

Реферат циклу робіт

«Розробка аналітичних біотехнологій для потреб імунологічної діагностики»

на здобуття щорічних премій Президента України

для молодих вчених 2020 р.

Автори: Галкін О.Ю., Луценко Т.М., Криніна О.І.

Актуальність роботи. Серед всього комплексу методів клінічної лабораторної діагностики одними з перших були запропоновані та впроваджені у практичну медицину методи серологічної діагностики, які залишаються вкрай актуальними й на сьогодні. Серологічні методи, зокрема імуноферментний аналіз, застосовують для діагностики як інфекційних (бактерійних, вірусних, грибкових, паразитарних), так і неінфекційних (онкологічних, ендокринних, алергічних) захворювань. У другій половині ХХ століття сформувалася ціла галузь науково-виробничої діяльності, що займається розробкою та виготовленням засобів для клінічної лабораторної діагностики. Відповідні науково-технічні розробки є предметом біотехнології. Розробка засобів серологічної діагностики є предметом імунобіотехнології.

З біотехнологічних позицій вихідною точкою для будь-якого серологічного методу є імунна відповідь. А відтак однією із найважливіших фундаментальних основ створення засобів для серологічної діагностики є розуміння закономірностей імунної відповіді на той чи інший антиген. Зважаючи на дану обставину, особливого значення набуває інформація про антигенну будову різних білків та речовин іншого хімічного складу, що можуть мати діагностичне значення. Відповідні фундаментальні та прикладні дослідження зазвичай передують розробкам засобів для серологічної діагностики. Важливим інструментом у розробці діагностичних препаратів є власне носії імунної відповіді – імуноглобуліни. Гібридомна технологія вже четверте десятиліття залишається однією з найбільш використовуваних біотехнологій. Із появою генетичної інженерії з'явилася унікальна

можливість цілеспрямованого конструювання молекулярних генетичних систем та отримання рекомбінантних білків, у т.ч. діагностичного призначення. Без використання рекомбінантних білків-антигенів різного походження не можливо уявити сучасну серологічну діагностику.

Біомолекули, використовувані у серологічних тестах (антитіла, антигени тощо), не завжди «працюють» у вільному вигляді – часто виникає потреба у з'єднанні таких біомолекул одна з одною або ж з речовинами хімічного походження, зокрема для створення можливості детекції результатів аналізу. Для вирішення такого роду задач використовують широкий арсенал методів біоорганічної хімії – отримують кон'югати біомолекул різного якісного та кількісного складу. Розробка нових та удосконалення вже існуючих методів кон'югації біомолекул являє собою актуальну задачу біотехнології.

Слід зазначити, що фундаментальні досягнення у галузі біології, хімії та фізики відкривають нові можливості для створення нових та удосконалення вже існуючих діагностичних препаратів. Вкрай актуальним залишається питання покращення техніко-економічних показників такого роду технологій, оскільки продукти біотехнології зазвичай залишаються високовартісними, що, у свою чергу, зменшує їх соціальну доступність.

Набори для проведення серологічної діагностики являють собою специфічний вид продукції, який відноситься до класу виробів медичного призначення. Задача, яка вирішується такого роду медичними виробами, є вкрай відповідальною, адже від правильності результату лабораторного дослідження залежить здоров'я та життя пацієнта. Саме тому на сучасному етапі особливу увагу приділяють питанням якості медичних виробів для діагностики *in vitro*, що, у свою чергу, пов'язано із питаннями стандартизації та технічного регулювання. За часи існування незалежної України відбувся серйозний шлях трансформації науково-дослідної діяльності та виготовлення медичних виробів для діагностики *in vitro* із усвідомленням необхідності запровадження технічного регулювання цієї галузі на принципах, що їх

сформовано у Європейському Союзі. Важлива актуальна задача сучасного етапу розвитку нашої держави – формування ґрунтовної науково-методичної бази для ефективного технічного регулювання процесів розробки, випробування, виготовлення та оцінки відповідності (сертифікації) медичних виробів.

Таким чином, розробка біотехнологій створення високоінформативних засобів для серологічної діагностики (у т.ч. на основі імуноферментного аналізу) та їх біоаналітична стандартизація є вкрай актуальними та пріоритетними завданнями сучасної аналітичної та медичної біотехнології.

