФНО-связывающей активностью обладает вариант FN52 (Рис. 6А). Методом конкурентного ИФА для него определено значение $K_d=35\pm7$ нМ, что говорит об относительно высокой аффинности FN52 по отношению к ФНО.

Нейтрализующая активность FN52 была исследована с использованием стандартного теста на цитотоксичность ФНО по отношению к мышевым фибробластам линии L929, экспрессирующим рецептор ФНО I типа. Установлено, что концентрация ФНО, которая вызывает гибель 50% клеток, увеличивается при добавление варианта FN52 в 4 раза (Рис. 6Б). Следовательно, в используемом тесте данный белок проявляет свойства антагониста ФНО.

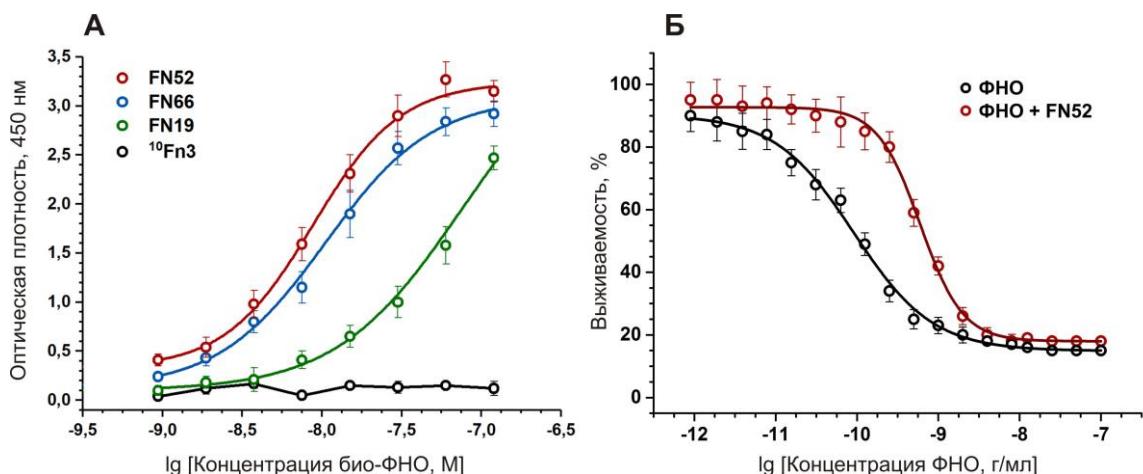


Рисунок 6. (А) Оценка аффинности взаимодействия вариантов ¹⁰Fn3 с ФНО методом ELISA. (Б) Цитотоксическое действие ФНО и ФНО в смеси с FN52 на клетки L929. Приведены средние результаты трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение.

Таким образом, в данной работе нами впервые сконструирована система клеточного дисплея на основе аутотранспортера *P. cryohalolentis* K5^T и продемонстрирована возможность экспорта рекомбинантных вариантов ¹⁰Fn3 на поверхность клеток *E. coli* с ее использованием. Показано, что разработанная система позволяет получать высокоаффинные ФНО-связывающие белки, обладающие также хорошей растворимостью и высоким уровнем экспрессии, что может быть впоследствии использовано для отбора вариантов, связывающих другие целевые лиганды.

2. Гибридные флуоресцентные белки на основе $^{10}\text{Fn3}$

Использование флуоресцентных белков в молекулярной и клеточной биологии является инновационным подходом, позволяющим непосредственно наблюдать процессы, происходящие с участием отдельных молекул. Удобным инструментом для детекции и визуализации белковых мишней могут служить гибридные белки, в состав которых входят флуоресцентный белок и полипептид, обеспечивающий связывание с целевой молекулой. Задачей данного этапа работы явилось конструирование гибридного гена, кодирующего $^{10}\text{Fn3}$ и красный флуоресцентный белок mCherry, оптимизация его экспрессии в клетках *E. coli*, а также получение на основе предложенной конструкции гибридных флуоресцентных белков, содержащих $\alpha\text{v}\beta3$ -интегрин-связывающий или VEGFR2-связывающий вариант $^{10}\text{Fn3}$.

2.1. Конструирование гибридных флуоресцентных белков на основе $^{10}\text{Fn3}$ и оптимизация их экспрессии в клетках *E.coli*

Для объединения генов mCherry и $^{10}\text{Fn3}$ в единой рамке считывания было проведено их совместное клонирование в вектор для экспрессии на основе pET32a. Для обеспечения независимого сворачивания белковых партнеров между кодирующими их генами была добавлена последовательность, кодирующая глицил-сериновый линкер. В результате оптимизации генов гибридных белков был получен ген, кодирующий белок Cherry- $^{10}\text{Fn3}$ и содержащий на 5'-конце первые шесть кодонов гена mRFP (красного флуоресцентного белка). Данная конструкция обеспечила существенное повышение уровня экспрессии гибридного белка в растворимой форме. С помощью металл-аффинной хроматографии рекомбинантный белок Cherry- $^{10}\text{Fn3}$ был получен в очищенном виде для более детального исследования его свойств.

Методом аналитической гель-фильтрации было показано, что белок представлен в мономерной форме. Анализ спектров возбуждения и эмиссии флуоресценции рекомбинантного Cherry- $^{10}\text{Fn3}$ продемонстрировал их полную идентичность с известными по литературным данным для mCherry (максимум возбуждения 587 нм, максимум эмиссии 610 нм).

Для демонстрации возможности применения гибридных флуоресцентных белков (ГФБ) на основе $^{10}\text{Fn3}$ с целью молекулярной визуализации мы сконструировали варианты этого белка, связывающие $\alpha\text{v}\beta3$ -интегрин (JCL) и VEGFR2 (CT322), являющиеся молекулярными маркерами воспаления и неоангиогенеза. Последовательности $\alpha\text{v}\beta3$ -интегрин- и VEGFR2-связывающих вариантов $^{10}\text{Fn3}$ были взяты из литературных источников. Гибридные гены, кодирующие белки Cherry-JCL и Cherry-CT322 соответственно, были получены путем сайт-направленного мутагенеза на основе генетической конструкции Cherry- $^{10}\text{Fn3}$. При помощи металл-аффинной хроматографии рекомбинантные белки были получены в очищенном виде (Рис. 7А, Б) с выходом около 20 мг/л культуры.

