

## ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ХИМЕРНОЙ ФОРМЫ РЕКОМБИНАНТНОГО ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА

Мария Борисовна ПЫХТИНА<sup>1,2</sup>, Владимир Павлович РОМАНОВ<sup>1</sup>,  
Светлана Михайловна МИРОШНИЧЕНКО<sup>1,2</sup>, Анатолий Борисович БЕКЛЕМИШЕВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины  
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

<sup>2</sup> НИИ лимфологии ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН»  
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

Цель исследования – получение и изучение биологических свойств рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (G-CSF), «сшитого» посредством пептидного линкера с аполипопротеином А-I (apoA-I), для разработки в перспективе на его основе цитокина пролонгированного действия. **Материал и методы.** Нуклеотидные последовательности генов *G-CSF* и *apoA-I* были оптимизированы для экспрессии в дрожжах *Pichia pastoris*. Сборку гена, кодирующего химерный цитокин G-CSF-apoA-I, его клонирование в составе вектора pPICZα-A и экспрессию в клетках *P. pastoris* выполняли с использованием стандартных генно-инженерных методов. Полученный цитокин очищали методом двухступенчатой ионообменной хроматографии. Биологическую активность химеры определяли *in vitro* на клетках костного мозга (ККМ) крысы и человека с применением методов проточной цитометрии, анализа клеточного цикла и миелограмм. **Результаты.** Сконструирован рекомбинантный штамм дрожжей *P. pastoris* X-33, продуцирующий химерный цитокин, содержащий с N-конца аминокислотную последовательность G-CSF, а с C-конца – зрелого apoA-I человека. На ККМ крыс показано, что G-CSF-apoA-I в 1,8–2 раза менее эффективно увеличивает количество гранулоцитов, чем G-CSF. Вместе с тем химерный цитокин поддерживал жизнеспособность клеток моноцитарного и лимфоцитарного ряда и так же, как G-CSF, поддерживал пролиферацию и созревание клеток гранулоцитарного ряда. В отличие от G-CSF, химера повышала количество бластных клеток и нормализовала сегментацию нейтрофилов, в 1,5 раза эффективнее снижая количество аномалий. **Заключение.** Сконструирован новый химерный цитокин G-CSF-apoA-I, проявляющий свойства не только колониестимулирующего, но и ростового фактора, поддерживающего жизнеспособность других типов ККМ.

**Ключевые слова:** G-CSF человека, apoA-I, клонирование, химерный ген, *Pichia pastoris* X-33, ионообменная хроматография, клетки костного мозга, проточная цитометрия.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Автор для переписки:** Пыхтина М.Б., e-mail: pykhtina\_maria@mail.ru

**Для цитирования:** Пыхтина М.Б., Романов В.П., Мирошниченко С.М., Беклемишев А.Б. Получение и анализ биологических свойств химерной формы рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2019; 39 (6): 37–45. doi: 10.15372/SSMJ20190605

## PRODUCTION AND ANALYSIS OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR CHIMERIC FORM

Mariya Borisovna PYKHTINA<sup>1,2</sup>, Vladimir Pavlovich ROMANOV<sup>1</sup>,  
Svetlana Mikhaylovna MIROSHNICHENKO<sup>1,2</sup>, Anatoliy Borisovich BEKLEMISHEV<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute for Biochemistry of Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine  
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

<sup>2</sup> Research Institute for Lymphology of Federal Research Center «Institute of Cytology and Genetics SB RAS»  
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

The aim of this work was to design and study biological properties of the recombinant human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), «linked» to apolipoprotein A-I (apoA-I) by a peptide linker, for obtaining in perspective a prolong form of the drug based on this cytokine. **Material and methods.** The nucleotide sequences of the genes encoding G-CSF and apoA-I were designed and optimized for expression in *Pichia pastoris* yeast using several computer programs. The assembly of the gene coding for the G-CSF-apoA-I chimeric cytokine, its cloning in the pPICZα-A vector, and expression in *P. pastoris* cells were performed using standard genetic engineering methods. Purification of the chimeric cytokine was carried out by two-stage ion-exchange chromatography. The biological activity of the chimera was determined *in vitro* on rat and human bone marrow cells (BMC) using flow cytometry, cell cycle analysis and myelograms. **Results.** A recombinant *P. pastoris* X-33 yeast strain producing a chimeric cytokine containing the amino acid sequence G-CSF from the N-terminus, and mature human apoA-I from the C-terminus was constructed. In experiments on BMC of rat, it was shown that G-CSF-apoA-I increases the number of granulocytes in 1.8–2 times less compared with G-CSF. At the same time, the chimeric cytokine maintained the viability of monocytic and lymphocytic cells. Unlike G-CSF, the chimera increased the number of blast cells and normalized neutrophil segmentation, reducing the number of anomalies 1.5 times more efficiently. **Conclusion.** A new chimeric cytokine G-CSF-apoA-I was constructed, exhibiting the properties of not only a colony-stimulating factor, but also a growth factor, supporting the viability of other types of BMC.

