

НАУКОВІ РОЗРОБКИ ІНСТИТУТУ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ НАН УКРАЇНИ, ГОТОВІ ДО ВПРОВАДЖЕННЯ У ПРОМИСЛОВЕ ВИРОБНИЦТВО

СПОСІБ ОТРИМАННЯ ВАКЦИНИ ПРОТИ SARS-COV-2 НА ОСНОВІ ЕКСПОНОВАНОГО НА ПОВЕРХНІ КЛІТИН ДРІЖДЖІВ ФРАГМЕНТА RBD S- БІЛКА ВІРУСУ SARS-COV-2

*Семків М.В., Дмитрук К.В., Дмитрук О.В.,
Василишин Р.В., Фаюра Л.Р.,
Зазуля А.З., Сибірний А.А.*

COVID-2019 – це гостре вірусне респіраторне захворювання, що спричинило глобальну пандемію. Збудником інфекції є коронавірус SARS-CoV-2. Актуальним завданням залишається розробка ефективних дешевих прототипів вакцин проти SARS-CoV2. На основі гуманізованих дріжджів *Komagataella phaffii* було сконструйовано штами, що синтезують рецептор зв'язуючий домен (RBD) S-білка та виводять його на зовнішню поверхню клітинної мембрани. Закріплення антигена на поверхні клітинної мембрани досягалося шляхом поєднання C-кінцевого GPI-якірного домену білка клітинної стінки *Sag1 Saccharomyces cerevisiae*, що містить GPI-якір (глікозилфосфатидилінозитол) та RBD з гліцин-сериновими фланкуючими лінкерами. Презентацію RBD на поверхні дріжджових клітин було підтверджено за допомогою імунофлуоресцентної мікроскопії. Клітини дріжджів вбивали прогріванням, та використовували як пероральну вакцину для імунізації мишей.

Сироватка імунізованих тварин нейтралізувала вірус з 93% ефективністю. Також на основі гуманізованих штамів дріжджів *K. phaffii* та *Ogataea polymorpha* отримано продуценти фрагментів S-білка: RBD, NTD-RBD, FP-HR1-HR2 та NTD-RBD-FP-HR1-HR2. Відповідні фрагменти було використано для внутрішньочеревної імунізації мишей. Сироватка імунізованих тварин також виявляла здатність нейтралізувати вірус SARS-CoV2.

ВИДОСПЕЦИФІЧНІ ПОЛІКЛОНАЛЬНІ АНТИСИРОВАТКИ

Луцик М.Д.

В Інституті біології клітини НАН України (Відділ регуляції проліферації клітин та апоптозу) розроблено технологію отримання і серійного виготовлення імунних полікло-

нальних преципітуючих антисироваток, специфічних до білків крові людини і ряду домашніх тварин (рогата худоба, свиня, кінь, собака, кіт, птиця (курка). Розробка технології і отримання цих сироваток проводилися, починаючи з 1993 року на пропозицію головного суд.-мед. експерта України проф. *Шупика Ю.П.*) і до 2020 року.

На даний час, у зв'язку із припиненням відносин із РФ як країною-агресором, одержання імунних сироваток на запити обласних бюро суд.-мед. експертизи України авторами розробки це виробництво відновлене і продукт пропонується на правах госпрозрахункових договорів.

За часів СРСР сироватки цього типу виготовляли у Науково-виробничому центрі вакцин і сироваток (Ленінград/Санкт-Петербург) і централізовано постачалися судово-експертним бюро різних республік СРСР, включно з Україною. Після розпаду СРСР це постачання проводили різні організації-посередниками, станції переливання крові, а також ФОПи, однак це постачання не було системним. З початком війни росії проти України (24 лютого 2022 року) постачання було повністю припинене, що згубно вплинуло на роботу обласних судово-медичних експертних бюро України.

У зв'язку з цим, в Інституті біології клітини НАН України в травні 2022 року було відновлене одержання імунних антисироваток, насамперед до білків крові людини. На даний час у наявності є антисироватки до білків людини і великої рогатої худоби, які виготовляються і поставляються по замовленнях судово-медичним бюро України як послуга з оплатою замовниками на договірній основі. Форму послуги обрано тому, що за Статутом установи НАН України не є торговими організаціями. Антисироватки виготовляються в обмеженій кількості, незважаючи на гострий попит і необхідність збільшення не лише їхньої кількості, але й асортименту.