2.2. Исследование физико-химических свойств ГФБ

Методом аналитической гель-фильтрации установлено, что время выхода рекомбинантных гибридных белков с колонки соответствует мономерной форме препаратов (Cherry-JCL - 27,4 мин., Cherry-CT322 - 27,8 мин.) (Рис. 7В). Анализ спектров возбуждения и эмиссии флуоресценции полученных белков Cherry-JCL и Cherry-CT322 показал их идентичность с известными по литературным данным для mCherry (максимум возбуждения 587 нм, максимум эмиссии 610 нм).

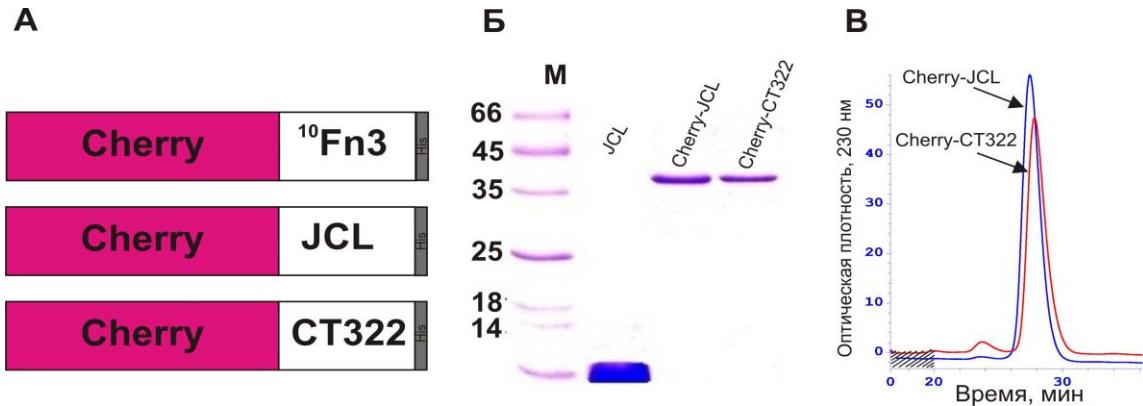


Рисунок 7. (А) Схемы строения гибридных белков. (Б) Электрофорез в 13% SDS-ПААГ по Лэммли очищенных рекомбинантных белков. М - стандарты молекулярной массы белков (Fermentas). (В) Гель-фильтрационный анализ белков Cherry-JCL и Cherry-CT322 на колонке Superdex 200.

2.3. Исследование возможности использования ГФБ для визуализации целевых лигандов методом конфокальной микроскопии

Как обсуждалось ранее, $\alpha\beta\gamma$ -интегрин и VEGFR2 являются важными диагностическими маркерами неоангиогенеза и воспаления. На начальном этапе было проведено исследование связывания белков Cherry-JCL и Cherry-CT322 с клетками, конститутивно экспрессирующими данные целевые лиганды.

В результате инкубации гибридного флуоресцентного белка Cherry-JCL, связывающего $\alpha\beta\gamma$ -интегрин, с клетками линии MDCK (эпителий почки собаки) методом конфокальной микроскопии было продемонстрировано равномерное окрашивание клеточной поверхности (Рис. 8Б). Аналогичная картина наблюдалась при использовании моноклональных антител к $\alpha\beta\gamma$ -интегрину (Рис. 8А). Добавление белка Cherry-¹⁰Fn3 (отрицательный контроль) сопровождалось слабым диффузным окрашиванием клеток, предположительно вследствие низкоаффинного неспецифического связывания.

Связывающую активность гибридного белка Cherry-CT322, содержащего VEGFR2-связывающий вариант ¹⁰Fn3, тестировали методом конфокальной микроскопии на линии клеток HL-60 (человеческая промиелоцитарная лейкемия). В результате эксперимента продемонстрировано специфическое окрашивание, соответствующее полученному с использованием моноклональных антител к VEGFR2, меченых фикоэритрином (Рис. 8В, Г). При

использовании mCherry в качестве отрицательного контроля связывание не детектировалось.

Необходимо отметить, что повышение уровня продукции $\alpha\beta3$ -интегрина и VEGFR2 характерно для эндотелиальных клеток сосудистой системы опухолей и может способствовать метастазированию путем облегчения инвазии раковых клеток. Поэтому мы сочли целесообразным создание модели воспаления на основе эндотелиальных клеток для дальнейшей оценки уровня экспрессии данных белков с помощью ГФБ, а также с целью последующего изучения эффектов других терапевтических и диагностических агентов.

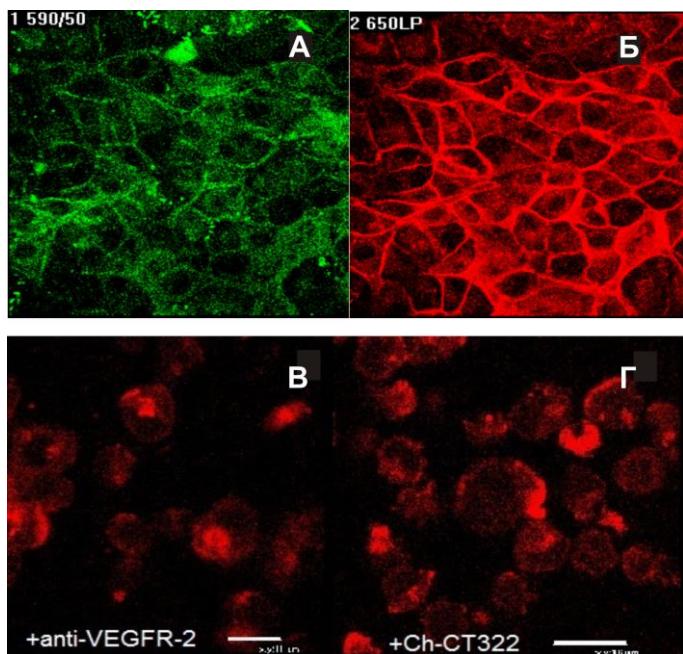


Рисунок 8. Анализ экспрессии $\alpha\beta3$ -интегрина на клеточной линии MDCK (А, Б) и VEGFR2 на клеточной линии HL-60 (В, Г) методом конфокальной микроскопии с использованием моноклональных антител (А, В) и белков Cherry-JCL (Б) и Cherry-CT322 (Г). Увеличение 600x.

