

Реферат роботи

Назва роботи: «Біфункціональні генно-іженерні кон'югати на основі білка А *Staphylococcus aureus* та їх застосування для афінної хроматографії та імунодіагностики»

Автор – к.б.н., с.н.с., звідувач лабораторії генно-інженерних біотехнологій ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України» Горбатюк Оксана Борисівна

Актуальність роботи. Сьогодні IgG людини – один із важливих класів біомолекул, що надзвичайно широко використовується для медицини та імунодіагностики. Їх очищення залишається важливою процедурою переробки крові для отримання життєво необхідних лікарських засобів. За традиційною технологією це здійснюється преципітацією етанолом. Окрім технологічних незручностей таке фракціонування є частково селективним і не дозволяє ефективно позбавлятися від небажаних домішок. Високопродуктивним та технологічним методом отримання IgG є афінна хроматографія. Використання сорбентів на основі білка А (SPA) забезпечує отримання фракції IgG людини і тварин з високим ступенем чистоти та без втрати функціональної активності препарату. SPA – білок молекулярною масою 42 кДа, який експресується на поверхні клітин патогенної бактерії *S. aureus*. SPA складається з п'яти високогомологічних IgG-зв'язувальних доменів (E, D, A, B, C), кожен з яких здатний специфічно взаємодіяти з Fc-доменами IgG різних видів тварин та людини. Завдяки здатності SPA зв'язуватись з IgG таким чином, що їх антиген зв'язувальний центр залишається вільним для взаємодії з антигеном широко використовується для детекції, очищення, сепарації та видалення антитіл, іммобілізації та очищення ферментів, а також детекції антигенів через антитіла, специфічні до них.

Для афінної хроматографії іммобілізацію білка А проводять таким чином, що імуноглобулінзв'язувальні домени залишаються відкритими для взаємодії

з антитілами. Одна молекула іммобілізованого білка А може зв'язати щонайменше дві молекули IgG. Перевагами SPA, як ліганда для афінної хроматографії, є висока конформаційна стійкість до дії фізико-хімічних чинників та протеаз; SPA зберігає свої функціональні властивості у широкому діапазоні рН (2,0 – 11,0) та здатність до рефолдингу після обробки денатуруючими розчинами сечовини або ГТХ. Афінна хроматографії на основі SPA дає змогу проводити очищення в одну стадію поліклональних і моноклональних антитіл із культуральних та асцитних рідин, сироваток крові. Також, такі афінні сорбенти використовують в клінічній практиці для імуносорбції аутоантитіл та циркулюючих імунних комплексів при системному кров'яному вовчаку, ревматоїдному артриті, онкологічних захворюваннях, трансплантації нирок. Сьогодні існує низка комерційно доступних сорбентів на основі SPA, однак їхнє масштабне використання обмежується високою собівартістю таких сорбентів.

Під час створення афінних сорбентів використовують різні стратегії іммобілізації білкових лігандів, SPA, на хроматографічних матрицях. Класичним методом є непряма іммобілізація на хімічно активованих матрицях (активація бромціаном, карбонілдімідазолом, N-гідроксисукцинімідом). Однак, використання таких матриць, в деяких випадках, призводить до неспецифічної іммобілізації ліганда і часткової втрати його функціональної активності. Крім цього, попит на сорбенти такого типу обмежується їхньою високою собівартістю.

Метою роботи було створення біфункціональних генно-інженерні кон'югатів на основі білка А *Staphylococcus aureus* для їх подальшого застосування для афінної хроматографії та різних типів імунодіагностики.

Результати.

1. Отримання та практичне застосування рекомбінантних білків SPA-CBD, SPACys, SPA-BAPmut

В роботі увагу було сконцентровано на створенні хроматографічного сорбенту нового типу, який базується на біоафінній іммобілізації ліганда на