У роботі вирішено актуальне науково-технічне завдання – проведено наукове обґрунтування біотехнології створення високоінформативних засобів для серологічної діагностики (на прикладі імуноферментного аналізу), а також параметрів біоаналітичної стандартизації і валідації відповідних діагностичних препаратів.

Структура роботи. Роботи проводилися у 3-х етапів, в рамках яких проводили вирішення актуальних задач біологічного, медико-біологічного та технічного характеру.

I етап – Встановлення молекулярно-біологічних та біохімічних особливостей отримання біологічних компонентів (моноклональних антитіл та рекомбінантних білків) для конструювання високоінформативних засобів імуноферментної діагностики. В рамках даного етапу було отримано такі результати:

- Одержано високоочищені препарати IgE людини та Fc-фрагменти IgG-, IgA-антитіл, придатні для використання як антигени при тестуванні гібридом-продуцентів моноклональних антитіл (МАТ). Одержано панелі гібридом-продуцентів МАТ до IgG, IgA, IgM, IgE людини, а також проведено їх комплексну характеристику (активність, специфічність, афінність, титр, ізотип та порівняльне епітопне картування) з метою визначення найбільш перспективних МАТ для розробки імунохімічних методик.

- Розроблено біотехнологію отримання рекомбінантного білка теплового шоку (HSP-60) *Chlamydia trachomatis*, придатного для використання у високочутливих та специфічних методах імуноаналізу, та досліджено можливість підвищення ефективності його біосинтезу шляхом оптимізації поживного середовища за рахунок добавок рослинної та вітамінної природи.

- Вивчено закономірності гуморальної імунної відповіді мишей різних інбредних ліній на фермент пероксидазу хрому (HRP) та сформувано рекомендації щодо схем імунізації для отримання анти-HRP МАТ. Отримано панель МАТ до HRP та вивчено їх біологічні властивості (активність, специфічність, афінність, титр, ізотип та порівняльне епітопне картування).

- Отримано панель МАТ до основного білку зовнішньої мембрани *Ch. trachomatis* (MOMP) та вивчено їх біологічні властивості (активність, специфічність, афінність, титр, ізотип та абсолютне епітопне картування).

- Проведено прогнозування Т-епітопів протеїнів *Mycobacterium tuberculosis in silico* для визначення їх антигенності для населення Східної Європи. Ідентифіковані антигени та їх комбінації є перспективними кандидатами для створення новітніх діагностикумів з метою визначення стану захищеності популяції.

- Розроблено клітинну модель для дослідження рецепторної та регуляторної функцій трансмембранної форми гепарин-зв'язувального фактору росту, що подібний до епідермального фактору росту (proHB-EGF), а також досліджено цитостатичну дію рекомбінантних фрагментів нетоксичного точкового мутанту дифтерійного токсину (ДТ) – CRM197. Отримані дані є інструментом для покращення імунологічної діагностики дифтерії.

II етап – Конструювання та вивчення показників інформативності засобів імуноферментної діагностики. В рамках даного етапу було отримано такі результати:

- Розроблено високочутливі ІФА для кількісного визначення загальних IgE та IgM людини, виявлення специфічних IgE-антитіл, а також оцінено можливість підвищення інформативності аналізу за рахунок застосування аналіт-опосередкованої фермент-активуючої системи ампліфікації сигналу для різних варіантів ІФА та удосконалення методів синтезу біокон'югатів різного складу.

- Проведено порівняльну характеристику сорбентів різної природи як основу для синтезу імуноафінних колонок; розроблено метод імуноафінного виділення і очистки IgE та IgM людини із біологічних рідин.

- Розроблено та охарактеризовано ІФА для виявлення антитіл класів IgG та IgA до *Ch. trachomatis* на основі отриманих анти-IgG та анти-IgA МАТ, а також rHSP-60 *Ch. trachomatis*.

- Порівняльно оцінено різні методи біокон'югації антитіл із антитілами з метою отримання гібридних позитивних контролів ІФА модифікації IgM-«пастка» (на основі анти-HRP МАТ) та непрямого ІФА для визначення IgM та IgA антитіл до *Ch. trachomatis* (на основі анти-МОМР МАТ).