2.4. Исследование возможностей использования ГФБ для визуализации маркеров воспаления эндотелия и неоангиогенеза в 3D культурах клеток Ea.hy926

В настоящее время для анализа взаимодействия противовоспалительных и антиангиогенных препаратов с эндотелиальными клетками используют первичные культуры, полученные из пуповинной вены здоровых доноров HUVEC (human umbilical vien endothelial cells) или гибридную линию Ea.hy926. Функциональные характеристики HUVEC и Ea.hy926 во многом совпадают, в частности, оба типа клеток отвечают изменением экспрессии молекул адгезии и продукцией ИЛ-6 и ИЛ-8 под действием ФНО. Традиционные культуры клеток, выращиваемые на пластиковых поверхностях (2D), значительно отличаются по своим свойствам от клеток аналогичного происхождения, находящихся в составе органов и тканей. Напротив, микроокружение клеток в составе 3D культур (сфераидов) приближено к условиям, в которых они находятся в организме человека или животного. В данной работе нами впервые была разработана статичная модель 3D культур эндотелиальных клеток линии Ea.hy926 и изучен ответ на стимуляцию ФНО и фактором роста эндотелия сосудов (VEGFA) в 2D и 3D культурах.

2.4.1. Оценка связывающей способности ГФБ, связывающих $\alpha\beta\gamma$ -интегрин и VEGFR-2, в 2D и 3D (сферахах) культурах клеточной линии Ea.hy926 методом конфокальной микроскопии

Сферахи, полученные нами на основе клеточной линии Ea.hy926, значительно отличаются от 2D культур по уровню экспрессии некоторых белков. Поэтому мы решили проверить связывающие свойства гибридных флуоресцентных белков Cherry-JCL и Cherry-CT322 на 3D культурах. Для сравнения в качестве контроля были использованы антитела против $\alpha\beta\gamma$ -интегрина и VEGFR2.

В результате инкубации ГФБ с 3D культурами с помощью конфокальной микроскопии было продемонстрировано равномерное окрашивание как клеточной поверхности сфераха, так и его внутреннего содержимого (Рис. 9Б, Г). Аналогичная картина наблюдалась при использовании моноклональных антител к $\alpha\beta\gamma$ -интегрину (Рис. 9А) и VEGFR2 (Рис. 9В). В обоих случаях экспрессия $\alpha\beta\gamma$ -интегрина наблюдалась во всем объеме сфераха. Необходимо отметить, что при использовании антител к $\alpha\beta\gamma$ -интегрину или VEGFR2 (Рис. 9А, В) окрашивание клеток сфераха, находящихся в центре, оказалось хуже, чем остальных клеток. При использовании белка Cherry-JCL или Cherry-CT322 (Рис. 9Б, Г), окраска происходила более равномерно, что может свидетельствовать о лучшем проникновении ГФБ вглубь сфераха в силу меньшего размера таких белков (37 кДа) по сравнению с антителами (~150 кДа).

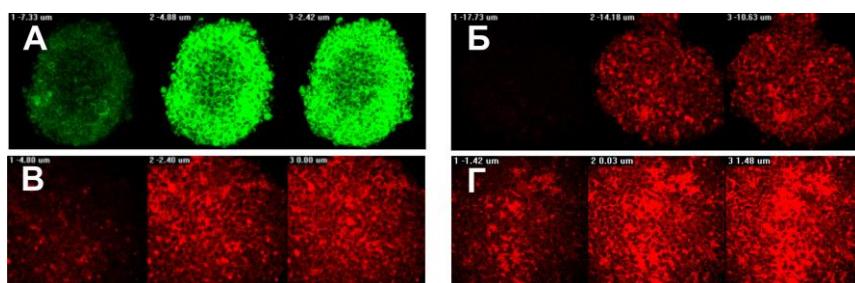


Рисунок 9. Анализ экспрессии $\alpha\beta\gamma$ -интегрина (А, Б) и VEGFR2 (В, Г) в 3D культурах клеточной линии Ea.hy926 методом конфокальной

микроскопии. Приведены послойные сканы 3D культур. А – антитела к $\alpha\beta\gamma$ -интегрину, меченные FITC; Б – Cherry-JCL; В - антитела к VEGFR2; Г – Cherry-CT322.

На поверхности клеток в 3D культурах хорошо выражены участки колокализации антител и ГФБ, что подтверждает окрашивание ими одних и тех же участков (Рис. 10).

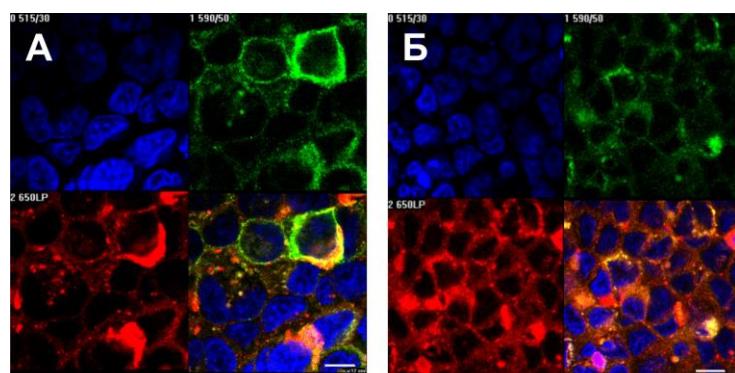


Рисунок 10. Анализ экспрессии $\alpha\beta\gamma$ -интегрина (А) и VEGFR2 (Б) в 3D культурах клеточной линии Ea.hy926 методом конфокальной микроскопии с использованием моноклональных антител (зеленый цвет) и белков Cherry-JCL (А) (красный цвет), Cherry-

CT322 (Б) (красный цвет). Ядра окрашены Hoechst 33342 (синий цвет). Изображения разложены по каналам. Длина мерного отрезка – 11-12 мкм.

Таким образом, 3D культуры, полученные на основе клеточной линии Ea.hy926, могут служить удобным инструментом для оценки связывающих свойств различных диагностических агентов, в частности ГФБ. Продемонстрировано эффективное взаимодействие ГФБ с белковыми мишениями на 3D культурах.

2.5. Анализ связывающей способности ГФБ на образцах ткани рака поджелудочной железы человека методом конфокальной микроскопии

Для дальнейшего исследования связывающих свойств ГФБ были получены клинические образцы от пациента с раком поджелудочной железы. Этот тип опухоли по литературным данным характеризуется повышенной экспрессией VEGFR2 на поверхности эндотелиальных клеток сосудов. В результате иммуногистохимического анализа образца ткани рака поджелудочной железы был выявлен участок, где проходил кровеносный сосуд. После обработки среза антителами к VEGFR2 и белком Cherry-CT322 было показано, что они связывают одни и те же участки на поверхности клеток эндотелия сосуда (Рис. 11А, Б).