**Key words:** human G-CSF, apoA-I, cloning, chimeric gene, *Pichia pastoris* X-33, ion exchange chromatography, bone marrow cells, flow cytometry.

**Conflict of interests.** Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

**Correspondence author:** Pykhtina M.B., e-mail: pykhtina\_maria@mail.ru

**Citation:** Pykhtina M.B., Romanov V.P., Mirosnichenko S.M., Beklemishev A.B. Production and analysis of the biological properties of the chimeric form of recombinant human granulocyte colony stimulating factor. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2019; 39 (6): 37–45. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20190605

G-CSF является важным гемопоэтическим фактором, стимулирующим созревание, пролиферацию и дифференцировку нейтрофилов. В клинике препараты рекомбинантного G-CSF используются для лечения нейтропении, вызванной химио- и радиотерапией, а также для мобилизации гемопоэтических стволовых клеток периферической крови как при аутологичной, так и при аллогенной трансплантации [16]. Кроме того, последние исследования демонстрируют перспективность использования G-CSF в лечении болезни Паркинсона [13] и Альцгеймера [14], для терапии последствий инсультов и инфарктов [12].

Одной из важных проблем применения в терапии рекомбинантных цитокинов, в том числе G-CSF, является их короткое время полужизни в организме [11], в связи с чем возникает необходимость проведения многократных инъекций для поддержания их эффективных концентраций. Это, в свою очередь, усугубляет побочные эффекты, вызываемые токсическим действием цитокинов. В связи с этим разработка цитокин-содержащих препаратов пролонгированного действия является актуальной задачей медицинской биотехнологии. Одной из стратегий увеличения времени полужизни цитокина в организме является ковалентное присоединение к нему полиэтиленгликоля [15]. Однако длительный период деградации и индукция иммунных реакций на

пэгилированный цитокин являются существенными недостатками их использования [7]. Другой подход основан на создании рекомбинантных химерных белков, содержащих цитокин, слитый с длительно циркулирующим белком крови: альбумином [8], фрагментом IgG [5] или трансферрином [3]. В последнее время в качестве средств доставки различного рода соединений широко исследуются липопротеины плазмы крови и их белковые компоненты аполипопротеины [9, 10]. В частности, аполипопротеин А-I (apoA-I) обладает рядом ценных свойств белка-транспортёра, а именно: амфифильный, неиммуногенный, длительное время циркулирует в организме, легко подвергается биодеградации, специфически связывается с большинством типов клеток за счет наличия у них рецепторов SR-BI [2].

Целью настоящей работы было получение рекомбинантного G-CSF человека, «сшитого» пептидным линкером с apoA-I, и изучение его биологических свойств. В качестве системы экспрессии были выбраны дрожжи *P. pastoris*, обладающие в сравнении с прокариотами рядом преимуществ при продукции терапевтических белков, а именно: сходные с человеком посттрансляционные модификации белков, отсутствие экзо- и эндотоксинов, высокий выход рекомбинантных белков и их секреция в культуральную среду, что, в свою очередь, существенно облегчает их очистку [4].

Таким образом, мы ожидаем, что химерный цитокин G-CSF-ароА-I будет обладать свойственной G-CSF активностью, но существенно большей стабильностью, как за счет его гликозилирования, так и благодаря наличию в составе химеры ароА-I.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Основные реактивы для молекулярно-биологических исследований приобретены в фирме «Sigma-Aldrich» (США), ферменты – в фирме «Thermo Fisher Scientific» (США), материалы для культуральных работ – в фирме «Биолот» (Россия); соли, кислоты и щелочи – квалификации «ХЧ» или «ОСЧ» производства «Реахим» (Россия).

**Штаммы микроорганизмов:** бактерии *Escherichia coli* шт. BL 21 (DE3) («Novagen», США) и шт. TOP10 («Invitrogen», США), дрожжи *Pichia pastoris* шт. X-33 («Invitrogen», США).

**Плазмидные ДНК:** рPICZ-alpha-A фирмы «Invitrogen» (США).

**Конструирование синтетического гена, кодирующего зрелый G-CSF человека.** Нуклеотидную последовательность гена зрелого G-CSF спроектировали и оптимизировали для экспрессии в дрожжах *P. pastoris* с использованием компьютерной программы «Gene designer» («ATUM», США), пакета программного обеспечения VisualGeneDeveloper (<http://www.visualgenedeveloper.net/Download.html>) и Invitrogen GeneOptimizer™. Оптимизированный ген G-CSF был синтезирован фирмой «GenScript» (США). Синтетический ген G-CSF содержал в 5'-концевой области сайт рестрикции для XhoI и нуклеотидную последовательность, кодирующую сайт протеолиза Kex2 и 2 сайта протеолиза Ste13; в 3'-концевой области гена был локализован сайт рестрикции для KpnI, стоп-кодон и сайты рестрикции для EcoRI и SalI.

