

АНОТАЦІЯ

Мотроненко В.В. Біотехнологія субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.–Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 16 Хімічна та біоінженерія за спеціальністю 162 Біотехнології та біоінженерія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України. Київ, 2020.

Робота виконана на кафедрі промислової біотехнології та кафедрі трансляційної медичної біоінженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського.

Зараз спостерігається стрімкий прогрес усіх галузей науки та промисловості, що застосовують високі технології та, в першу чергу, біотехнології. Одним з напрямів сучасної біотехнології є імунобіотехнологія, яка формувалася в останні два десятиріччя і має на меті цілеспрямований біосинтез нових біологічно активних препаратів та фармацевтичних продуктів, до яких належать моноклональні антитіла, вакцини, сироватки, цитокіни, діагностичні засоби, імуномодулятори та пробіотики.

Інтерлейкін-7 людини (ІЛ-7) – лімфопоетичний фактор росту, який займає особливе положення серед інших цитокінів через його унікальну функцію в гематопоезі, що не дублюється іншими факторами. Відсутність функціонального ІЛ-7 може бути однією з причин важкого комбінованого імунодефіциту. Результатом відсутності функціонального ІЛ-7 в організмі є лімфопенія та, як наслідок, важкий імунодефіцит. При збільшенні кількості ІЛ-7 рівень В- і Т-лімфоцитів в крові підвищується. ІЛ-7 бере участь у формуванні лімфовузлів. Основними продуцентами ІЛ-7 є стромальні клітини кісткового мозку та тимуса, а також деякі інші клітини організму людини.

Наявні дані свідчать про можливість використання ІЛ-7 в комплексній терапії при лікуванні вірусних та бактеріальних інфекцій. ІЛ-7 розглядається й як засіб для лікування низки онкологічних захворювань (зокрема, таких як гліома, меланома, гліобластома, рак передміхурової залози). Біологічний потенціал ІЛ-7 дозволяє вважати, що його використання може стимулювати

імунітет у пацієнтів з лімфоцитарним виснаженням (у т.ч. на тлі хронічних інфекційних захворюваннях), аутоімунними захворюваннями тощо.

Зважаючи на сучасні досягнення молекулярної біології та біотехнології у галузі отримання білків медичного призначення найбільш перспективним видається підхід до отримання ІЛ-7 на основі рекомбінантного продуцента. Оптимізація процесів біосинтезу рекомбінантних продуктів медичного призначення є актуальною задачею біотехнології, особливо з позицій техніко-економічних показників, оскільки вихід цільових продуктів, особливо при застосуванні багатоетапних складних процедур виділення та очистки білків, впливає на вартість отримуваних медичних препаратів та, відповідно, на їх соціальну доступність. Один із напрямків підвищення виходу рекомбінантних продуктів у бактеріальних системах біосинтезу адресований до оптимізації складу живильних середовищ. Особлива увага при розробці сучасних технологій отримання рекомбінантних білків приділяється удосконаленню способів виділення та очистки цільового продукту.

Мета роботи – наукове обґрунтування біотехнології отримання субстанції рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини.

Для досягнення поставленої мети були поставлені наступні *задачі*.

1. Оптимізувати кількісний та якісний склад живильного середовища для біосинтезу рІЛ-7 бактеріями *Escherichia coli*.

2. Дослідити можливість підвищення біосинтетичної активності мікробного продуцента рІЛ-7 за рахунок додавання до живильного середовища рослинних екстрактів та вітамінів, у звичайній й у ліпосомальній формах.

3. Розробити високоспецифічну імуноафінну методику очистки рІЛ-7.

4. Дослідити ефективність застосування рІЛ-7 для лікування ранових інфекцій в експерименті.

5. Розробити технологічну та апаратурну схеми отримання субстанції рІЛ-7 людини й провести оцінку ризиків виробничого процесу.

6. Провести техніко-економічну оцінку розробленої технології отримання рІЛ-7.

Об'єкт дослідження – біотехнологічні основи отримання субстанції рІЛ-7 та науково-методичні принципи стандартизації їх виробництва.