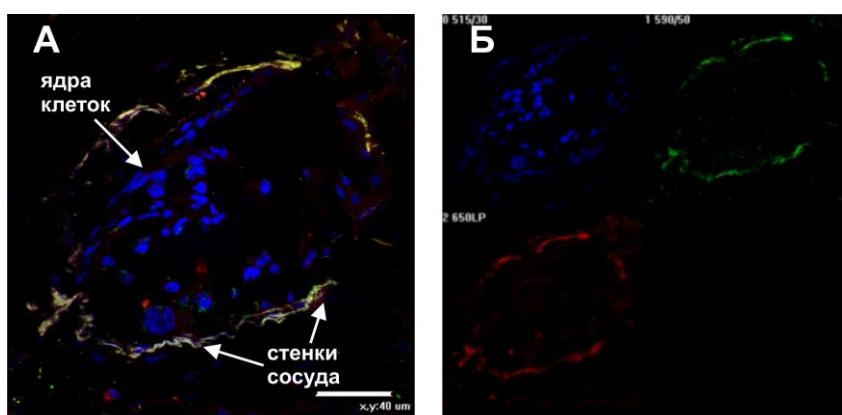


Рисунок 11. Анализ экспрессии VEGFR2 на образцах ткани рака поджелудочной железы методом конфокальной микроскопии. (А, Б) Антитела к VEGFR2, меченные FITC (зеленый цвет), Cherry-CT322 (красный цвет). Ядра окрашены Hoechst 33342 (синий цвет). (Б) То же изображение, разложенное по каналам. Длина мерного отрезка – 40 мкм.

Полученные нами гибридные флуоресцентные белки представляют собой новый перспективный тип диагностических реагентов и могут быть использованы для визуализации молекулярных маркеров воспаления и неоангиогенеза ($\alpha\beta_3$ -интегрина и VEGFR2).

3. Получение гибридных белков пролонгированного действия на основе альбумин-связывающего домена (ABD) и $\alpha\beta_3$ -интегрин-связывающего варианта $^{10}\text{Fn3}$

Одним из основных препятствий для терапевтического использования искусственных связывающих белков на основе АКБ является их короткий период полувыведения из организма. Продление времени циркуляции терапевтических белков может быть обеспечено за счет их слияния с альбумин-связывающим доменом (ABD) белка G стрептококков. На данном этапе исследования мы сконструировали 4 гибридных белка, состоящих из $\alpha\beta_3$ -связывающего белка 3JCLI4 (JCL) и ABD в разной ориентации, изучили их стабильность, связывающие свойства,

фармакокинетику и биораспределение в организме мышей.

3.1 Конструирование и экспрессия гибридных белков

Нами были сконструированы гены гибридных белков, состоящих из JCL, $\alpha\beta 3$ -интегрин-связывающего варианта $^{10}\text{Fn}3$, и ABD035 (ABD), альбумин-связывающего домена стрептококкового белка G с пониженной иммуногенностью. Гибриды отличались разной ориентаций белков-партнеров (Рис. 12А), между которыми были помещены глицил-сериновые линкеры различной длины для обеспечения независимого сворачивания (Рис. 12Б). Все варианты были экспрессированы в цитоплазме клеток *E. coli* и выделены из фракции растворимых белков с выходом 15-20 мг/л. В качестве контроля был получен рекомбинантный ABD в изолированном виде.

Анализ очищенных белков с помощью белкового электрофореза показал наличие одиночных полос с электрофоретической подвижностью, соответствующей расчетной молекулярной массе белков JCL (9 кДа), JCL-L₅-ABD (16,3 кДа), ABD-L₇-JCL (16,3 кДа), JCL-L₁₄-ABD (16,4 кДа) и ABD-L₁₅-JCL (17 кДа) (Рис. 12Б).

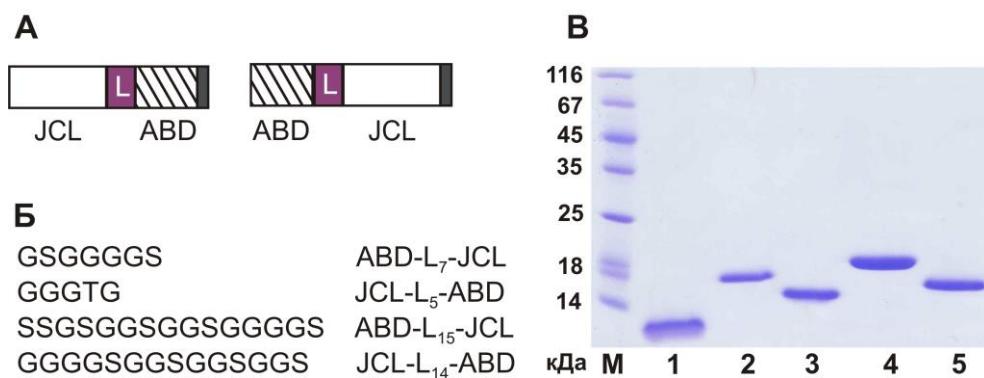


Рисунок 12. (А) Структурные схемы гибридных белков. JCL – 3JCL14, $\alpha\beta 3$ -интегрин-связывающий вариант $^{10}\text{Fn}3$; ABD - ABD035, альбумин-связывающий домен; L – линкер. Темно-серый прямоугольник обозначает С-концевой His₆. (Б) Аминокислотные последовательности линкеров в гибридных белках. (В) Электрофорез в 14% SDS-ПААГ по Лэммли очищенных гибридных белков JCL (дорожка 1), ABD-L₇-JCL (дорожка 2), JCL-L₅-ABD (дорожка 3), ABD-L₁₅-JCL (дорожка 4) и JCL-L₁₄-ABD (дорожка 5).

3.2. Изучение взаимодействия гибридных белков с альбумином

Чтобы оценить относительную аффинность взаимодействия очищенных гибридных белков с альбумином, мы провели иммуноферментный анализ методом ELISA с HSA, иммобилизованным на лунках. В качестве контроля использовали белки ABD и JCL. Формирование комплексов визуализировали с помощью антител к С-концевой гексагистидиновой последовательности (His₆), которая присутствовала во всех полученных белках. В результате проведенного анализа было обнаружено, что среди ABD-содержащих белков гибриды с более длинными линкерами (ABD-L₁₅-JCL и JCL-L₁₄-ABD) связывали HSA более эффективно (Рис. 13А), поэтому для последующих исследований мы выбрали гибридные белки ABD-L₁₅-JCL и JCL-L₁₄-ABD.