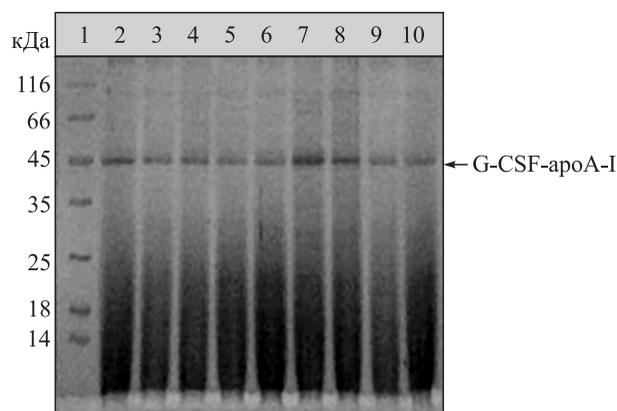
**Конструирование рекомбинантной плазмиды рPICZα-A/G-CSF-ароА-I.** В качестве исходного вектора использовали сконструированную нами ранее плазмиду рPICZα-A/IFN-α2b-ароА-I. Плазида содержала последовательность гена интерферона α 2b человека (*IFN-α2b*) в 5'-концевой области, фланкированную сайтами рестрикции XhoI и KpnI и состыкованную с последовательностями линкера и зрелого ароА-I человека в 3'-концевой области. Ген *IFN-α2b* был удален из плазмиды рPICZα-A/IFN-α2b-ароА-I с помощью гидролиза рестриктазами XhoI и KpnI и замещен на вышеописанный синтетический ген G-CSF, встроенный по этим же сайтам рестрик-

ции с помощью ДНК-лигазы фага T4 с образованием рекомбинантной плазмиды рPICZα-A/G-CSF-ароА-I.

**Трансформация электрокомпетентных клеток *E. coli* Top10 и скрининг трансформантов.** Полученной лигазной смесью трансформировали клетки Top10, которые затем высевали на агаризованную среду ЛБ на чашки Петри, содержащие 50 мкг/мл зеоцина. Выросшие клоны анализировали на наличие рекомбинантной плазмиды методом ПЦР колоний. ПЦР осуществляли с использованием ДНК-амплификатора («БИС», Россия) в присутствии прямого и обратного праймеров, специфичных для фланкирующих химерный ген G-CSF-ароА-I областей вектора рPICZα. Структура прямого праймера – 5'-ТАСТАТТGCCAGCATТGCTGC-3'; обратного – 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'. Размер ампликонов определяли электрофорезом в 0,8%-м агарозном геле. Один из ПЦР-позитивных клонов использовали для препаративной работы плазмиды рPICZα-A/G-CSF-ароА-I.

**Получение штамма *P. pastoris* – продуцента химерного белка G-CSF-ароА-I.** Трансформацию компетентных клеток дрожжей *P. pastoris* шт. X-33 проводили плазмидой рPICZα-A/G-CSF-ароА-I, предварительно гидролизованной рестриктазой BstXI. Трансформированные клоны отбирали на селективной агаризованной среде YPD, содержащей 500 и 2000 мкг/мл зеоцина, колонии выращивали в течение двух суток на орбитальном шейкере при 300 об/мин в среде BMGY, после чего вносили метанол до 0,5 %. По окончании индукции клетки осаждали центрифугированием (3500g, 20 мин, +4 °C). Белки из супернатантов осаждали 10%-й трихлоруксусной кислотой. Осадки промывали ацетоном и анализировали электрофорезом в 12,5%-м полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия (ДСН-ПААГ) (рис. 1). Клон, продуцирующий наибольшее количество целевого химерного полипептида, отбирали для дальнейшей работы.

**Получение химерного цитокина G-CSF-ароА-I.** Клон, продуцирующий химеру G-CSF-ароА-I, выращивали в 50 мл среды BMGY в течение двух суток на орбитальном шейкере при 250 об/мин, после чего вносили метанол до 0,5 %. Перед индукцией в колбы вносили 0,2 % (w/v) Твин 20. На 4-е сутки после индукции клетки осаждали центрифугированием, а в супернатант вносили сульфат аммония до концентрации 50 % от насыщения. Преципитаты белка осаждали центрифугированием (14 000 об/мин, 20 мин, +20 °C). Осадок, содержащий главным образом химеру G-CSF-ароА-I, растворяли в буфере

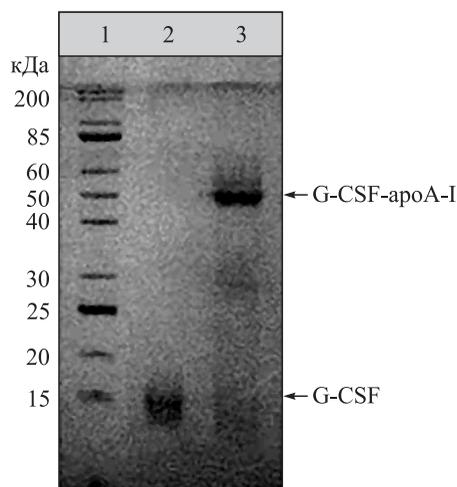


**Рис. 1.** Электрофореграмма белков, присутствующих в культуральных жидкостях клонов *P. pastoris*, анализируемых на продукцию рекомбинантной химеры G-CSF-apoA-I после 6 суток культивирования в среде BMGY на орбитальном шейкере в 96-глубоколуночной планшете. Дорожки: 1 – маркер молекулярных масс белков Fermentas (14–116 кДа); 2–10 – белки в культуральных жидкостях анализируемых клонов после внесения индуктора