матриці. Першим етапом цього дослідження було конструювання злитого білка SPA-CBD2. Виходячи з даних літератури важливою структурною особливістю CBD є просторова віддаленість N-кінцевої ділянки його молекули і активних центрів зв'язування з вуглеводним остовом целюлози. Оскільки, SPA складається з п'яти високогомологічних доменів, які володіють приблизно однаковими імуноглобулінзв'язувальними властивостями, конструювання злитого білка SPA-CBD2 проводили шляхом генно-інженерного злиття N- кінця CBD з C-кінцем SPA. Як міждоменний лінкер (між CBD-CBD та між CBD-SPA) використовували послідовність із 13 амінокислот «-Gly3-Ser-Glu-Gly3-Ser-Glu-Gly3-», роль якої полягла у просторовому розділенні афінних центрів злитого білка, та експонуванні центрів зв'язування SPA в положення оптимальне для взаємодії з імуноглобулінами. Для експресії SPA-CBD2 використовували систему продукції (pET-24/BL21(DE3)). Цільовий білок накопичувався в розчинній формі, вихід SPA-CBD2 складав понад 30 % від вмісту тотальних білків клітин, що складає 0,8 г / л E. coli при оптичній щільності $A_{600} = 12,8$.

Оскільки CBD зв'язується з целюлозою за рахунок гідрофобних взаємодій необхідною умовою було дослідження стабільності такого комплексу. У роботі та в результаті наших досліджень показано, що використання одного CBD призводило до часткового підтікання іммобілізованого біоліганда в умовах низьких рН (рН 3.0). Введення додаткового CBD, забезпечило формування більш стабільного комплексу з целюлозою при рН 2,0 – 3,8.

Властивості іммобілізованого на целюлозі SPA-CBD2, як біоафінного сорбенту було вивчено шляхом його використання для лабораторного очищення імуноглобулінів миші, кроля та людини. Нами показано можливість одностадійного очищення IgG із сироваток крові та асцитних рідин мишей

Дослідження формування комплексу білка А з імуноглобулінами показали, що гідрофобні взаємодії між α -спіраллю I SPA і Fc-доменами IgG (понад 80% вільної енергії зв'язування) відіграють головну роль у зв'язуванні

SPA с IgG, в той час як електростатичні між α -спираллю II SPA і Fc-доменами IgG (20 %) – визначають селективність SPA до різних підкласів IgG. Тому для посадки антитіл нами було використано буферні розчини з високою концентрацією солей, що забезпечило більш повне зв'язування IgG з SPA. Варто відмітити, що для сорбентів на основі іммобілізованого SPA, використовують більш м'які умови елюції, ніж у випадку використання інших афінних сорбентів (наприклад, сорбенти з іммобілізованим білком G). Це дозволило отримувати очищені фракції антитіл без суттєвих втрат їх функціональної активності. У випадку IgG миші (асцитні рідини, які є джерелом моноклональних антитіл) IgG1 та IgG 2a, IgG 2a були одержанні зниженням рН до 6.0; 4.5; 3.5 відповідно. Також відомо, що IgG1, IgG2, IgG4 людини взаємодіють з SPA з високою константою афінності $K_A = 10^8$ (M^{-1}), в той час як IgG3 демонструють слабе зв'язування з SPA. Це дозволяє проводити сепарацію IgG3 від решти підкласів IgG людини на сорбентах з іммобілізованим білком G.

Слід зазначити, що SPA-CBD2 іммобілізований на целюлозних мембранах, може бути використаний для проведення імунологічних тестів за принципом сандвіча (целюлоза - SPA-CBD2 - орієнтовано іммобілізовані специфічні поліклональні антитіла – антиген – виявлення імуного комплексу моноклональними антитілами кон'югованими (або scFv) із специфічною міткою).

Основними перевагами застосування SPA-CBD2 як біоліганда є: 1) целюлоза значно дешевша, ніж більшість комерційно доступних сорбентів, які використовуються в біотехнології; 2) SPA-CBD2 може бути отриманий в препаративних кількостях не дорогим бактеріальним синтезом; 3) целюлоза не вимагає хімічних модифікацій; 4) у випадку втрати біологічної активності SPA, останній може бути елюований з колонки за лужних умов. Це також може бути використано для санітаризації колонки і наступної іммобілізації нової порції SPA-CBD2; 5) очищення та іммобілізація SPA-CBD2 об'єднано в один етап, що знижує вартість сорбенту; 6) злитий рекомбінантний білок

SPA-CBD2 має високу афінність до різних типів целюлози та IgG; 6) CBD забезпечує орієнтовану іммобілізацію SPA на матриці, тому білок завжди іммобілізований у функціонально активній формі.