Предмет дослідження – оптимізація процесу біосинтезу рІЛ-7, удосконалення технології очистки рІЛ-7, імуномодулююча активність рІЛ-7 *in vivo*, апаратурно-технологічна реалізація виробничого процесу отримання субстанції рІЛ-7 та аналіз його ризиків.

Методи дослідження – біотехнологічні, мікробіологічні, біохімічні, фізико-хімічні, математичні та графоаналітичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Оптимізовано склад живильного середовища для біосинтезу рІЛ-7 бактеріями *E. coli* (вихід – 0,95 мг/мл) із високою біологічною активністю *in vitro* та *in vivo*, що дозволило підвищити вихід рІЛ-7 у 1,3 рази у порівнянні із базовою технологією. Показано стимулюючу дію екстрактів клівії кіноварної і зеферантесу великоквіткового (0,5-1,0%) та ліпосомальної форми вітаміну К₁ (15-25 мг/мл) як стимулюючих добавок до поживного середовища (приводить до збільшення виходу цільового продукту у 1,69 рази). Біологічно активні речовини досліджених фітоекстрактів взаємодіють з поринами зовнішньої мембрани *E. coli*, що, ймовірно, є причиною підвищення біосинтетичної активності рекомбінантного продуцента. Показано, що застосування рІЛ-7 (5мкг рІЛ-7 на добу внутрішньочеревно, щодня до загоєння рани) прискорює швидкість загоєння ран у дослідних тварин та елімінації *Pseudomonas aeruginosa* із них. Результати роботи доповнили сучасні науково-методичні підходи створення препаратів рекомбінантних білків терапевтичного призначення.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено технологічну та апаратурну схему отримання субстанції рІЛ-7 та проведено аналіз критичних точок виробничого процесу. Розроблену технологію отримання субстанції рІЛ-7 апробовано у відділі регуляторних відносин, менеджменту якості та науково-технічних розробок ТОВ «УА «ПРО-ФАРМА» (м. Київ). Результати роботи впроваджено у навчальний процес у КПІ ім. Ігоря Сікорського, а саме: у викладання курсу «Медична біотехнологія» для студентів спеціальності 163 Біомедична інженерія на кафедрі трансляційної медичної біоінженерії та

курсу «Медична біотехнологія-2. Імунобіотехнологія» для студентів спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія на кафедрі промислової біотехнології.

Експериментально обґрунтовано раціональний кількісний склад органічних компонентів та мінеральних речовин живильного середовища для культивування рекомбінантного продуценту *E. coli*, що дозволило збільшити вихід рІЛ-7 у 1,3 рази.

Доведено стимулюючу дію екстрактів клівії кіноварної і зефірантесу великоквіткового як добавок до живильного середовища при культивуванні рекомбінантних бактерії *E. coli* в діапазоні 0,5-1,0%, що забезпечувало підвищення виходу цільового продукту в 1,69-1,82 рази. Показано стимулюючий вплив ліпосомальної форми вітаміну К₁ в концентрації 15-25 мг/мл на рівень біосинтезу рІЛ-7 (збільшення в 1,74-1,81 рази). Показано, що механізми біологічної активності фітоекстрактів на синтез рІЛ-7 бактеріальними продуцентами, включають взаємодію з поверхневими структурами бактеріальної клітини.

Розроблено удосконалену схему очистки рІЛ-7 за рахунок введення стадії високоспецифічної імуноафінної хроматографії, що дозволило досягти чистоти отримуваної субстанції на рівні 98%. Для синтезованої імуноафінної колонки на основі тетраетоксисилану визначено раціональні технологічні параметри хроматографічної очистки, які дозволяють отримувати високоочищений продукт упродовж 15 циклів безперервної роботи та у широкому діапазоні концентрацій продукту (0,005-20мкг/мл).

Експериментально доведено ефективність застосування рІЛ-7 при лікуванні ранової інфекції *P. aeruginosa*. Показано, що у мишей, які отримували лікування препаратом рІЛ-7 (5мкг на добу внутрішньочеревно), загоєння ран і елімінація збудника настає на 5 днів раніше, ніж у мишей без лікування препаратом рІЛ-7.