**Fig. 1.** SDS-PAGE analysis of proteins from culture medium of *P. pastoris* clones expressing G-CSF-apoA-I in 96-Deep Square well plate in the BMGY medium for 6 days of fermentation in an orbital shaker. The clones were induced by 0.5 % (v/v) methanol for 96 h at 28 °C. Lane 1 – standard protein molecular weight marker Fermentas (14–116 kDa); lanes 2–10: proteins in the culture fluids of the analyzed induced clones

№ 1 (25 mM ацетат натрия, 1 mM ЭДТА и 0,02 % Твин 20, pH 4.5) и диализовали в ночь против данного буфера.

**Выделение и очистка химерного цитокина G-CSF-apoA-I.** Очистку G-CSF-apoA-I проводили с помощью двухэтапной ионообменной хроматографии. Диализованный раствор химерного цитокина фракционировали на колонке с DEAE-Sepharose FF против буфера № 1. Несвязавшуюся со смолой фракцию диализовали против буфера № 2 (10 mM натрий-фосфатный буфер, pH 7,6, 1 mM ЭДТА и 0,02 % Твин 20). Диализованный раствор наносили на колонку с DEAE-Sepharose FF, уравновешенную буфером № 2. Колонку промывали буфером № 2, белок элюировали градиентом NaCl (0–0,3 M) в этом же буфере. Наиболее чистые фракции, содержащие химеру G-CSF-apoA-I, объединяли (рис. 2). Концентрацию G-CSF-apoA-I измеряли спектрофотометрически в УФ-поглощении при длине волны 280 нм с учетом молярного коэффициента экстинкции  $47\ 540\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$  (ЦКП «Современные оптические системы», ФИЦ ФТМ), а также денситоме-



**Рис. 2.** Электрофореграмма очищенного рекомбинантного химерного цитокина G-CSF-apoA-I. Дорожки: 1 – маркер молекулярных масс белков (Sib Enzyme) (10–200 кДа); 2 – рекомбинантный G-CSF (получен ранее); 3 – очищенный рекомбинантный G-CSF-apoA-I

**Fig. 2.** SDS-PAGE analysis of purified recombinant chimeric G-CSF-apoA-I cytokine. Lane 1 – standard protein molecular weight marker (Sib Enzyme) (10–200 kDa); 2 – previously obtained recombinant G-CSF; 3 – purified recombinant G-CSF-apoA-I

трически с использованием программы Gel-Pro Analyzer.

**Анализ биологической активности химерного цитокина G-CSF-apoA-I.** Самцы линии Wistar (200–250 г,  $n = 4$ ) были получены из вивария ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН». Все процедуры проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией и рекомендациями по правильному обращению и уходу за лабораторными животными (European Communities Council Directive 86/609/CEE), протокол одобрен Комитетом по этике НИИ биохимии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины (протокол № 14 от 18.06.2019).

**Выделение и культивирование клеток костного мозга (ККМ).** Костный мозг крыс выделяли в стерильных условиях из большеберцовой кости и бедренных костей по стандартному протоколу [1]. Клеточную суспензию доводили до концентрации  $2 \times 10^6$  средой для культивирования клеток (RPMI, 10 % фетальной бычьей сыворотки) и по 0,5 мл переносили в 24-луночный планшет. ККМ культивировали в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) в течение 24 и 48 ч в присутствии G-CSF-apoA-I (50 нг/мл). В качестве положительного контроля использовали полученный ранее G-CSF в той же концентрации, в качестве исходного контроля – пробы, не содержащие до-

бавок. Все исследования выполнены в трех повторях. Результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего.

ККМ человека получали с добровольного согласия в клинике НИИ клинической и экспериментальной лимфологии ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины. Донором костного мозга был пациент, имеющий сниженное количество клеток гранулоцитарного ряда, с задержкой созревания и аномалиями сегментации – повышенным процентом гипосегментированных нейтрофилов.