Препарати імунних сироваток застосовують для діагностичних потреб у медико-біологічних дослідженнях, зокрема для аналізу білків сироватки крові людини і свійських тварин методом імуноелектрофорезу, в антиглобуліновій пробі Кумбса при гематологічних захворюваннях для виявлення неповних автоантитіл, але найбільше у судово-медичній експертизі для визначення видової приналежності слідів крові та біологічних рідин на речових доказах, а також для аналізу видового складу м'яса у м'ясних продуктах у ветеринарії і харчовій промисловості.



ОТРИМАННЯ МОНОКЛОНАЛЬНИХ АНТИТІЛ ПРОТИ БІЛКІВ КОРОНАВІРУСУ SARS-COV-2 ДЛЯ РОЗРОБКИ ІМУНОХРОМАТОГРАФІЧНИХ ТЕСТІВ ДЛЯ ШВИДКОЇ ДІАГНОСТИКИ COVID-19

*Стасик О.В., Шуваєва Г.Ю.,
Вовк О.І., Чернишук С.В.*

Короткий опис: Застосування «швидких» діагностичних тестів на основі моноклональних антитіл є критичним для контролю захворюваності та превентивних протиепідеміологічних заходів, зокрема, при поширенні інфекційних захворювань.

Гібридомна технологія дозволяє отримати стабільні та ефективні клітинні лінії, що продукують високоспецифічні моноклональні антитіла у масштабах, необхідних для розробки, тестування та наступного серійного виробництва тест систем на основі імуноферментного (ІФА) чи імунохроматографічного (ІХА) аналізів.

В межах договору між Інститутом біології клітини та ТОВ «ХЕМА», за використанням методичних підходів молекулярної інженерії та гібридомної технології, було отримано високоселективні моноклональні антитіла до білків вірусу SARS-CoV-2. Як антиген для імунізації лабораторних мишей було обрано повнорозмірну форму нуклеокапсидного N-білка вірусу, який не виявляв високої частоти мутацій під час пандемії Covid-19.

Отримані у Відділі сигнальних механізмів клітини високоафінні моноклональні антитіла швидко і точно детектували присутність N-білка SARS-CoV-2 в біологічних зразках людини та були використані у складі ІФА та ІХА тест-систем, розроблених компанією «ХЕМА», які можуть бути застосовані, зокрема, і за межами спеціалізованих лабораторій.

Слід зазначити, що колектив виконавців володіє унікальним досвідом для успішного використання гібридомної технології, яка дозволяє розширити спектр моноклональних антитіл, необхідних для розробки нових ефективних тест-систем для детекції збудників інфекційних захворювань чи маркерів низки патологічних станів людини, зокрема небезпечних і розповсюджених захворювань, як ковід, туберкульоз, гепатити різної етіології, а також для швидкої діагностики черепно-мозкових травм.

СПОСІБ ОТРИМАННЯ ФЛАВІНМОНООНУКЛЕОТИДУ (5'-ФМН)

*Воронівський А.Я., Дмитрук К.В.,
Ішук О.П., Сибірний А.А.,
Федорович Д.В., Яцишин В.Ю.*

Короткий опис: Винахід відноситься до галузі біотехнології і є способом отримання флавінмононуклеотиду (ФМН) за допомогою рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata* (*C. famata*). 5'-ФМН (рибофлавін-5'-фосфат) є сполукою, яка відіграє важливу роль як коензим у різноманітних ферментативних реакціях у живих організмах і є ефективним засобом профілактики і лікування захворювань, пов'язаних з порушенням біосинтезу цієї сполуки.

Препарати ФМН, отримані ферментативним способом, можуть знайти застосування як: 1 - лікарські препарати, які не містять домішок з невстановленою біологічною активністю; 2 - реактиви високого ступеня чистоти; 3 - проміжні продукти для отримання флавінаденіндинуклеотиду (ФАД) та його похідних; 4 - компоненти системи біоломінісцентного аналізу. Відомо, що 5'-ФМН у промислових масштабах отримують шляхом фосфорилування рибофлавіну (РФ) хімічними агентами, що приводить до утворення препарату, який містить побічні продукти: ізомерні форми флавінмононуклеотиду, такі як 2'-ФМН і 4'-ФМН, рибофлавін динуклеотиди (5',4'-ФДН і 5',3'-ФДН), а також поліфосфати, які не мають вітамінної активності. Очищення 5'-ФМН від цих сполук є складним завданням. Комерційні препарати містять не більше 74% натрієвої солі 5'-ФМН, крім того, препарати ФМН, отримані таким способом, є дуже дорогими, що знижує можливість їх широкого використання у практиці.