Образование комплексов между гибридными белками и HSA также было продемонстрировано с помощью Ni-аффинной хроматографии с последующим электрофорезом. Для этого на каждую колонку наносили один из исследуемых белков (JCL, ABD-L₁₅-JCL и JCL-L₁₄-ABD), содержащих С-концевой His-таг. После этого через колонку пропускали HSA, не содержащий His-тага, и проводили элюцию образовавшихся комплексов. Анализ элюатов с помощью белкового электрофореза показал, что оба гибридных белка формировали комплекс с HSA, что свидетельствует о том, что их взаимодействие было достаточно сильным, чтобы выдерживать несколько этапов отмывки (Рис. 13Б).

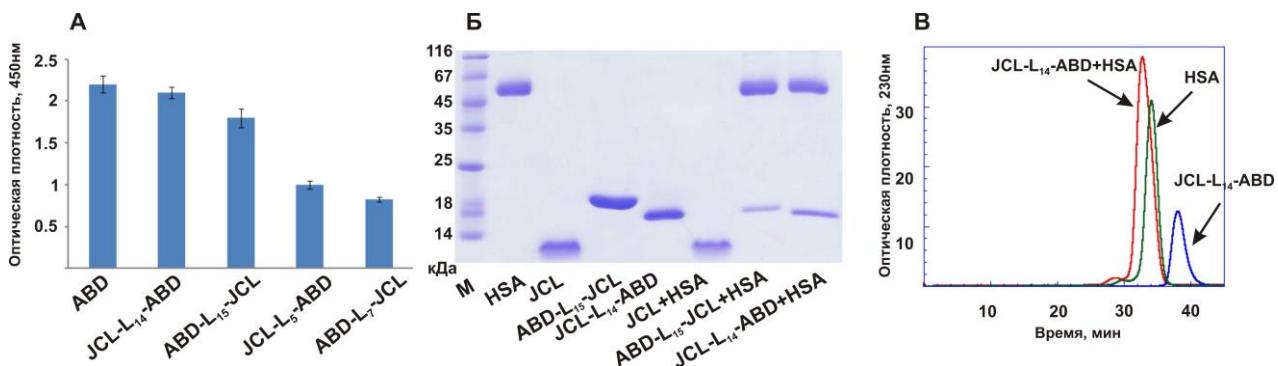


Рисунок 13. Исследование взаимодействия гибридных белков с HSA. (А) ELISA на плашках с иммобилизованным HSA и гибридными белками, добавленными в лунки в концентрации 50 нМ. Приведены средние результаты трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение. (Б) Электрофорез в SDS-ПААГ по Лэммли. (В) Гель-фильтрационный анализ белков HSA, JCL-L₁₄-ABD и их комплекса на колонке Superdex 200.

Формирование комплекса в растворе исследовали методом гель-фильтрационного анализа. Показано, что в результате совместной инкубации положения пиков JCL-L₁₄-ABD и HSA смешались в сторону пика с более высокой молекулярной массой (Рис. 13В). При инкубации JCL в качестве контроля с HSA видимого взаимодействия этих молекул не было обнаружено (данные не приведены).

3.3. Исследование связывания гибридных белков с $\alpha\beta 3$ -интегрином методом конфокальной микроскопии

Связывающую активность JCL-L₁₄-ABD и ABD-L₁₅-JCL по отношению к $\alpha\beta 3$ -интегрину оценивали с помощью конфокальной микроскопии (Рис. 14).

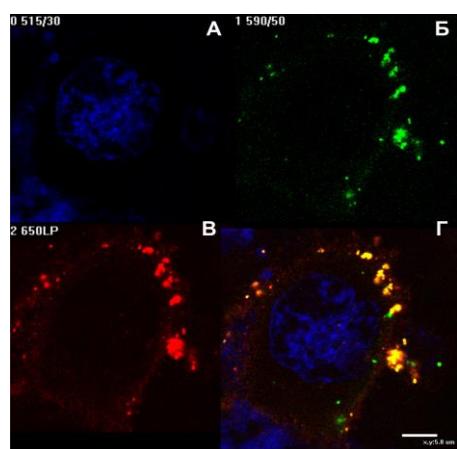


Рисунок 14. Анализ экспрессии $\alpha\beta 3$ -интегрина на поверхности клеток PANC-1 методом конфокальной микроскопии. Клетки инкубировали в присутствии антител к $\alpha\beta 3$ -интегрину (Б) и белка JCL-L₁₄-ABD (В). Связывание белка JCL-L₁₄-ABD с поверхностью клеток было визуализировано путем обработки клеток антителами к His₆, а затем антителами с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 555. Ядра окрашены Hoechst 33342 (синий цвет). (Г) Изображение с наложенными каналами. Длина мерного отрезка – 5,8 мкм.

После инкубации гибридных белков в течение 1 ч при 37°C с клетками PANC-1, которые экспрессируют $\alpha\beta3$ -интегрин, проводилось окрашивание образцов моноклональными антителами к His₆, с последующей визуализацией белков антителами IgG, меченными Alexa Fluor 555. Был проведен анализ колокализации JCL-L₁₄-ABD (Рис. 14В) и антител к $\alpha\beta3$ -интегрину (Рис. 14Б) на клеточной линии PANC-1. Коэффициент корреляции Пирсона (степень наложения одного цвета на другой) составил 0,995 ($p<0,001$) (Рис. 14Г).

3.4. Изучение термической стабильности гибридных белков

Для исследования термической стабильности полученных нами белков JCL и его гибридных аналогов JCL-L₁₄-ABD и ABD-L₁₅-JCL был использован метод измерения стационарной триптофановой флуоресценции. В предварительных экспериментах было показано, что спектры флуоресцентной эмиссии трех белков при комнатной температуре практически совпадают и определяются в основном излучением остатков триптофана (Рис. 15А). Установлено, что интенсивность флуоресценции JCL и JCL-L₁₄-ABD постепенно снижается вместе с повышением температуры до 85°C в результате уменьшения квантового выхода. В то же время, для ABD-L₁₅-JCL мы наблюдали характерный скачок интенсивности в интервале температур 42-55°C, что соответствует частичному переходу триптофановых остатков в более полярную среду. При дальнейшем повышении температуры вновь происходило падение интенсивности свечения, обусловленное уменьшением квантового выхода флуоресценции экспонированных остатков (Рис. 15Б). На основании полученных данных можно заключить, что термическая стабильность JCL-L₁₄-ABD сравнима с термической стабильностью JCL, тогда как ABD-L₁₅-JCL обладает пониженной стабильностью и претерпевает фазовый переход при температуре около 50°C.