ККМ крыс анализировали методом проточной цитометрии («CYTOFLEX S-100», «Beckman Coulter», США). Гейты выставляли согласно размеру и гранулярности клеточных типов (FSC/SSC). Образцы для определения фаз клеточного цикла фиксировали и окрашивали раствором йодида пропидия. Окрашивание ККМ проводили методом Май – Грюнвальда – Гимза. Мазки исследовали под микроскопом «Axio Scope A1» («Zeiss AG», Германия) и подсчитывали 500 клеток на мазок.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате встройки по сайтам XhoI и KpnI синтетического гена *G-CSF* в плазмиду pPICZα-A/IFN-α2b-ароА-I, из которой с помощью гидролиза рестриктазами предварительно был удален ген *IFN-α2b*, получена рекомбинантная плаزمида pPICZα-A/G-CSF-ароА-I (рис. 3), которой трансформировали электрокомпетентные клетки *E. coli* Top10. Один из клонов, содержащих, по данным ПЦР-анализа, плазмиду pPICZα-A/G-CSF-ароА-I, был отобран для замузеивания и дальнейшей наработки плазмиды в препаративных количествах. Плазмида pPICZα-A/G-CSF-ароА-I была линейаризована по сайту BstXI и использована для трансформации клеток *P. pastoris* X-33. На 3-й день после трансформации на агаризованной чашке с 2000 мкг/мл зеоцина выросло около 20 колоний. Все клоны были проанализированы на способность продуцировать и синтезировать целевой G-CSF-ароА-I культивированием в 96-глубоколуночном планшете в среде BMGY в шейкере (300 об/мин, 96 ч,

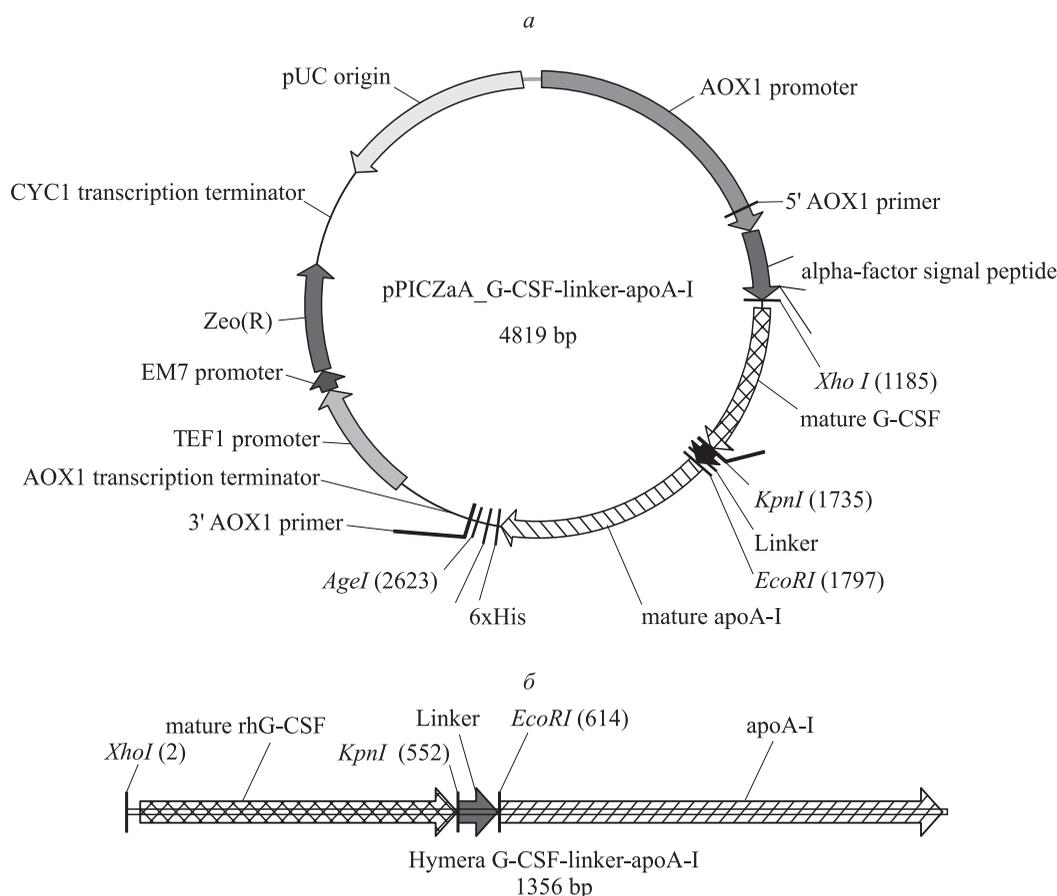
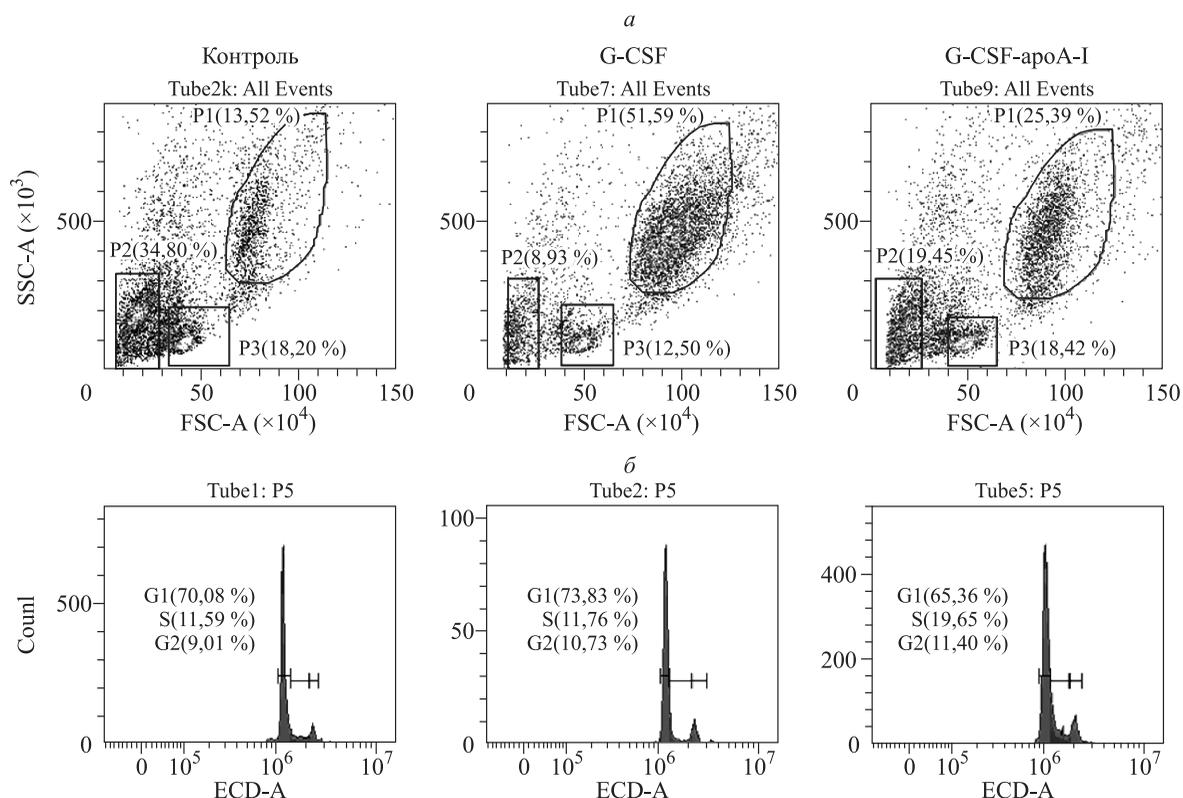