Генно-інженерне введення до послідовності SPA С-кінцевого залишку цистеїну забезпечило орієнтовану ковалентну іммобілізацію ліганда на малеїмід-активованому силікагелі. Отриманий афінний сорбент порівняно з SPA-CBD іммобілізованим на целюлозі мав вищу динамічну ємність (>10 мг IgG/мл сорбенту) та був стабільним у діапазоні рН 2,0 – 11,0 та за наявності у буфері 0,1 % твіну 20, твіну 80 або тритону X 100, 8 М сечовини, 6 М ГГХ, 70 % етанолу. Схематичне зображення різних способів іммобілізації CBD наведено на рис. 1

Окрім афінної хроматографії, перспективним є використання SPA, злитого з маркерною молекулою для імунодетекції. Під час вибору маркерної молекули наша увага була сконцентрована на таких характеристиках: висока ферментативна активність, широкий спектр комерційно доступних субстратів, висока термостабільність, невеликі розміри, можливість отримання бактеріальним синтезом та стабільність при кон'югації з іншими білками. Вибір було зупинено на лужній фосфатазі (AP - alkaline phosphatase), яку широко використовують при створенні імунокон'югатів. Важливою у виробництві імунокон'югатів є лужна фосфатаза ссавців (MAP - mammalian alkaline phosphatase), яка має значення k_{cat} близько 2000 s^{-1} , комбіноване значення фосфатазної та трансферазної активності (k_{cat} близько $3000 - 4000 \text{ s}^{-1}$) та значенням T_m близько $65 \text{ }^\circ\text{C}$. Імунокон'югати з MAP зазвичай одержують шляхом хімічної кон'югації. Бактеріальна лужна фосфатаза (BAP) є менш активною, ніж MAP, та має значення $k_{cat} = 65 - 80 \text{ s}^{-1}$, однак є більш зі значенням (T_m близько $95 \text{ }^\circ\text{C}$). Імунокон'югати з BAP можуть бути одержані як традиційною хімічною кон'югацією, так і більш зручним способом - генно-інженерним поєднанням послідовності BAP із послідовністю детектуючої молекули. Завдяки високій термостабільності, здатності до утворення генно-інженерних кон'югатів, а також можливість

їхнього ефективного одержання у активній формі бактеріальним синтезом ВАР є перспективною альтернативою МАР. У зв'язку з цим як маркерну молекулу нами було обрано ВАР з підвищеною каталітичною активністю (ВАРmut).

В результаті порівняльного аналізу структури активних центрів МАР та ВАР було визначено амінокислотні заміни, які значно підвищують каталітичну активність останньої. Наприклад, амінокислотні заміни D330N (аспарагінова кислота на аспарагін в положенні 300) та K328H (лізин на гістидин в положенні 328)/D330N підвищують ферментативну активність ВАР у 3 рази, D153H/K328H, D153H/K328H/D330N – у 8 раз, D153H/D330N – до 17 разів. Однак більшість з перерахованих мутацій одночасно зі зростанням ферментативної активності призводять до суттєвого зниження термостабільності фермента, що знижує цінність останнього як складової частини імунореагентів. В роботі визначені мутації, D330N/ D153G, які забезпечують зростання каталітичної активності ВАР в 17 - 40 разів (залежно від інкубаційного середовища) і при цьому не впливають на термостабільність ферменту. ВАР із зазначеними характеристиками було обрано для конструювання генно-інженерного кон'югату SPA-ВАРmut.

Зазвичай такі імунокон'югати отримують хімічним способом. Однак, хімічна кон'югація має ряд недоліків: 1) вимагає значної кількості очищених компонентів; 2) висока гетерогенність вихідного продукту; 3) необхідність очистки повнорозмірних кон'югатів від некон'югованих компонентів. В свою чергу, технологія рекомбінантних ДНК забезпечує створення генетичних конструкцій, які можуть бути використані для отримання химерних біфункціональних білків в *E.coli*. SPA-ВАРmut в системі експресії (pET-24/BL21(DE3)) накопичувався в розчинній формі. Його вихід складав понад 35 % від кількості сумарних білків клітин, що становить близько 0,82 г / л *E. coli* при $A_{600} = 16,3$. Поєднання очистки методом ІМАХ з наступною заміною буфера для елюції на оптимальний для ВАРmut, забезпечило

отримання високо очищеного SPA-ВАРmut без суттєвих втрат імуноглобулінзв'язувальної та фосфатазної активності.