Розроблено технологічну та апаратурно-технологічну схему отримання субстанції рІЛ-7 людини на основі отриманих експериментальних даних. Проведено оцінку ризиків технологічного процесу отримання субстанції рІЛ-7

та визначено найбільш критичні стадії, що дозволило розробити систему контролю виробництва для запобігання та мінімізації ризиків.

Проведено техніко-економічну оцінку розробленої технології отримання субстанції рІЛ-7: визначено собівартість кінцевого продукту та потужність виробництва з огляду на забезпеченість пацієнтів України та поширеність відповідних патологій. Розрахункова потужність виробництва склала 240г субстанції рІЛ-7 на рік, а її собівартість – 43 478грн. Розрахункова сировина собівартість готової ін'єкційної форми препарату рІЛ-7 (3-60мкг на дозу) становить 38-1512грн., що обумовлює його соціальну доступність для населення України.

Особистий внесок здобувача. Результати роботи, які викладено в дисертації, одержані автором особисто або за його безпосередньої участі. Планування експериментальної роботи проводилися спільно із науковими керівниками. Особисто автором описані результати досліджень, проведено їх аналіз та обговорення. Спільно із науковими керівниками сформовано висновки.

За темою дисертаційної роботи опубліковано 16 праць, 1 стаття у періодичному науковому фаховому виданні держави, яка входить до Організації економічного співробітництва та розвитку та Європейського Союзу (Словаччина), та яке цитуються у науково-метричній базі SCOPUS; 6 статей у наукових виданнях, включених до переліку наукових фахових видань України, у т.ч. 2 статті у виданні, що цитуються у науково-метричній базі SCOPUS; 1 стаття в фахових виданнях інших країн. Результати оприлюднені в дисертації апробовані та обговорені на 8 міжнародних та вітчизняних конференціях.

Ключові слова: рекомбінантний інтерлейкін-7 людини, живильне середовище, фітоекстракти, вітамін К₁, біологічна активність, технологія, стандартизація.

SUMMARY

Motronenko V. Biotechnology of the substance of recombinant human interleukin-7. – Qualifying scientific work, the manuscript

Thesis for the Doctor of Philosophy in 16 Chemical and Bioengineering, specialty 162 Biotechnology and Bioengineering. – National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”, Ministry of Education and Science of Ukraine. Kyiv, 2020.

Currently, there is rapid progress in all high-tech and, most of all, biotechnology industries. Among the modern biotechnology trends is immunobiotechnology, which has been formed in the last two decades and aims at the targeted biosynthesis of new biologically active drugs and pharmaceutical products. This includes monoclonal antibodies, vaccines, sera, cytobiotic drugs, cytobiotic drugs.

Human's interleukin-7 (IL-7) is a lymphopoietic growth factor that holds a special position among other cytokines because of its unique function in hematopoiesis, which is not duplicated by other factors. Lack of functional IL-7 may be one of the causes of severe combined immunodeficiency. The result of functional's lack IL-7 in the body is lymphopenia and, as a consequence, severe immunodeficiency. The level of B- and T-lymphocytes in the blood increases with the increase in the number of IL-7, IL-7 is involved in the lymph nodes' formation. The major producers of IL-7 are bone marrow and thymus stromal cells, as well as some other cells in the human body.

Evidence suggests that IL-7 may be used in complex therapy for the treatment of viral and bacterial infections. IL-7 is also considered as a treatment for a number of oncological diseases (in particular, such as glioma, melanoma, glioblastoma, prostate cancer). The biological potential of IL-7 suggests that its use can stimulate immunity in patients with lymphocytic depletion (including against chronic infectious diseases), autoimmune diseases, and the like.

Given the recent advances in molecular biology and biotechnology in the medical proteins' production, the most promising approach is to obtain IL-7 based on a recombinant producer. Optimization of biosynthesis processes of recombinant medical products is an urgent task of biotechnology, especially from the technical and economic indicators point of view, since the output of the target products, especially

when using multi-stage complex procedures for the isolation and purification of proteins, affects the cost of the obtained medicinal products, their social availability. One of the directions of increasing the yield of recombinant products in bacterial biosynthesis systems is addressed to optimizing the composition of nutrient media. Particular attention is devoted to the modern technologies' development for the production of recombinant proteins, and is given to improving the methods of isolation and purification of the target product.