Рис. 3. Генетическая карта рекомбинантной плазмиды pPICZα-A/G-CSF-ароА-I (а) и схема химерного белка G-CSF-ароА-I (б)

Fig. 3. Genetic map of pPICZα-A/G-CSF-ароА-I recombinant plasmid (a) and G-CSF-ароА-I chimeric protein scheme (b)



**Рис. 4.** Анализ клеток ККМ крыс методом проточной цитометрии (а): P1 – гейт гранулоцитарных клеток, P2 – гейт лимфоцитов, апоптотных, мелких клеток, P3 – гейт моноцитарных и бластных лимфоцитарных клеток; распределение ККМ по фазам клеточного цикла (б)

**Рис. 4.** Analysis of rat KKM by flow cytometry (a): P1 – gate of granulocyte cells, P2 – gate of lymphocytes, apoptotic and small cells, P3 – gate of monocytic and blast lymphocyte cells; distribution of BMC on the phases of the cell cycle (b)

+28 °C): показано, что все анализируемые клоны приблизительно с равной эффективностью синтезировали G-CSF-aroA-I, однако уровень синтеза в них химеры был невысоким (см. рис. 1).

Наиболее продуктивный клон использовали для препаративной наработки химерного цитокина, как описано в «Методах». На всех этапах культивирования отбирали аликвоты культуральной жидкости для определения наличия в них рекомбинантного химерного цитокина с помощью гель-электрофореза в 12,5 % ДСН-ПААГ. Суммарный выход белка по завершении культивирования был незначителен и составил 5–7 мг с 1 л культуры. Чистота конечного препарата составила около 90 % (см. рис. 2). Трудности, связанные с наработкой и очисткой химерного белка, могут быть обусловлены частичным лизисом клеток-продуцентов на этапе индукции метанолом и, как следствие, высвобождением в культуральную жидкость внутриклеточных дрожжевых белков. Кроме того, при культивировании во время фазы индукции в культуральную жидкость секретруется пигмент *P. pastoris*, который прочно связыва-

ется с колонкой на этапе хроматографии и элюируется вместе с целевым белком. Все это влияет на конечный выход целевого белка и на степень его очистки.

Специфическую биологическую активность химеры G-CSF-aroA-I исследовали на ККМ крыс и человека в сравнении с полученным ранее рекомбинантным G-CSF. Костный мозг представляет собой прямую мишень действия ростовых факторов, вызывающих пролиферацию и дифференцировку клеток, и поэтому служит идеальной моделью для их изучения. Поскольку G-CSF человека не является строго видоспецифичным ростовым фактором, первоначальное исследование полученного химерного цитокина было проведено на ККМ крыс. Методом проточной цитометрии было показано, что как G-CSF, так и его химерная форма стимулируют созревание и пролиферацию клеток гранулоцитарного ростка. Однако количество гранулоцитарных клеток под влиянием G-CSF-aroA-I было в 1,8–2 раза меньше, чем в случае с G-CSF (рис. 4, а). В отличие от G-CSF, химера G-CSF-aroA-I поддерживала жиз-