Схему проведення імуноферментного аналізу з використанням SPA-ВАРmut наведено на рис. 1.

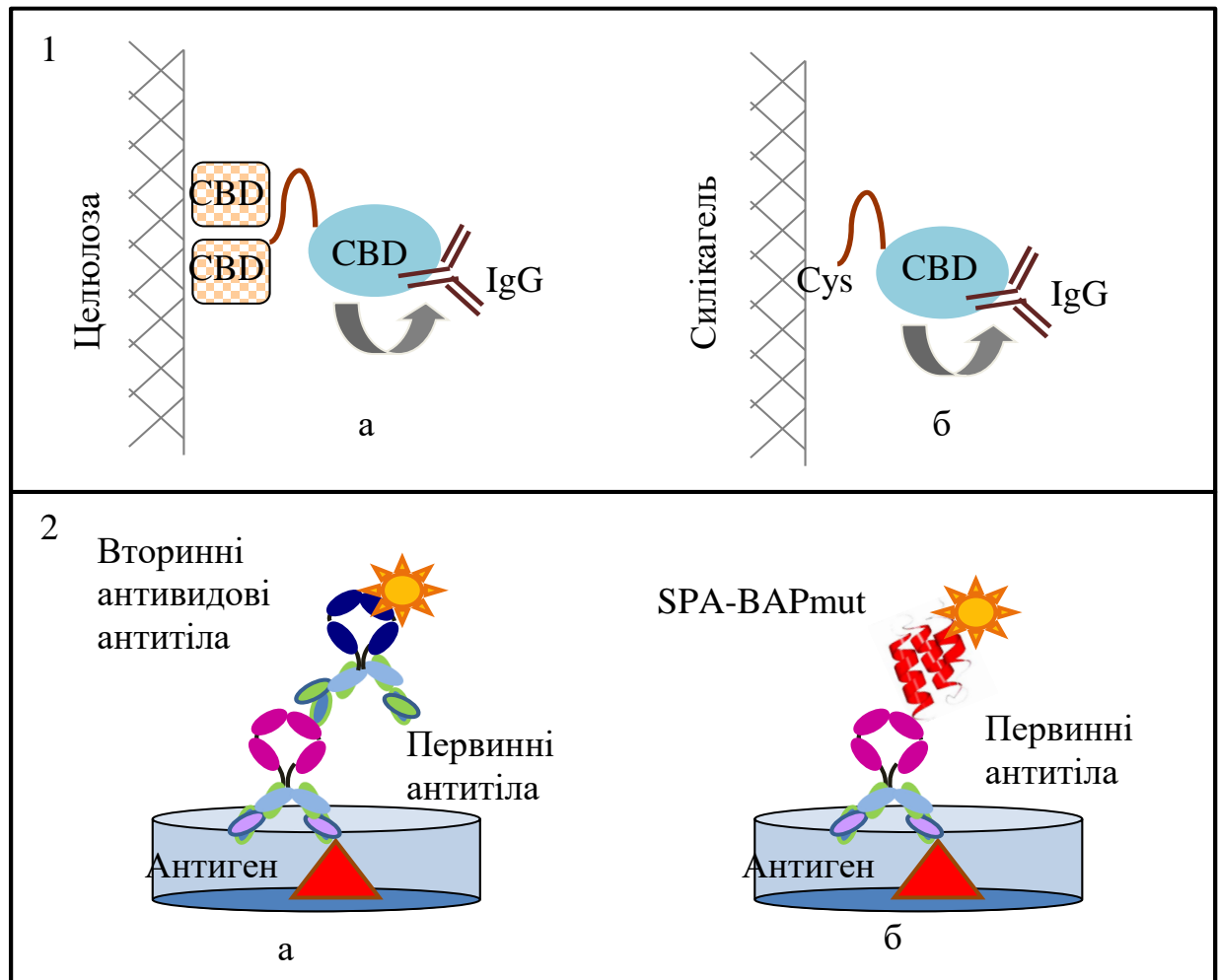


Рис. 7.1. Застосування SPA в афінній хроматографії та імунодіагностиці. 1– схематичне зображення афінного сорбенту на основі SPA, орієнтовано іммобілізованого за рахунок біоафінного зв'язування тандему «CBD-CBD» на целюлозі (а), та ковалентно орієнтовано іммобілізованого за рахунок С-кінцевого цистеїну на малеїмід-активованому силікагелі; 2 – використання SPA-BAPmut як вторинного імунореагента: у кожному окремому випадку використовують специфічні антивидові вторинні антитіла (а) як універсальний вторинний імунореагент використовується генно-інженерний імунокон'югат SPA-BAPmut (б)