The purpose of the work is scientific substantiation of biotechnology of obtaining substance of recombinant interleukin-7 person.

To achieve this goal, the following tasks were set.

1. To optimize the quantitative and qualitative composition of the nutrient medium for the biosynthesis of rIL-7 by *E. coli* bacteria.

2. To investigate the possibility of increasing the biosynthetic activity of the microbial producer rIL-7 by adding plant extracts and vitamins to the nutrient medium, in the usual and liposomal forms.

3. To develop a highly specific immunoaffinity purification method for rIL-7.

4. To investigate the effectiveness of the use of rIL-7 for the treatment of wound infections in the experiment.

5. To develop technological and equipment schemes for obtaining substance rIL-7 person and carry out risk assessment of the production process.

6. To conduct a feasibility study of the developed technology of obtaining rIL-7.

The object of the study is the biotechnological bases of obtaining substance rIL-7 and scientific and methodological principles of standardization of their production.

The subject of the study is optimization of the rIL-7 biosynthesis process, improvement of the rIL-7 purification technology, immunomodulatory activity of rIL-7 in vivo, instrumentation and technological realization of the production process of obtaining the substance rIL-7 and analysis of its risks.

Research methods are biotechnological, microbiological, biochemical, physico-chemical, mathematical and graph analytical.

Scientific novelty of the obtained results. The composition of the nutrient medium for rIL-7 biosynthesis was optimized by *E. coli* bacteria (yield 0.95mg/ml) with high in vitro and in vivo biological activity, which increased the rIL-7 yield 1.3 times compared to the basic technology.

The stimulating effect extract of *Cliviaminiata* and *Zephyranthes grandiflora* (0.5-1.0%) and liposomal form of vitamin K₁ (15-25mg/ml) as stimulating additives to the nutrient medium is shown (leading to an increase in the yield of the target product 1.69 times).

The biologically active substances of the investigated phytoextracts interact with the pores of the outer membrane of *E. coli*, which is likely to cause an increase in the biosynthetic activity of the recombinant producer.

It has been shown that administration of rIL-7 (5mg rIL-7 daily intraperitoneally, daily before wound healing) accelerates the rate of wound healing in experimental animals and the elimination of *Pseudomonas aeruginosa* from them.

The results of the work are in close connection with the current scientific and methodological approaches for the creation of recombinant proteins for therapeutic purposes.

The practical significance of the results obtained. The technological and instrumental scheme of obtaining substance rIL-7 was developed and the critical points of the production process were analysed.

The developed technology of obtaining substance rIL-7 was tested in the department of regulatory relations, quality management and scientific and technical development of LLC "UA-PRO-PHARMA" (Kyiv).

The results of the work were implemented in the educational process in Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, namely: in teaching the course "Medical Biotechnology" for students of specialty 163 Biomedical Engineering at the Department of Translational Medical Bioengineering and the course "Medical Biotechnology-2. Immunobiotechnology» for students of specialty 162 Biotechnology and bioengineering at the department of industrial biotechnology.

The rational quantitative composition of organic components and minerals of the nutrient medium for the cultivation of recombinant producer *E. coli* was experimentally substantiated, which allowed to increase the yield of rIL-7 1.3 times.

The stimulating effect of clover extracts of cinnabar and zephyranthes large-flowered as additives to the nutrient medium in the cultivation of recombinant *E. coli* bacteria in the range of 0.5-1.0%, which provided an increase in the yield of the target product 1.69-1.82 times. The stimulating effect of the liposomal form of vitamin K₁ at a concentration of 15-25mg/ml on the level of rIL-7 biosynthesis (an increase of 1.74-1.81 times) is shown. The mechanisms of biological activity of phytoextracts for the synthesis of rIL-7 by bacterial producers have been shown to include interaction with the surface structures of a bacterial cell.