**Таблица.** Процентное содержание клеток гранулоцитарного ростка костного мозга человека при стимуляции G-CSF-ароА-I в сравнении с контролем и G-CSF в течение 24 и 48 ч инкубации

**Table.** Distribution of granulocyte germ of human BMC treated with G-CSF-ароА-I compared to control and G-CSF during 24 and 48 hours of incubation

Содержание клеток на разных стадиях созревания, %	24 ч инкубации			48 ч инкубации		
	Контроль	G-CSF	G-CSF-ароА-I	Контроль	G-CSF	G-CSF-ароА-I
Бласты/промиелобласты	8,9	3,2	3,2	3,4	3,5	4,7
Миелоциты	16,1	10,2	8,4	13,2	8,8	13,5
Метамиелоциты	13,4	8,0	7,3	11,1	6,6	9,8
Палочкоядерные нейтрофилы	11,0	5,6	11,6	19,1	7,6	6,6
Сегментоядерные нейтрофилы	21,3	56,8	58,1	26,2	57,1	53,8
Аномалии сегментации	26,0	16,4	10,8	27,3	15,7	11,1
Количество гранулоцитов, % от всех ККМ	27,0	41,1	36,0	20,0	35,1	34,0

неспособность клеток моноцитарного и лимфоцитарного ряда. Анализ клеточного цикла ККМ показал, что в присутствии G-CSF-ароА-I процентное содержание клеток, находящихся в стадиях S- и G<sub>2</sub>M-фазах, было выше, чем в контроле и в присутствии G-CSF (рис. 4, б), свидетельствуя о том, что химера поддерживает жизнеспособность бластных клеток. Обнаруженные отличия двух форм G-CSF, возможно, были обусловлены изменением пространственной структуры G-CSF или непосредственным влиянием ароА-I в составе химеры на ККМ.

Анализ окрашенных мазков костного мозга человека показал, что в контроле через 24 ч инкубации гранулоцитарный росток составлял ~ 27 % от всех клеток, количество зрелых нейтрофилов ~ 21 %, при этом наблюдалась их гипосегментация (более 50 % от зрелых нейтрофилов). При инкубации ККМ с G-CSF общее количество клеток гранулоцитарного ряда возрастало в 1,5 раза, при этом в 1,6 раза снижалось количество аномальных гипосегментированных нейтрофилов. G-CSF-ароА-I также стимулировал пролиферацию и созревание клеток гранулоцитарного ряда, но менее эффективно, чем G-CSF. Количество аномальных нейтрофилов при инкубации с G-CSF-ароА-I уменьшалось более чем в 2 раза (таблица). Снижение процентного содержания клеток гранулоцитарного ряда при инкубации ККМ с G-CSF-ароА-I было обусловлено активацией пролиферации и поддержанием жизнеспособности клеток лимфоцитарного ростка, а также макрофагально-стромальных клеток. В клетках, стимулированных G-CSF, созревание через 48 ч смещалось в сторону палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, в то время как G-CSF-ароА-I поддерживал повышенное количество

бластных клеток, миелоцитов и метамиелоцитов на фоне незначительного снижения числа сегментоядерных нейтрофилов.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно заключить, что G-CSF-ароА-I проявляет свойства колониестимулирующего фактора, влияя на пролиферацию и нормальное созревание клеток гранулоцитарного ряда и снижая количество аномалий в 1,5 раза эффективнее, чем G-CSF. Полученная химера также проявляет свойства ростового фактора в отношении клеток других ростков костного мозга, поддерживая клеточное разнообразие через 48 ч инкубации.