Використання SPA-ВАРmut дозволяє виявляти методом дот-блот аналізу менше 10 нг антигену з використанням колориметричних субстратів та 0,2 нг у випадку хемілюмінісцентних субстратів. Крім того, на відміну від більшості імуноферментних систем детекції (де використовують специфічні антивидові антитіла, які несуть мітку), використання SPA-ВАРmut розширює робочий діапазон первинних антитіл (людини, миші, кроля, морської свинки, бика).

2. Характеристика біоселективного елемента імуносенсора на основі рекомбінантного білка А *Staphylococcus aureus* з С-кінцевим залишком цистеїну SPA-Cys

Метою даного етапу роботи було вивчення особливостей формування біоселективного елемента на основі SPA-Cys для виявлення імуноглобулінів за допомогою ППР-спектрометр "Плазмон".

Для іммобілізації SPA-Cys на золотій поверхні ППР-спектрометра "Плазмон-4м", очищений рекомбінантний SPA-Cys вносили у вимірювальну комірку і проводили інкубацію. Це призводило до значного збільшення відгуку біосенсора.

Після промивання проточної комірки буфером PBS спостерігалось незначне зменшення сигналу біосенсора. Це означає, що більшість молекул SPA-Cys були специфічно іммобілізовані на золотій поверхні біосенсора. Різниця між сигналами перед введенням 120 мкл 1 мкМ SPA-Cys і після промивання PBS було майже 0.12 кутових градусів. Це вказує на високу степінь надійності іммобілізації SPA-Cys.

Лінійна залежність ступеня іммобілізації SPA-Cys від його концентрації спостерігалася в діапазоні від 0 до 0,5 мкМ SPA-Cys. Нанесення SPA-Cys в концентрації 2 мкМ – значення близьке до насичення іммобілізації. Відповідно до коефіцієнта перетворення ППР-відповіді значення поверхневої щільності іммобілізованого білка, при 2 мкМ концентрації SPA-Cys становило $1,1 \pm 0,2$ нг /мм². Враховуючи, що молекулярна маса SPA-Cys (34,5 кДа), було розраховано, що в середньому на одну молекулу іммобілізованого SPA-Cys припадає приблизно 51 нм² поверхні біосенсора. Це свідчить про те,

що SPA-Cys не формує суцільного білкового моношару. У зв'язку з цим, виникає необхідність ефективного блокування місць неспецифічної сорбції на поверхні сенсора.

Застосування BSA як блокуючого агента не дало задовільного результату: відгук сенсора після трьох послідовних додавань BSA у вимірювальну комірку змінювався всього на $\sim 0,08$ кутових градусів. Щільність посадки BSA становила лише $\sim 0,8$ нг / мм². Навіть враховуючи більший розмір молекули BSA, середнє значення 41 нм² поверхні датчика на кожному іммобілізовану білкову молекулу вказує на досить велику площу вільної поверхні біосенсора.

Застосування HSA як блокуючого агента дало ще більш незадовільні результати. Після чотирьох послідовних додавань HSA у вимірювальну комірку відгук біосенсора змінювався всього на $\sim 0,7$ нг / мм² ($\sim 0,07$ кутовий градусів).

На відміну від альбумінів, білки молока (розчин сухого знежиреного молока) продемонстрували високу блокувальну ефективність. Проте, через декілька циклів використання біосенсора, блокувальний ефект білків молока знижувався і спостерігалася неспецифічна сорбція IgG.

Тому було досліджено блокувальну ефективність желатину. Після чотирьох послідовних додавань желатину, його поверхнева щільність становила $\sim 3,3 \pm 0,1$ нг / мм² ($\sim 0,33$ кутових градусів). Це значення вказує на досить густий білковий моношар і високу степінь блокування неспецифічних місць зв'язування.