III етап – Формування науково-методичних рекомендації щодо стандартизації засобів імуноферментної діагностики, а також оцінки їх відповідності. В рамках даного етапу було отримано такі результати:

- На основі аналізу національних та міжнародних нормативно-технічних документів щодо якості та безпечності медичних виробів для *in vitro* діагностики обґрунтовано параметри стандартизації та валідаційні характеристики для ІФА різних типів.

- Обґрунтовано методику валідації засобів для імуноферментної діагностики (на прикладі розроблених ІФА для кількісного визначення загального IgE людини та ІФА для якісного (напівкількісного) виявлення антитіл класів IgG та IgA до *Ch. trachomatis*).

Наукова новизна. Одержано оригінальні набори гібридом-продуцентів високоактивних та специфічних МАТ до IgA людини (20 клонів), IgG людини (12 клонів), IgE людини (12 клонів), IgM людини (21 клон), ферменту пероксидази хрону (15 клонів), основного білку зовнішньої мембрани *Ch. trachomatis* (9 клонів), придатні для використання у високочутливим методах імуноаналізу.

Вперше представлена епітопна структура молекул IgA, IgM, IgG і IgE людини з точки зору імунодомінантності та наявності обмеженої кількості висококонсервативних епітопних регіонів (EP).

Вперше у сироватках крові осіб, що інфіковані збудником уrogenітального хламідіозу, виявлено специфічні IgE антитіла, а також антиідіотипові антитіла, які володіють анти-HSP-60 *Ch. trachomatis* активністю та є однією з причин хибнонегативних результатів відповідних тестів на основі ІФА.

Вперше було встановлено закономірності гуморальної імунної відповіді мишей ліній Balb/c та NZB на фермент пероксидазу хрону (HRP) залежно від шляху введення імуногену, його дози та тривалості імунізації. Доведено, що внутрішньочеревне введення забезпечує утворення вищих титрів специфічних антитіл для обох досліджуваних ліній мишей. Показано, що миші ліній NZB більш інтенсивно відповідають на HRP, ніж миші лінії Balb/c (для всіх досліджених схем імунізації). Науково обґрунтована найбільш ефективна схема імунізації, яка передбачає трьохкратне внутрішньочеревне введення 25 мкг HRP упродовж 10 тижнів (перше введення – із ПАФ, решта – із НАФ) та бустер-введення імуногену внутрішньовенно у фізіологічному розчині.

Вперше представлена епітопна структура молекул HRP з точки зору імунодомінантності та наявності обмеженої кількості висококонсервативних епітопних регіонів (EP). Анти-HRP МАТ спрямовані до 5 EP: 3 з них представлені антигенними детермінантами білкового походження та 2 мають вуглеводну природу. Два з EP, що спрямовані до поліпептидного ланцюга

(П1 і П2), мають близьку просторову локалізацію та значно більш віддалені від третього ЕР аналогічної специфічності (П3). Кожен з двох ЕР, що спрямовані до вуглеводних залишків (П4 і П5), представлений двома епітопами. Антигенна детермінанта П3, що сформована поліпептидним ланцюгом, має близьку просторову локалізацію із ЕР-П5 на вуглеводній частині ферменту.

Для трьох найбільш афінних МАТ до МOMP *Ch. trachomatis* проведено визначення абсолютної епітопної специфічності із використанням технології фагового дисплею. Антигенні детермінанти двох МАТ 293F4 та 291F8, що активно конкурували із поліклональними антитілами сироватки, представлені двома лінійними послідовностями 320-325 а.з. та 326-330 а.з., відповідно (дана ділянка у нативній молекулі МOMP знаходиться над плазматичною мембраною та бере участь у формуванні петлі L7). Епітоп, з яким взаємодіє МАТ 296G2, представлений лінійною послідовністю 347-352 а.з., яка у нативній молекулі МOMP знаходиться як у периплазматичному, так й у трансмембранному просторі (МАТ 296G2 не проявляє активної конкуренції із антитілами сироватки).

У циклі робіт щодо молекулярних механізмів розвитку захворювань викликаних *Mycobacterium tuberculosis* та *Corynebacterium diphtheria* відображені нові дані стосовно взаємозв'язку структурної організації та особливостей прояву антигенних і цитостатичних властивостей рекомбінантними похідними відповідних антигенів.