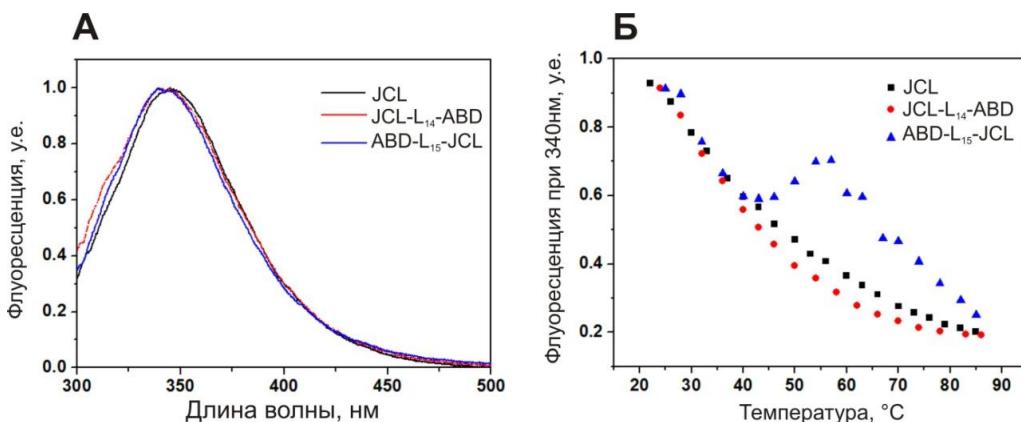


Рисунок 15. Спектры флуоресценции триптофана JCL, JCL-L₁₄-ABD, ABD-L₁₅-JCL в 50 мМ NaPi (рН=7,5), 150 мМ NaCl при 25°C (А) и температурная зависимость интенсивности флуоресценции этих образцов (Б).

3.5. Фармакокинетика и биораспределение гибридных белков

Фармакокинетические свойства гибридных белков анализировали с помощью измерений интенсивности флуоресценции образцов сыворотки, полученных через 1,5 и 5 ч после однократной инъекции Су5-меченых белков мышам линии C57BL/6. Результаты

продемонстрировали быстрое снижение через 1,5 ч количества JCL-L₁₄-ABD до 35%; ABD-L₁₅-JCL до 14%, а JCL до 2% от первоначально введенной дозы (Рис. 16). Однако в течение следующих 3,5 ч уменьшение количества JCL-L₁₄-ABD было менее значительным (с 35% до 32%, потеря 11%); более быстрое снижение было обнаружено для ABD-L₁₅-JCL (с 14% до 7,2%, потеря 47%). Период полувыведения для JCL-L₁₄-ABD составил 80-90 ч, а для ABD-L₁₅-JCL - 8 ч. Белок JCL почти полностью выводится из кровообращения уже в течение 1,5 ч (потеря 98%) с периодом полувыведения 5 минут.

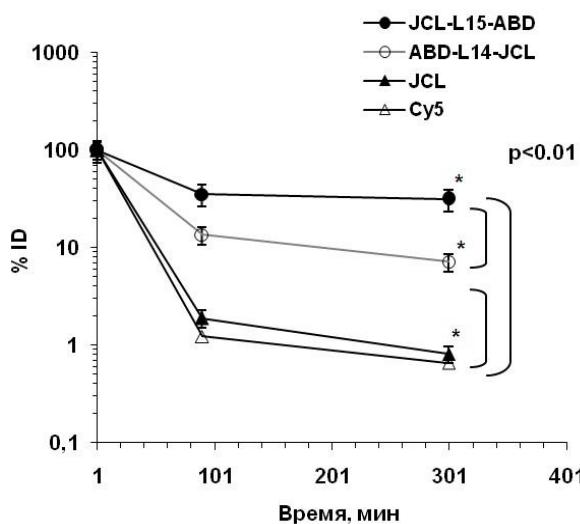


Рисунок 16. Анализ времени циркуляции гибридных белков в крови мышей. Су5-меченные JCL, ABD-L₁₅-JCL, JCL-L₁₄-ABD и метку Су5 внутривенно вводили мышам, кровь собирали через 1,5 и 5 часов. Данные приведены в процентах от введенной дозы (% ID). Приведены средние результаты трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение. * отмечены статистически значимые отличия.

Биораспределение белков исследовали в крови, моче, мышце бедра, селезенке, поджелудочной железе, почках, брюшном жире, кишечнике, желчи, печени, сердце, легких и в мозге (Рис. 17).

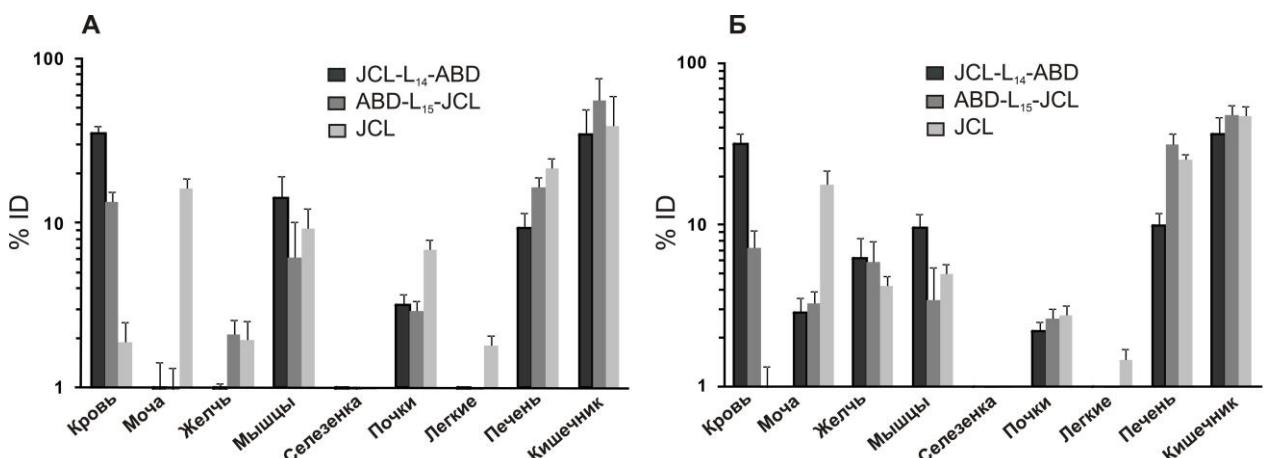


Рисунок 17. Биораспределение гибридных белков. Мышам вводили единичную дозу Су5-меченных белков и умерщвляли через 1,5 (А) и 5 (Б) ч после инъекции. Органы гомогенизировали, и сигналы Су5 анализировали в очищенных супернатантах. Результаты показаны в процентах от введенной дозы (% ID). Данные приведены для образцов, содержащих $\geq 1\%$ от % ID. Приведены средние результаты трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение.