Для перевірки імуноглобулінзв'язувальної активності іммобілізованих молекул SPA-Cys проводили зв'язування з IgG. Сенсограма показує, що додавання 10 мкг/мл IgG викликає відгук біосенсора. Додавання інших білків (40 мкг/мл BSA або 40 мкг/мл HSA) не викликали помітних змін відгуку біосенсора. Оскільки HSA присутній в зразках крові, важливою характеристикою є те, що HSA не взаємодіє з SPA-Cys та блокуючим шаром. Таким чином, створений біоселективний елемент ППР біосенсора на основі

рекомбінантного білка SPA-Cys і блокування місць неспецифічного зв'язування за допомогою желатину забезпечують високу селективність зв'язування IgG.

Для подальшого використання розробленого біоселективного елемента, необхідно було розробити ефективну схему його регенерації. Це забезпечується за рахунок застосування розчинів, які змінюють рН та/або іонну силу всередині вимірювальної комірки, змінюючи заряд взаємодіючих молекул.

Після обробки біоселективного елемента, з іммобілізованими IgG, розчином 40 мМ цитрату натрію (рН 2,5), рівень відгуку біосенсора повністю повернувся до вихідного значення (до внесення IgG).

Отримані дані свідчать про ефективну регенерацію біосенсора. Додавання нових зразків IgG показали, що така процедура регенерації істотно не вплинула на рівень імуноглобулін-зв'язуючої активності іммобілізованого SPA-Cys. Таким чином, показана можливість повторного використання біоселективного елемента, утвореного на основі SPA-Cys.

Залежність відгуку біосенсора при додаванні IgG в діапазоні концентрацій (від 2 до 10 мкг/мл) після іммобілізація 1 мкМ SPA-Cys (поверхнева щільність $\sim 0,6$ нг/мм²) та блокування сайтів неспецифічної сорбції желатином показана на рисунку 2.2.4.

Лінійна залежність відгуку сенсорна в діапазоні концентрацій IgG (від 2 до 10 мкг/мл) дозволить проводити визначення концентрації IgG в експериментальних зразках за допомогою калібрувальної кривої.

Для перевірки чутливості розробленого біосенсора, було проаналізовано п'ять розчинів з різними концентраціями IgG. Встановлено, що експериментально визначена концентрація практично співпадала з реальною концентрацією IgG у зразках. Коефіцієнт кореляції становив ($R^2 = 0,97$).

Висновки.

1. Сконструйовано рекомбінантні білки SPA-CBD, SPA-CBD₂, SPA-Cys, SPA-ВАРmut та штами-продуценти для їх отримання в розчинній формі експресією в *E. coli*. Вихід SPA-CBD становив 500 мг/л, SPA-CBD₂ – 720 мг/л, SPA-Cys – 980 мг/л, SPA-ВАРmut – 860 мг/л культури *E. coli*.
2. Показано ефективність використання іммобілізованих SPA-CBD, SPA-CBD₂ на целюлозі та SPA-Cys на силікагелі як афінних сорбентів для хроматографічного очищення полі- та моноклональних антитіл тварин і людини з високим ступенем чистоти (>95 %), а також для фракціонування на підкласи IgG миші. Уведення додаткового CBD забезпечило більш афінну іммобілізацію SPA на полісахаридній матриці.
3. Показано можливість застосування SPA із С-кінцевим залишком цистеїну (SPA-Cys), після іммобілізації на золотій сенсорній поверхні біосенсора, як проміжного елемента імуносенсора, для орієнтованої іммобілізації антитіл проти різноманітних антигенів, а також для виявлення IgG в сироватці крові.
4. Визначено можливість використання SPA-ВАРmut як універсального вторинного імунореагента, що дозволяє детектувати менше 0,2 нг антигену.