Суть винаходу полягає у введенні в геном дріжджів фрагменту ДНК, який несе генетичну інформацію про синтез ФМН під контролем сильного конститутивно-го промотора, що забезпечує високий рівень експресії гена FMN1 і нагромадження цільового продукту - ФМН, а не суміші флавінових нуклеотидів, ФМН і ФАД, як це має місце при використанні бактерійної моделі. Біосинтез ФМН і ФАД у дріжджів *C. famata* здійснюється за допомогою послідовної каталітичної дії 2 різних ферментів - РФ-кінази (КФ 2.7.1.26) та ФАД-синтетази (КФ 2.7.27.2), які забезпечують утворення ФМН і ФАД у незначній кількості, необхідній для життєдіяльності клітини.

АНАЛІТИЧНИЙ НАБІР «АЛКОТЕСТ» ДЛЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СПИРТІВ

Гончар М. В., Сибірний А. А., Майдан М. М.

Одна з найперших і ефективних розробок, що знайшла реальне практичне застосування в клінічній діагностиці та на виробництві (понад 20 років співпраці між Інститутом біології клітини та ПрАТ «Компанія «Ензим»)

Набір призначений для кількісного визначення алкоголю в біологічних рідинах (цільній крові, плазмі, сироватці, слині та сечі), контролю ферментаційних процесів у бродильних виробництвах і аналізу етанолу в пиві, винах, фармацевтичних продуктах тощо. Принцип роботи набору полягає у супряженні алкогольоксидазної та пероксидазної реакції, які генерують кольоровий барвник, що визначається фотометрично. Набір характеризується високою чутливістю, що дозволяє визначати 5-50 мкг етанолу в 4 мл проби, відтворюваністю результатів, а також широким діапазоном лінійності концентрацій, який складає 0,2-4,5 г/л. Об'єм проби для аналізу 1 мл. Особливістю створеного набору є використання не комерційної алкогольоксидази, а фермента, виділеного зі штама-продуцента, сконструйованого співробітниками Інституту.

СПОСІБ ОТРИМАННЯ ФЛАВІНОВОГО АНТИБІОТИКА АМІНОРИБОФЛАВІНУ

Дмитрук К. В., Сибірний А. А.,
Фаюра Л. Р., Федорович Д. В., Цирульник А. О.

Винахід відноситься до галузі біотехнології і є способом отримання амінорибофлавіну за допомогою рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata* (*C. famata*). Амінорибофлавін є структурним аналогом рибофлавіну (вітаміну В2), який має бактеріостатичний ефект щодо грамположитивних бактерій *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* та *Micrococcus luteus* і може також бути використаний для лікування інфекцій, спричинених штамми *S. aureus*, з множинною стійкістю до антибіотиків.

Амінорибофлавін є не токсичним для клітин ссавців, що робить його перспективним антибактеріальним препаратом. Амінорибофлавін у незначних кількостях продукується бактеріями *Streptomyces davaonensis* та *Streptomyces cinnabarinus*. Хімічний синтез амінорибофлавіну також можливий, але дуже складний і дорогий, тому одержання його шляхом використання сконструйованих дріжджових продуцентів має велику науково-практичну цінність. На сьогоднішній день амінорибофлавін комерційно не виробляється.

Суть винаходу полягає у введенні в геном штаму дріжджів *Candida famata*, -продуцента флавінмононуклеотиду, модифікованої послідовності гена *rosB* бактерії *S. davaonensis* під контролем сильного промотора фактора елонгації трансляції - TEF1 дріжджів *Debaryomyces hansenii* та селективного маркера, гена ІМН3, що забезпечує резистентність до мікофенольної кислоти. У культуральній рідині отриманих трансформантів нагромаджуються значні кількості амінорибофлавіну.

ВИСОКОСЕЛЕКТИВНИЙ ЕНЗИМАТИЧНИЙ НАБІР «ЛАКТАТЕСТ» ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ L-ЛАКТАТУ В КЛІНІЧНІЙ ДІАГНОСТИЦІ ТА БРОДИЛЬНОМУ ВИРОБНИЦТВІ

Гончар М. В., Смуток О. В., Осмак Г. С.