Флуоресцентные сигналы измеряли в очищенных лизатах тканей или в разбавленных жидкостях организма. Аналогичные образцы тканей от наивных мышей использовали в качестве

контроля для оценки аутофлуоресценции. Сигнал в образцах жира, сердца и мозга мышей после введения флуоресцентных белков оказался на уровне аутофлуоресценции, следовательно, эти ткани/органы не поглощали гибридные белки ABD-L₁₅-JCL и JCL-L₁₄-ABD, поэтому соответствующие данные не приведены.

Результаты исследований биораспределения представлены в процентах от начальной введенной дозы (% ID), рассчитанной с использованием стандартных кривых титрования (Рис. 17А, Б). Количество белка JCL-L₁₄-ABD было значительно выше в крови и мышцах и ниже во всех других органах, за исключением кишечника. Сигнал в мышцах, вероятно, является результатом наличия остаточной крови в капиллярах, так как перфузия удаляет кровь из основных органов, но не из капилляров. Высокий уровень сигнала в кишечнике (36-52%), вероятно, был результатом выведения белка через печень. Данный вывод подтверждает высокая концентрация белков в желчи. Белки JCL-L₁₄-ABD и ABD-L₁₅-JCL в меньшей мере выводились с мочой, чем JCL, что является результатом их более высокой молекулярной массы и наличия альбумин-связывающей активности. Количество поглощенного материала в селезенке составляло менее 1%. Незначительное количество JCL было обнаружено в легких, но гибридов там не было обнаружено. Биораспределение со временем существенно не изменилось. Коэффициент корреляции Пирсона r между 1,5 и 5 часами составил 0,950 (p<0,0001).

Таким образом, на данном этапе работы мы сконструировали новые гибридные белки, состоящие из $\alpha\beta\gamma$ -интегрин-связывающего варианта ¹⁰Fn3 и HSA-связывающего домена, ABD035. Фармакокинетические исследования показали, что JCL-L₁₄-ABD циркулирует в крови у мышей примерно в 10 раз дольше, чем ABD-L₁₅-JCL, и в 960 раз дольше, чем JCL. Эффект продолжительной циркуляции JCL-L₁₄-ABD, по-видимому, был следствием более низкого поглощения печенью и почками. Полученные результаты могут быть объяснены связыванием JCL-L₁₄-ABD с альбумином и последующей рециркуляцией посредством взаимодействия с рецептором Fc-фрагмента IgG (FcRn).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Конструирование аналогов антител на основе альтернативных каркасных белков представляет собой перспективную стратегию создания новых лекарственных и биотехнологических препаратов. Для получения искусственных связывающих белков, обладающих необходимыми функциональными характеристиками – высокой аффинностью, стабильностью и растворимостью – необходимо использование соответствующей системы селекции. С целью создания новых вариантов каркасного белка 10-го домена фибронектина человека III типа (¹⁰Fn3), связывающих ФНО, сконструирована и оптимизирована новая система клеточного дисплея на основе аутотранспортера AT877 *P. cryohalolentis* K5^T, содержащего холодаактивную эстеразу EstPc на N-конце гибридного пассажирского домена. С использованием полученной системы произведена селекция комбинаторной библиотеки генов вариантов ¹⁰Fn3 и клонирован ряд генов новых ФНО-связывающих белков на основе ¹⁰Fn3. В результате экспрессии

генов отобранных вариантов в клетках *Escherichia coli* и скрининга ФНО-связывающей активности выявлены белки, обладающие наиболее высокой аффинностью, и изучены их свойства.

С целью получения эффективных агентов для молекулярной визуализации сконструирован новый тип гибридных молекул, состоящих из красного флуоресцентного белка mCherry и $^{10}\text{Fn3}$. Получены гибриды с разным расположением генов, кодирующих белки-партнеры, и изучена их экспрессия в клетках *E. coli*. Установлено, что расположение mCherry на N-конце гибридного белка и предложенная нами модификация его N-концевой аминокислотной последовательности способствуют увеличению выхода продукта экспрессии в растворимой форме. На основе предложенной конструкции получены гибридные флуоресцентные белки Cherry-JCL и Cherry-CT322, содержащие $\alpha\text{v}\beta3$ -интегрин- и VEGFR2-связывающие варианты $^{10}\text{Fn3}$, соответственно. Продемонстрирована возможность их использования для визуализации $\alpha\text{v}\beta3$ -интегрина и VEGFR2 на поверхности разных клеточных линий и на образце ткани рака поджелудочной железы методом конфокальной микроскопии.

Для увеличения времени циркуляции искусственных связывающих белков на основе $^{10}\text{Fn3}$ в организме сконструированы гибриды $\alpha\text{v}\beta3$ -интегрин-связывающего белка (JCL) с альбумин-связывающим доменом (ABD) стрептококкового белка G, обладающие различной ориентацией белков-партнеров и длиной линкера. Продемонстрировано, что гибриды с более длинными линкерами связывают HSA более эффективно. При этом белок с С-концевым расположением ABD обладает более высокой термической стабильностью и циркулирует в крови мышей примерно в 10 раз дольше, чем белок с противоположной ориентацией, и в 960 раз дольше, чем JCL. Полученные результаты демонстрируют перспективность использования гибридов с ABD для увеличения времени жизни связывающих белков на основе $^{10}\text{Fn3}$ и других каркасных белков с небольшой молекулярной массой.

Таким образом, полученные и исследованные нами гибридные белки на основе 10 домена фибронектина III типа, обеспечивающие связывание с целевыми лигандами (ФНО, $\alpha\text{v}\beta3$ -интегрином и VEGFR2), обладают новыми функциональными свойствами и могут быть потенциально использованы для диагностики и терапии хронических воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Сконструирована и оптимизирована новая система бактериального дисплея вариантов $^{10}\text{Fn3}$ на основе гибридного аутотранспортера AT877 *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T. Установлено, что расположение холодаактивной эстеразы EstPc на N-конце пассажирского домена обеспечивает существенное повышение уровня экспонирования $^{10}\text{Fn3}$ по сравнению с другими конструкциями.
2. Получена комбинаторная библиотека генов вариантов $^{10}\text{Fn3}$ и проведен отбор ФНО-связывающих белков на основе $^{10}\text{Fn3}$ с помощью бактериального дисплея. Получен вариант Fn52 с $K_d = 35 \pm 7 \text{nM}$.