Статті

1. Bakhmachuk A., Gorbatiuk O., Rachkov A., Dons'koi B., Khristosenko R., Ushenin I., Peshkova V., Soldatkin A. Surface Plasmon Resonance Investigations of Bioselective Element Based on the Recombinant Protein A for Immunoglobulin Detection. *Nanoscale Res Lett.* - 2017 Dec;12(1):112. Epub 2017 Feb 10. DOI: 10.1186/s11671-017-1903-5.
2. McLaughlin K., Folorunso A.O., Deeni Y.Y., Foster D., Gorbatiuk O., Hapca S.M., Immoor C., Koza A., Mohammed I.U., Moshynets O., Rogalsky S., Zawadzki K., Spiers A.J. Biofilm formation and cellulose expression by *Bordetella avium* 197N, the causative agent of bordetellosis in birds and an opportunistic respiratory pathogen in humans. *Res Microbiol./ Res Microbiol.*, V. 168, № 5.- 2017., P. 419-430. DOI: 10.1016/j.resmic.2017.01.002.
3. Gorbatiuk O. B., Bakhmachuk A. O., Dubey L. V., Usenko M. O., Irodov D. M., Okunev O. V., Kostenko O. M., Rachkov A. E., Kordium V. A. Recombinant Staphylococcal protein A with cysteine residue for preparation of affinity chromatography stationary phase and immunosensor applications. *Biopolym. Cell.* - 2015. – V.31. – P.115-122. DOI: 10.7124/bc.0008D5.
4. Voitovich, T. Lebyedyeva, A. Rachkov, O. Gorbatiuk, P. Shpylovyy Anodic Alumina-Based Nanoporous Coatings for Sensory Applications *Springer Proceedings in Physics*, 2015, pp 423-431, DOI: 10.1007/978-3-319-18543-9_29
5. Gorbatiuk O. B., Okunev O. V., Nikolaev Yu. S., Svyatenko O. V., Kordium V. A. Construction, expression, functional characterization and practical application of fusion protein SPA-BAPmut. *Biopolymers and Cell.* -2013. -V.29. P. 49-54. DOI: 10.7124/bc.000805.
6. A. E. Rachkov, A. O. Bakhmachuk, O. B. Gorbatiuk, M. J. Matsishin, R. V. Khristosenko, Iu. V. Ushenin, A. P. Soldatkin SPR investigations of the formation of intermediate layer of the immunosensor bioselective element based on the recombinant Staphylococcal protein A *Biopolymers and Cell.* 2015. Vol. 31. N 4. P. 301–308 doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0008EF>
7. Gorbatiuk O. B., Tsapenko M. V., Pavlova M. V., Kordium V. A. Bioaffinity sorbent based on immobilized protein A *Staphylococcus aureus*: development and application. *Biopolymers and Cell.* 2012; 28(2): 141-148. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000041>
8. O. V. Sviatenko, O.B. Gorbatiuk ,O. A. Vasylchenko Application of immunoglobulin-binding proteins a, g, l in the affinity chromatography *Biotechnologia Acta* V. 7, No 2, 2014. P. 34 – 45.
9. Bakhmachuk A. O., Gorbatiuk O. B., Palyvoda O. G., Dons'koi B. V., Rachkov A. E., Soldatkin A. P. Study on interactions of human IgG with immobilized anti-IgG or recombinant Staphylococcal protein A using surface plasmon resonance spectrometry. *Biopolym. Cell.* 2016; 32(1):54-60. DOI: 10.7124/bc.00090D.
10. A.O. Bakhmachuk, O.B. Gorbatiuk, A.E. Rachkov, A.P. Soldatkin Study on efficiency of oriented immobilization of antibodies on the SPR sensor surface using Staphylococcal protein A or its recombinant analogue *Biopolym. Cell.* 2020; 36(4):271-278. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A32>

Тези

1. Gorbatiuk O. A new bioaffinity sorbent for purification of antibodies / O. Gorbatiuk, M. Tsapenko // 4th International Life Sciences Students' Conference: Materials Conference (Nijmegen, The Netherland, November 10 – 14, 2010) – 2010. – P. 41-42.
2. Горбатюк О.Б. Одержання злитого білка SPA-CBD₂ та його застосування для створення афінного сорбенту / О.Б. Горбатюк, М.В. Цапенко // X Український біохімічний з'їзд: Укр. біохім. журн. (Одеса 13 – 17 вересня, 2010 р.) – 2010. – Т. 82, №4 (додаток 1). – С. 203 - 204.