An advanced scheme for purification of rIL-7 was developed by introducing a highly specific immunoaffinity chromatography step, which allowed the substance to be obtained at 98%. For the tetraethoxysilane-synthesized immunoaffinity column, rational technological parameters of chromatographic purification have been determined, which allow to obtain a highly purified product over 15 cycles of continuous operation and over a wide range of product concentrations (0.005-20µg/ml).

The efficacy of the use of rIL-7 in the treatment of *P. aeruginosa* wound infections has been experimentally proven. It was shown that in mice treated with rIL-7 (5µg per day intraperitoneally), wound healing and pathogen elimination occurred 5 days earlier than in mice without rIL-7 treatment.

The technological and equipment-technological scheme of obtaining the substance of human rIL-7 based on the obtained experimental data was developed. The risks of the process of obtaining the substance rIL-7 were evaluated and the most critical stages were identified, which allowed the development of a production control system to prevent and minimize risks.

The feasibility study of the developed technology of obtaining substance rIL-7 has been carried out: the cost of the final product and the production capacity have been determined in view of the safety of patients of Ukraine and the prevalence of relevant pathologies. The estimated production capacity was 240g of substance rIL-7

per year, and its cost was 43 478UAH. The estimated raw material cost of the ready-to-use injection form of the drug rIL-7 (3-60µg per dose) is 38-1512UAH, which determines its social accessibility for the population of Ukraine.

Personal contribution of the applicant. The results of the thesis presented in the thesis were obtained by the author personally or with her direct participation. The planning of the experimental work was carried out jointly with the scientific supervisors. The author personally describes the results of the research, conducted their analysis and discussion. Conclusions have been drawn up with the scientific leaders.

On the topic of the dissertation, 16 papers were published, 1 article in the periodical scientific professional publication of the state, which is a member of the Organization for Economic Cooperation and Development and the European Union (Slovakia), which is cited in SCOPUS scientific-metric database; 6 articles in scientific editions included in the list of scientific professional editions of Ukraine, incl. 2 articles cited in SCOPUS scientific-metric database; 1 article in professional publications of other countries. The results published in the dissertation were tested and discussed at 8 international and national conferences.

Keywords: recombinant human interleukin-7, nutrient medium, phytoextracts, vitamin K₁, biological activity, technology, standardization.

Список публікацій автора

Статті:

1. **Motronenko VV**, Lutsenko TN, Ruzhynska LI, Gorshunov YuV, Galkin AYu. Comparative analysis of the effects of hydrodynamic conditions in submerged culturing of recombinant bacteria. Труды БГТУ, Серия 2: Химические технологии, биотехнология, геоэкология. 2017;2199:241-246. **(Республіка Білорусь)** *(Здобувачем проведено збір та аналіз літературних даних наукових ждерел, підготовлено статтю до друку)*
2. Нечаєва ЯО, Грабчук СМ, Горшунов ЮВ, **Мотроненко ВВ**, Галкін ОЮ. Рекомбінантні білки терапевтичного призначення: особливості отримання, вивчення безпечності та ефективності (літературний огляд). Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки.