Вперше в Україні проведено наукове обґрунтування параметрів стандартизації та валідаційних характеристик засобів для серологічної діагностики, а також сформовано науково-методичні рекомендації щодо валідації різних типів ІФА.

Практичне значення та впровадження роботи. На основі біохімічних та фізико-хімічних методів розроблено удосконалені методики одержання ІgЕ та ІgМ людини, Fc-фрагментів ІgG та ІgА людини високого ступеню

чистоти, придатні для використання як антигенів при тестуванні гібридом-продуцентів МАТ й біореагентів у високочутливих методах імуноаналізу.

Розроблено оптимізовану технологію біосинтезу, виділення та очистки рекомбінантного білка теплового шоку HSP-60 *Ch. trachomatis* із високою імунологічною активністю у ІФА.

На основі отриманих імуносорбентів, імуноферментних кон'югатів МАТ, рекомбінантного білка було розроблено низку імуноферментних наборів: для кількісного визначення загального IgE людини, для виявлення специфічних IgE-антитіл до *Ch. trachomatis* та алергену пилюки берези *Betula verrucosa* профіліну, для виявлення антитіл класів IgG та IgA до білків MOMP, Pgp3 *Ch. trachomatis* й антитіл класу IgG до HSP-60 *Ch. Trachomatis* тощо. На прикладі ІФА для визначення загального IgE людини та ІФА для виявлення специфічних IgE-антитіл показано можливість та доцільність застосування аналіт-опосередкованої фермент-активуючої системи ампліфікації сигналу. Використання отриманих біокомпонентів дозволило підвищити діагностичні характеристики аналізу.

На основі оптимізації макрокінетичних та фізико-хімічних умов розроблено удосконалені методики синтезу кон'югатів «білок-білок» та «білок-гаптен» для високочутливих методів імуноаналізу

Розроблено добре відтворювану і просту у виконанні методику специфічного виділення IgE людини із використанням імуноафінного сорбенту на основі тетраетоксисилану та сефарози й отриманих анти-IgE МАТ, а також розроблено методику імуноафінного виділення IgM людини.

На основі отриманих анти-HRP, анти-MOMP МАТ, а також очищених препаратів нормальних імуноглобулінів синтезовано високоактивні синтетичні (гібридні) позитивні контролю для ІФА-наборів, що побудовані за принципом IgM-«пастки», а також призначені для виявлення IgM та IgA антитіл до збудника уrogenітального хламідіозу.

Проведена валідація ІФА для кількісного та якісного (напівкількісного) визначення біоаналітів може стати основою для

здійснення валідаційних процедур інших за призначенням методів серологічної діагностики.

З використанням одержаних МАТ, їх кон'югатів та імуносорбентів можуть бути розроблені ІФА-набори для визначення антитіл класів IgG, IgA та IgE до збудників інших інфекційних захворювань та/або алергенів.

Результати роботи впроваджено у процес розробки та виробництва ІФА-наборів у ТОВ «Хема» (м. Київ), а також рекомбінантних білків у ТОВ «УА «Про-фарма» (м. Київ). Науково-методичні рекомендації щодо стандартизації та валідації засобів для серологічної діагностики використовуються у ДП «Український медичний центр сертифікації» МОЗ України (м. Київ) при проведенні оцінки відповідності згідно з Технічним регламентом щодо медичних виробів для діагностики *in vitro*, затвердженим постановою Кабінету Міністрів України від 2 жовтня 2013 р. № 754.

Публікації та наукометричні показники. За результатами проведених робіт опубліковано **82 праці, серед яких 1 монографія, 38 наукових статей (зокрема 8 – у міжнародних наукових виданнях), 24 тез доповідей, 16 патентів України на корисні моделі (деклараційних патентів), 3 навчально-методичні розробки.**

Загальна кількість посилань на публікації авторського колективу, що висуваються на здобуття премії (згідно Google Scholar): 51.

Загальний індекс цитувань авторів роботи:

Галкін О.Ю.: h-індекс (Scopus) = 3, h-індекс (Google Scholar) = 6;

Луценко Т.М.: h-індекс (Scopus) = 2, h-індекс (Google Scholar) = 3;

Криніна О.І.: h-індекс (Scopus) = 1, h-індекс (Google Scholar) = 1.

Автори: _____ Галкін О.Ю.

_____ Луценко Т.М.

_____ Криніна О.І.