3. Сконструированы гибридные флуоресцентные белки Cherry-JCL и Cherry-CT322, которые обладают флуоресценцией в красной области спектра, взаимодействуют с $\alpha\beta\gamma$ -интегрином и VEGFR2, соответственно, на поверхности клеток и могут быть использованы для визуализации молекулярных маркеров воспаления и неоангиогенеза.
4. Сконструированы гибриды $\alpha\beta\gamma$ -интегрин-связывающего варианта $^{10}\text{Fn3}$ и альбумин-связывающего домена (ABD) с различным расположением белков-партнеров и длиной соединяющего их линкера. Показано, что белок JCL-L₁₄-ABD обладает высокой стабильностью и эффективно связывает $\alpha\beta\gamma$ -интегрин и HSA.
5. Исследованы фармакокинетика и биораспределение гибридных белков пролонгированного действия в организме мышей. Показано, что белок JCL-L₁₄-ABD циркулирует в крови у мышей примерно в 10 раз дольше, чем ABD-L₁₅-JCL, и в 960 раз дольше, чем JCL.

Научные статьи по теме диссертации, опубликованные в журналах WOS, SCOPUS, RSCI:

1. S.Sh. Gapizov, L.E. Petrovskaya, L.N. Shingarova, E.A. Kryukova, E.F. Boldyreva1, E.P. Lukashev, S.A. Yakimov, E.V. Svirschevskaya, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov. Fusion with albumin-binding domain improves pharmacokinetics of $\alpha\beta\gamma$ -integrin binding fibronectin scaffold protein // Biotechnology and Applied Biochemistry. 2019. DOI: 10.1002/bab.1762. **IF=1,559.**
2. Petrovskaya L.E., Zlobinov A.V., Shingarova L.N., Boldyreva E.F., Gapizov S.Sh., Novototskaya-Vlasova K.A., Rivkina E.M., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. Fusion with the cold-active esterase facilitates autotransporter-based surface display of the 10th human fibronectin domain in Escherichia coli // Extremophiles. 2018. Т. 22, № 1. С. 141-150. **IF=2,0.**
3. Шингарова Л.Н., Петровская Л.Е., Злобинов А.В., Гапизов С.Ш., Крюкова Е.А.1, Бирих К.Р., Болдырева Е.Ф., Якимов С.А., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Конструирование искусственных ФНО-связывающих белков на основе 10-го домена фибронектина III типа с помощью бактериального дисплея // Биохимия (Москва). 2018. Т. 83, № 6. С. 903-914. **IF=1,724.**
4. C. III. Гапизов, Л. Е. Петровская, Л. Н. Шингарова, Е. В. Свирщевская, Д. А. Долгих, М. П. Кирпичников. Влияние TNF и VEGF на свойства эндотелиальных клеток Ea.hy926 в модели многоклеточных сфероидов // Acta Naturae. 2018. Т. 10, № 1. С. 36. **IF=2,0.**
5. Petrovskaya L.E., Novototskaya-Vlasova K.A., Gapizov S.Sh., Spirina E.V., Durdenko E.V., Rivkina E.M. New member of the hormone-sensitive lipase family from the permafrost microbial community // Bioengineered. 2017. Т. 8, № 4. С. 420-423. **IF=1,639.**
6. Петровская Л.Е., Гапизов С.Ш., Шингарова Л.Н., Крюкова Е.А., Болдырева Е.Ф., Якимов С.А., Свирщевская Е.В., Лукашев Е.П., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Гибридные флуоресцентные белки на основе 10го домена фибронектина человека // Биоорганическая химия. 2014. Т. 40. № 4. С. 405-413. **IF=0,838.**

Другие научные работы, опубликованные по теме диссертации

1. Патент на изобретение № 2527171 от 7.07.2014г. Рекомбинантные плазмидные ДНК, кодирующие гибридные полипептиды со свойствами красного флуоресцентного белка mCherry, для продуцирования гибридных флуоресцентных белков в *Escherichia coli*. Петровская Л.Е., Шингарова Л.Н., **Гапизов С.Ш.**, Крюкова Е.А., Болдырева Е.Ф., Якимов С.А., Долгих Д.А., Кирпичников М.П.
2. **Гапизов С.Ш.**, Петровская Л.Е., Долгих Д.А. Гибридные флуоресцентные белки для молекулярной диагностики. Сборник тезисов Осеннего финала «У.М.Н.И.К.» РАН 2014. Москва, октябрь 2014 г. С. 13.
3. **Гапизов С.Ш.**, Петровская Л.Е., Шингарова Л.Н., Свирщевская Е.В., Долгих Д.А. Исследование противовоспалительной активности антагонистов TNF с использованием клеточной линии Ea.hy926. Сборник тезисов XXVIII Зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Москва, 8-11 февраля 2016 г. С. 165.
4. **Gapizov S.**, Shingarova L., Svirshchevskaya E., Petrovskaya L. Expression of inflammation and neoangiogenesis markers in two- and three-dimensional cultures of the Ea.hy926 endothelium-derived cell line. 41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better Life, Ephesus/Kuşadası, Turkey, September 3-8, 2016. The FEBS Journal, volume 283, Supplement 1, 2016. P. 353.
5. **Гапизов С.Ш.**, Петровская Л.Е., Шингарова Л.Н., Свирщевская Е.В., Долгих Д.А. Экспрессия маркеров воспаления и неоангиогенеза 2D и 3D культурами клеток клеточной линии Ea.hy926. Научные труды V съезда биохимиков России. Сочи – Дагомыс, Россия, 4–8 октября 2016. Acta Naturaе, спецвыпуск, том 2, 2016, с. 151.
6. **Гапизов С.Ш.**, Петровская Л.Е., Шингарова Л.Н., Крюкова Е.А., Якимов С.А., Свирщевская Е.В., Долгих Д.А. Гибридные белки пролонгированного действия для подавления воспаления и неоангиогенеза. Научные труды объединённого научного форума (Международная научная конференция по биоорганической химии, «XII чтения памяти академика Ю. А. Овчинникова», VIII российский симпозиум «Белки и Пептиды»). 2017. Acta Naturaе, спецвыпуск, 2017. С. 91.
7. Petrovskaya L.E., **Gapizov S.Sh.**, Shingarova L.N., Kryukova E.A., Svirshchevskaya E.V., Dolgikh D.A. Antibody mimetics based on alternative scaffold proteins. International Forum, Biotechnology: current state and future development. Life Sciences. 2018. Moscow, Russia. Collection of abstracts. P. 500-501.