3. Горбатюк О.Б. Створення біоафінного сорбенту для очищення імуноглобулінів / О.Б. Горбатюк, М.В. Цапенко // Науково-практична конференція “Генетична і регенеративна медицина: проблеми та перспективи”: Журнал НАМН України (Київ, 14 – 15 жовтня, 2010 р.) – 2010 – Т.16 (додаток 2010). – С. 37.
4. Отримання злитого білка SPA-ВАРmut та його використання для імуноаналізу / О.Б. Горбатюк, О.В. Окунєв, М.В. Павлова // Науково-практична конференція з міжнародною участю “Актуальні проблеми регенеративної медицини”: Журнал НАМН України (Київ, 4 – 5 жовтня, 2012) – 2012. – Т.18, (додаток 2012). – С. 40.
5. Gorbatiuk O. Obtaining of recombinant protein SPA-Cys and its application for affinity chromatography / O. Gorbatiuk // FEBS Advanced Lecture Course “Sofia School of Protein Science: Structure and Dynamics of Biological Macromolecules”: Materials Conference (Sofia, Bulgaria September 9 – 14, 2012) – 2012. – P. 65.
6. Gorbatiuk O. Obtaining of recombinant fusion proteins SPA-CBD₂, SPA-Cys, SPA-ВАРmut and their application for affinity chromatography or in immunoassays / O. Gorbatiuk // IX Jakub K. Parnas Conference “Proteins from Birth to Death” Materials Conference: (Jerusalem, Israel, September 29 – October 2, 2013) – 2013. – P. 63.
7. O. Gorbatiuk, O. Okunev, M. Ysenko, V. Kordium High performance affinity media based on oriented immobilized staphylococcal protein A for purification of antibodies. Abstract book of 30th International Symposium on Chromatography, 14-18 September 2014, Salzburg, Austria, P. 81.
8. Recombinant protein A-based layer as bioselective element of SPR biosensor for determination of IgG concentration or step for development of immune biosensor for antigen detection / A. Bakhmachuk, O. Gorbatiuk, A. Rachkov, A. Soldatkin // 14th Horizons in Molecular Biology. International PhD Student Symposium and Career Fair for Life Science 11 – 14 September 2017 Gottingen, Germany, p. 81.
9. Bakhmachuk A.O., Gorbatiuk O.B., Dons’koi B.V., Rachkov A.E., Soldatkin A.P. Influence of cross-linking reagents on the operation parameters of bioselective elements of SPR immunosensor based on intermediate layer of recombinant Staphylococcal protein A, Abstract book of International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2018), 27-30 August 2018, Kyiv, Ukraine, p. 70.
10. Bakhmachuk A.O., Gorbatiuk O.B., Dons’koi B.V., Rachkov A.E., Soldatkin A.P. Method for determination of IgG concentration using recombinant protein A as bioselective component of SPR biosensor / 15th Horizons in Molecular Biology, International PhD Student Symposium and Career Fair for Life Sciences, 10th-13th September 2018 Göttingen, Germany, p. 195

Патенти

1. Патент на корисну модель №65123 Україна, МПК 2012.01 C12N 15/00. Модифікований генно-інженерний злитий білок SPA-CBD₂, продукований бактеріями *E. coli* / Кордюм В. А., Павлова М.В., Цапенко М.В., Горбатюк О.Б (Україна) – № u4201106054; заявл. 05.08.2011; опубл. 10.02.2012, Бюл. №22. – с.7.
2. Патент на винахід №102135 Україна, МПК (2013.01) C07K 19/00. Модифікований генно-інженерний злитий білок SPA-CBD₂, продукований бактеріями *E. coli*, ДНК розміров 1970 п.н. модифікованого генно-інженерного злитого білка SPA-CBD₂, плазмідний експресуючий

вектор з геном модифікованого генно-інженерного злитого білка SPA-CBD₂, продуцент модифікованого генно-інженерного злитого білка SPA-CBD₂, штам *E. coli* BL21 SPA-CBD₂, спосіб одержання модифікованого генно-інженерного злитого білка SPA-CBD₂ продуцентом штаму *E. coli* BL21 SPA-CBD₂, спосіб одержання біоафінного сорбенту для очищення імуноглобулінів на основі модифікованого генно-інженерного злитого білка SPA-CBD₂, використання біоафінного сорбенту з іммобілізованим модифікованим генно-інженерним злитим білком SPA-CBD₂ для очищення імуноглобулінів із складних сумішей / Кордюм В.А., Павлова М.В., Цапенко М.В., Горбатюк О.Б.(Україна) – № а201109751; заявл. 05.08.2011; опубл. 10.06.2013, Бюл. №11. – с.22.