Проявление у химерного белка G-CSF-ароА-I новых свойств по сравнению с G-CSF было для нас несколько неожиданным. Как предположено выше, эти изменения могли быть обусловлены вкладом молекулы ароА-I в составе химеры. Эти предположения подтверждают имеющиеся в литературе работы, связанные с получением гибридных конструкций цитокинов, слитых с ароА-I, в результате чего последние приобретали новые свойства. Так, J. Fioravanti et al. было показано, что рекомбинантный интерферон (ИНФ), слитый с ароА-I, проявлял более выраженную иммуностимулирующую активность, обладал сниженной гематотоксичностью и лучшими фармакокинетическими свойствами в сравнении с ИНФ [6]. Кроме того, эти же исследователи продемонстрировали улучшенные фармакокинетические свойства и у ряда других цитокинов (anti-TGF-β, FGF15/19, IL-15), слитых с ароА-I. Несомненный интерес представляет дальнейшее изучение влияния G-CSF-ароА-I на другие ростки ККМ, а также исследование фармакокинетических свойств этого химерного белка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1992. 272 с.  
Goldberg E.D., Dygay A.M., Shakhov V.P. Methods of tissue culture in hematology. Tomsk, 1992. 272 p. [In Russian].
2. Acton S., Rigotti A., Landschulz K.T., Xu S., Hobbs H.H., Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*. 1996; 271 (5248): 518–520. doi: 10.1126/science.271.5248.518
3. Bai Y., Ann D.K., Shen W.C. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor-transferrin fusion protein as an oral myelopoietic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005; 102 (20): 7292–7296. doi: 10.1073/pnas.0500062102
4. Cereghino J.L., Cregg J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev*. 2000; 24 (1); 45–66. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x
5. Cox G.N., Smith D.J., Carlson S.J., Bendele A.M., Chlipala E.A., Doherty D.H. Enhanced circulating half-life and hematopoietic properties of a human granulocyte colony-stimulating factor/immunoglobulin fusion protein. *Exp. Hematol*. 2004; 32 (5); 441–449. doi: 10.1016/j.exphem.2004.01.012
6. Fioravanti J., González I., Medina-Echeverez J., Larrea E., Ardaiz N., González Aseguinolaza G., Prieto J., Berraondo P. Anchoring interferon alpha to apolipoprotein A-I reduces hematological toxicity while enhancing immunostimulatory properties. *Hepatology*. 2011; 53 (6): 1864–1873. doi: 10.1002/hep.24306
7. Garay R.P., El-Gewely R., Armstrong J.K., Garratty G., Rchette P. Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. *Expert Opin. Drug Deliv*. 2012; 9 (11): 1319–1323. doi: 10.1517/17425247.2012.720969
8. Halpern W., Riccobene T.A., Agostini H., Baker K., Stalow D., Gu M.L., Hirsch J., Mahoney A., Carrell J., Boyd E., Grzegorzewski K.J. Albugranin, a recombinant human granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) genetically fused to recombinant human albumin induces prolonged myelopoietic effects in mice and monkeys. *Pharm. Res*. 2002; 19 (11): 1720–1729. doi: 10.1023/a:1020917732218
9. Kim S.I., Shin D., Choi T.H., Lee J.C., Cheon G.J., Kim K.Y., Park M., Kim M. Systemic and specific delivery of small interfering RNAs to the liver mediated by apolipoprotein A-I. *Mol. Ther*. 2007; 15 (6): 1145–1152. doi: 10.1038/sj.mt.6300168
10. Kuai R., Li D., Chen Y.E., Moon J.J., Schwendeman A. High-density lipoproteins: Nature's multifunctional nanoparticles. *ACS Nano*. 2016; 10 (3): 3015–3041. doi: 10.1021/acsnano.5b07522
11. Kuwabara T., Kobayashi S., Sugiyama Y. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Drug Metab. Rev*. 1996; 28 (4): 625–658. doi: 10.3109/03602539608994020
12. Lu C.Z., Xiao B.G. G-CSF and neuroprotection: a therapeutic perspective in cerebral ischaemia. *Biochem. Soc. Trans*. 2006; 34 (6): 1327–1333. doi: 10.1042/BST0341327
13. Meuer K., Pitzer C., Teismann P., Krüger C., Göricke B., Laage R., Lingor P., Peters K., Schlachetzki J.C., Kobayashi K., Dietz G.P., Weber D., Ferger B., Schäbitz W.R., Bach A., Schulz J.B., Bähr M., Schneider A., Weishaupt J.H. Granulocyte-colony stimulating factor is neuroprotective in a model of Parkinson's disease. *J. Neurochem*. 2006; 97 (3): 675–686. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03727.x
14. Prakash A., Medhi B., Chopra K. Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) improves memory and neurobehavior in an amyloid- $\beta$  induced experimental model of Alzheimer's disease. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2013; 110: 46–57. doi: 10.1016/j.pbb.2013.05.015
15. Puchkov I.A., Kononova N.V., Bobruskin A.I., Bairamashvili D.I., Mart'ianov V.A., Shuster A.M. Recombinant granulocyte-colony stimulating factor (filgrastim): optimization of conjugation with polyethylene glycol. *Bioorg. Chem*. 2012; 38 (5): 545–554. doi: 10.1134/s1068162012050111
16. Viret F., Gonçalves A., Tarpin C., Chabannon C., Viens P. G-CSF en oncologie. *Bull. Cancer*. 2006; 93 (5): 463–471.  
Viret F., Gonçalves A., Tarpin C., Chabannon C., Viens P. G-CSF in oncology. *Bull. Cancer*. 2006; 93 (5): 463–471. [In French].

**Сведения об авторах:**

**Пыхтина М.Б.**, ORCID: 0000-0002-7808-9274, e-mail: pykhtina\_maria@mail.ru

**Романов В.П.**, ORCID: 0000-0003-4059-3165

**Мирошниченко С.М.**, ORCID: 0000-0002-6740-8241

**Беклемишев А.Б.**, д.б.н., ORCID: 0000-0001-9732-1246, e-mail: beklem@niibch.ru

**Information about authors:**

**Pykhtina M.B.**, ORCID: 0000-0002-7808-9274, e-mail: pykhtina\_maria@mail.ru

**Romanov V.P.**, ORCID: 0000-0003-4059-3165

**Miroshnichenko S.M.**, ORCID: 0000-0002-6740-8241

**Beklemishev A.B.**, doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0001-9732-1246, e-mail: beklem@niibch.ru