Визначення вмісту лактату має важливе значення у клінічній діагностиці, бродильному виробництві та контролі якості харчових продуктів. Рівень молочної кислоти у крові служить важливим клініко-діагностичним індикатором гіпоксії, молочнокислого ацидозу, шокowego стану, гострого інфаркту міокарду, деяких злоякісних новоутворень і має значне прогностичне значення в реанімаційній терапії. Моніторинг рівня цього метаболіту в крові спортсменів є важливим засобом контролю за тренувальним процесом і використовується для оцінки ефективності відповідних тренажерів та тренувальних режимів.

Розроблений метод базується на використанні в якості біоселективного елементу дріжджового ферменту флавоцитохрому b2. Особливістю ензиму є абсолютна специфічність до L-лактату, відсутність у потребі екзогенного кофактора та його термостабільність. Ці унікальні особливості фермента забезпечують високу точність визначення молочної кислоти у біологічних зразках, а дешевизна використаних реактивів - невисоку ціну комерційних наборів. Окрім того, простота підготовки та проведення аналізу, використання простих приладів (фотометрів чи спектрофотометрів) зумовлює можливість широкого впровадження запропонованого підходу в медицині, спорті та бродильному виробництві.

АНАЛІТИЧНИЙ НАБІР «АРГІТЕСТ» ДЛЯ ФЕРМЕНТАТИВНО-ХІМІЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АРГІНІНУ.

Гончар М. В., Стасюк Н. Є.,
Гайда Г. З., Закальський А. Є.

Діагностикум є актуальний з огляду на важливість моніторингу рівня аргініну в біологічних рідинах і харчових продуктах. Визначення концентрації даного аналіту в сироватці крові дозволяє діагностувати та вивчати особливості перебігу таких складних захворювань як гепатокарцинома, меланома шкіри та колоректальний рак. Окрім цього, L-Arg сьогодні розглядається як один із компонентів ензимотерапії проти деяких агресивних форм раку, для яких поки що не існує ефективних методів лікування (карциноми печінки, простати, підшлункової залози, яйника, нирки, меланоми, гліоми, карциноми шлунку, мезотеліоми та певних типів лейкозів). Контроль вмісту аргініну в амінокислотному складі сировини проводиться для оцінки біохімічної цінності різних сортів м'яса та м'ясопродуктів. Важливим є також оцінка рівня аналіту в інших харчових продуктах, зокрема соках і винах, з огляду на можливість утворення в процесі теплової обробки канцерогенного етилкарбамату.

Набір базується на флуориметричному методі аналізу аргініну (Arg) за використання рекомбінантної аргінази та 2,3-бутандіонмонооксиму. Лінійний діапазон - 0,28 - 280 мкМ Arg, чутливість - 0,150 мкМ.

БІОАНАЛІТИЧНИЙ НАБІР «ХРОМХОЛЕСТЕРОЛ» ДЛЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ХОЛЕСТЕРОЛУ В СІРОВАТЦІ КРОВІ

Гончар М. В., Брантук А. А.

Контроль вмісту холестерину є важливим клініко-діагностичним маркером для оцінки стану здоров'я людини. І підвищення, і зниження нормального рівня холестерину збільшують ризик розвитку серцево-судинних захворювань: атеросклерозу судин головного мозку, ішемічної хвороби серця, інфаркту міокарда тощо. Принцип роботи створеного набору полягає у супряженні декількох ензиматичних реакцій: холестеролестеразної, холестеролоксидазної та пероксидазної, під час яких генерується кольоровий барвник, що визначається фотометрично. У склад набору входить ферментно-хромогенна суміш, розчин детергента і калібратор. Лінійність калібрування забезпечується в діапазоні концентрацій холестеролу від 2,0 до 10,0 ммоль/л.

ШТАМ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA* IMB Y-5028 – ПРОДУЦЕНТ ФЛАВІНМОНОНУКЛЕОТИДУ (5'-ФМН)

Сибірний А. А., Яцишин В. Ю., Федорович Д. В.,
Іщук О. П., Вороновський А. Я.

Винахід відноситься до галузі мікробіологічного синтезу біологічно активних сполук і є новим штамом дріжджів *Candida famata* – продуцентом флавінмонуклеотиду (5'-ФМН).

Шляхом надекспресії гену FMN1 (кодує рибофлавінкіназу) у штаммах *C. famata*, здатних до надсинтезу рибофлавіну, сконструйовано штам дріжджів *C. famata* – продуцент флавінмонуклеотиду (5'-ФМН), який призначений для мікробіологічного отримання цього нуклеотиду. Сконструйовано штам *C. famata* IMB Y-5028, який, завдяки здатності нагромаджувати флавінмонуклеотид без додавання у поживне середовище АТФ або його попередників і РФ, може бути використаний у виробництві як ефективний продуцент цього нуклеотиду.