- 2017;2:85-93. *(Здобувач приймав участь в зборі та аналізі літерних даних наукових джерел)*
3. Galkin OYu, Lutsenko TM, Gorshunov YuV., **Motronenko VV**. Development of the method for microbiological purity testing of recombinant human interleukin-7-based product. Ukrainian Biochemical Journal. 2017;89(3):52-59. **(SCOPUS)** *(Здобувач приймав участь в аналізі отриманих результатів та підготовці статті до друку)*
 4. Луценко ТМ, Горшунов ВЮ, **Мотроненко ВВ**, Галкін ОЮ. Оцінка ризиків у технології препарату на основі рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини та її перспективна валідація. Наукові вісті НТУУ "КПІ". 2017;3:56-63. *(Здобувач приймав участь в аналізі отриманих результатів та підготовці статті до друку)*
 5. Сербов ВО, **Мотроненко ВВ**. Аналіз впливу механічних чинників при глибинному культивуванні мікроорганізмів. Innovative Biosystems and Bioengineering. 2019;3(1):45-51. *(Здобувач приймав участь в зборі та аналізі літерних даних наукових джерел, підготовці статті до друку)*
 6. Наточій ТО, **Мотроненко ВВ**. Порівняльна характеристика біотехнологічних підходів до отримання рекомбінантних цитокінів людини у бактеріальних системах експресії. Innovative Biosystems and Bioengineering. 2019;3(3):128-145. *(Здобувач приймав участь в зборі та аналізі літерних даних наукових джерел, підготував статтю до друку)*
 7. Grigorieva SM, Starosyla DB, Rybalko SL, **Motronenko VV**, Lutsenko TM, Galkin OYu. Effect of recombinant human interleukin-7 on *Pseudomonas aeruginosa* wound infection. Ukrainian Biochemical Journal. 2019;91(5):9-17. **(SCOPUS)** *(Здобувач приймала участь в аналізі літературних даних наукових джерел, плануванні та проведенні експериментів, обробці отриманих результатів, підготовці статті до друку)*
 8. **Motronenko V**, Lutsenko T, Galkin A, Gorshunov Y, Solovjova V. Optimization of the culture medium composition to increase the biosynthesis of recombinant human interleukin-7 in *Escherichia coli*. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2020;9(4):761-768.

(SCOPUS, Словаччина) *(Здобувач приймала участь в аналізі літературних даних наукових джерел, плануванні та проведенні експериментів, обробці отриманих результатів, підготовці татті до друку)*

Тези доповідей:

1. **Мотроненко ВВ, Сербов ВО.** Вплив перемішування при глибинному культивуванні мікроорганізмів. Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології: збірник наукових праць, випуск 3; 2017 жовт. 13; Харків. Х.: Вид-во НФаУ, 2017, с. 195-199.
2. **Мотроненко ВВ.** Вплив перемішування на рекомбінантні бактерії при глибинному культивуванні. XIII Miedzynarodowej naukowí – praktycznej konferencji, «Wykształcenie i nauka bez granic – 2017»; 2017 grud. 07-15; Przemysł. Przemysł, 2017, с. 70-72.
3. **Мотроненко ВВ.** Склад живильного середовища для культивування бактеріального продуценту рекомбінантного інтерлейкіну-7 людини. Матеріали XIII Всеукраїнської науково-практичної конференції (для студентів, аспірантів і молодих учених) "Біотехнологія ХХІ століття"; 2019 квіт. 19; Київ. Київ 2019, с 53.
4. **Motronenko VV.** Analysis of the effects of hydrodynamic conditions in submerged culturing of recombinant bacteria. Матеріали ХХVI Міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів "Topical issues of new medicines development". 2019 квіт. 10-12; Харк. Харків НФаУ 2019, с. 176-178.
5. **.Motronenko V.** Improvement of biotechnology for the production of recombinant interleukin-7. Матеріали 85 Ювілейної Міжнародної наукової конференції молодих учених, аспірантів і студентів "Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті", присвяченої 135-річчю Національного університету харчових технологій. 2019 квіт. 11-12; Київ. К.: НУХТ 2019, с. 523.
6. **Мотроненко ВВ.** Оптимізація складу живильного середовища для біосинтезу рекомбінантних білків у бактеріальних системах експресії.

Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції-школи студентів та молодих учених "BIOMED Talks-2019". 2019 жовт. 15-17; Київ. Київ 2019, с. 88-89.

7. **Мотроненко ВВ**, Луценко ТМ. Оптимізація біотехнології отримання рекомбінантного інтерлейкіну-7 та його використання для лікування ранових інфекцій. VIII Міжнародна науково-практична онлайн конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії». 2019 лист. 15; Київ. Київ 2019, с.60-61.
8. **Motronenko V**, Lutsenko T, Rybalko S, Starosyla D, Hryhoreva S, Galkin O. Obtaining of recombinant human interleukin-7 and their use for the treatment of wound infections. Conference materials of the young scientists conference "Youth and modern problems of microbiology and virology". 2019 novem. 12-14; Kyiv. Kyiv 2019, p. 26.