ШТАМ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA* IMB Y-5033 – СТАБІЛЬНИЙ ПРОДУЦЕНТ РИБОФЛАВІНУ (ВІТАМІНУ В2)

Вороновський А. Я., Дмитрук К. В.,
Сибірний А. А., Федорович Д. В., Яцишин В. Ю.

Штам дріжджів *Candida famata* – стабільний синтетик рибофлавіну (вітаміну В2) з підвищеною продуктивністю синтезу, депонований в Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології НАН України за № IMB Y-5033, який призначений для мікробіологічного отримання вітаміну В2. Винахід відноситься до галузі біотехнології і є новим штамом дріжджів *Candida famata* – продуцентом рибофлавіну (вітаміну В2).

Шляхом введення в геном дріжджів фрагменту ДНК, що несе генетичну інформацію про фактор, що забезпечує стабільність за ознакою "надсинтез рибофлавіну", сконструйовано стабільний штам дріжджів *Candida famata* IMB Y-5033 з підвищеною флавіногенною активністю. Отримано призначений для мікробіологічного одержання вітаміну

В2 штам дріжджів *Candida famata*, який характеризується підвищеною в 4 рази стабільністю і забезпечує зростання продуктивності синтезу рибофлавіну у 3-4 рази.

СПОСІБ ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ШТАМІВ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA* З ПІДВИЩЕНИМ РІВНЕМ СИНТЕЗУ ВІТАМІНУ В2 (РИБОФЛАВІНУ)

Цирульник А. О., Федорович Д. В.,
Колодій О. М., Дмитрук К. В., Сибірний А. А.

Винахід відноситься до галузі біотехнології і є способом отримання рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata* з підвищеною продукцією вітаміну В2. Рибофлавін застосовується як лікарський препарат, а також як кормова і харчова добавка, оскільки в організмі людини і тварин він не утворюється. У даний час вітамін В2 отримують використовуючи мікробний синтез. Продуцентами РФ є цвільові гриби *Ashbya gossypii* та *Eremothecium ashbyi*, рекомбінантні штами бактерій *Bacillus subtilis*, а також дріжджі *Candida famata*, які дають приблизно однаковий вихід кінцевого продукту. Перевагою дріжджів є їх здатність рости на простих живильних середовищах, напівпродуктах та відходах харчової промисловості. Однак, для рентабельного виробництва препаратів вітаміну В2 необхідно підвищити продуктивність наявних штамів продуцентів.

Для отримання покращених продуцентів рибофлавіну в геномі дріжджів *C. famata* надекспресовано ген, що кодує систему екскреції рибофлавіну. У штам *C. famata* – надсинтетик рибофлавіну введено плазмиду, що містить гомолог гену BCRP (breast cancer resistance protein) генетично близького до *C. famata* виду дріжджів *Debaryomyces hansenii* під контролем сильного промотора фактора елонгації трансляції – TEF1 дріжджів *D. hansenii*. Отримані рекомбінантні штами володіють вищою в 1,3- 1,5 рази продукцією рибофлавіну в порівнянні з реципієнтним штамом.

ШТАМ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA* IMB Y-5034 – ПРОДУЦЕНТ РИБОФЛАВІНУ (ВІТАМІНУ В2)

Сибірний А. А., Дмитрук К. В., Федорович Д. В.

Штам дріжджів *Candida famata* – продуцент рибофлавіну (вітаміну В2), депонований в Депозитарії Інституту мікробіології та вірусології НАН України за № IMB Y-5034, який має високу флавіногенну активність і призначений для мікробіологічного отримання вітаміну В2. Винахід відноситься до галузі мікробіологічного синтезу біологічно активних сполук і є новим штамом дріжджів *Candida famata* – продуцентом вітаміну В2. Шляхом комбінації мутагенезу і селективних середовищ отримано штам з високою флавіногенною активністю, в геном якого введено додаткову копію гену SEF1, залученого в регуляцію біосинтезу рибофлавіну, сконструйовано штам-продуцент рибофлавіну з високою стабільністю за ознакою „надсинтез РФ”. Сконструйовано штам *C. famata* IMB Y-5034, який завдяки підвищеній флавіногенній активності та високій стабільності може бути використаний у виробництві як ефективний продуцент РФ (вітаміну В2). ■