

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

ИНСТИТУТ БИОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук

на правах рукописи

Есипов Роман Станиславович

**МЕТОДОЛОГИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ
ПЕПТИДОВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

Специальность 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени

доктора химических наук

Научный консультант:

академик РАН А.И. Мирошников

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	9
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1. Экспрессионные векторные системы <i>E.coli</i>	14
1.1. Транскрипционные регуляторные элементы векторов	15
2. Гибридные белки.....	23
2.1. Вспомогательные последовательности	23
2.1.1. Аффинные метки	23
2.1.2. Углевod-связывающие пептиды	28
2.1.3. Неаффинные последовательности	30
2.1.4. Лидерные последовательности	33
2.1.5. Использование специфических протеаз.....	34
2.2. Интеин-содержащие системы	38
2.2.1. Белковый сплайсинг.....	38
2.2.2. Особенности первичной структуры интеинов	38
2.2.3. Канонический механизм белкового сплайсинга	39
2.2.4. Альтернативный механизм белкового сплайсинга для интеинов, содержащих аланин на N-конце.....	41
2.2.5. Факторы, влияющие на процесс белкового сплайсинга.....	42
2.2.6. Системы очистки рекомбинантных белков на основе интеинов.....	43
2.2.7. Интеин-опосредованное лигирование белков	48
2.2.8. Модернизированные системы интеин-опосредованного выделения белков на основе полигидроксibuтиратных гранул и эластин-подобных пептидов	50
3. Штаммы-продуценты рекомбинантных белков	52
3.1. Штаммы <i>E. coli</i> со сниженной протеолитической активностью и способные к посттрансляционной модификации рекомбинантных белков	54
3.2. Оптимизация рекомбинантных генов по составу кодонов и повышение эффективности трансляции	57
3.3. Растворимость и образование дисульфидных связей рекомбинантных белков	60
4. Заключение	68
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	70
1. Реактивы.....	70
2. Ферменты	70
3. Бактериальные штаммы и плазмидные векторы.....	70
4. Материалы	71
5. Лабораторное оборудование	71
6. Методы исследования.....	72
6.1. Стандартные методики	72
6.2. Аналитическая ОФ ВЭЖХ	72
6.3. Определение остаточной ДНК штамма-продуцента.	73
6.4. Буферные растворы и культуральные среды.....	73
6.5. Получение TEV-протеазы	76
6.6. Выделение и очистка фрагмента тумстатина	77

6.7. Разработка технологии получения тимозина $\alpha 1$	80
6.8. Получение тимозина $\beta 4$	85
6.9. Получение рекомбинантного глюкагона	88
6.10. Получение дезирудина и лепирудина	90
6.11. Получение пуротоксина-1	93
6.12. Получение АРНСЗ (пепталгина).....	96
6.13. Получение [44 – 77] фрагмента PEDF (пигастина).....	98
6.14. Получение оксинтомодулина	101
6.15. Получение окситоцина	103
6.16. Получение [1-49] фрагмента эндостатина	104
6.17. Получение эпидермального фактора роста человека	105
6.18. Разработка биотехнологии получения рекомбинантных тимозина $\alpha 1$ и тимозина $\beta 4$ с ацетилированием <i>in vivo</i>	107
6.19. Сиалирование дезацетилтимозина $\beta 4$ и оксинтомодулина	108
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	111
1. Разработка методологических подходов получения рекомбинантных полипептидов посредством интеиновых технологий	112
1.1. Разработка экспрессионной системы на основе интеинов для получения полипептидов с N-концевым серином на примере тимозина- $\alpha 1$ человека	112
1.2. Разработка интеин-опосредованного подхода получения рекомбинантных полипептидов с большим содержанием цистеинов на примере рекомбинантного окситоцина	115
1.3. Разработка концепции сопряженного фолдинга интеинового домена и целевого пептида в составе гибридного белка на примере эпидермального фактора роста человека.....	119
2. Разработка биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов с использованием TEV протеазы.....	124
2.1. Получение рекомбинантной TEV протеазы	124
2.2. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного модифицированного фрагмента тумстатина человека – основного компонента лекарственного средства «Тумастин».....	125
2.3. Биотехнология получения тимических пептидов с использованием химического ацетилирования	129
2.3.1. Разработка технологии получения активной фармацевтической субстанций тимозина альфа-1.....	130
2.3.2. Разработка технологии получения активной фармацевтической субстанций тимозина $\beta 4$	133
3. Разработка биотехнологии получения рекомбинантных тимозина- $\alpha 1$ и тимозина- $\beta 4$ с процессом ацетилирования <i>in vivo</i>	139
4. Разработка биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов с использованием интеиновых структур	141
4.1. Разработка биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов с антитромбической активностью – дезирудина и лепирудина	143
4.2. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного фрагмента эндостатина (1-49) обладающего антиангиогенной активностью	147

4.3. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного модифицированного фрагмента фактора дифференцировки пигментного эпителия человека – основного компонента лекарственного средства «Пигастин».....	149
4.4. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного оксинтомодулина.....	154
5. Получение модифицированных рекомбинантных полипептидов с улучшенными фармакологическими свойствами.....	156
6. Разработка промышленной биотехнологии получения рекомбинантных полипептидов на основе интеиновых систем.....	158
6.1. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции на основе рекомбинантного глюкагона – лекарственного средства «Глюкоран»	158
6.2. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного пуротоксина 1 – основного компонента лекарственного средства «Пунальгин»	171
6.3. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного обезболивающего полипептида АРНСЗ – основного компонента лекарственного средства «Пептальгин»	175
6.4. Разработка биотехнология получения активной фармацевтической субстанции и лекарственного гипергликемического средства «Оксинтолонг» на основе конъюгата биосинтетического оксинтомодулина человека и полисиаловой кислоты	180
7. Получение готовых лекарственных форм	186
7.1. Получение лекарственной формы глюкогена – глюкорана	186
7.2. Приготовление готового лекарственного средства Оксинтолонг	187
8. Методы технологического контроля и анализа конечного продукта	188
8.1. Аналитические методы, используемые при разработке биотехнологии	188
8.2. Аналитические методы контроля технологического процесса	189
8.3. Методы контроля конечного продукта	189
8.4. Тестирование биологической активности рекомбинантных полипептидов	190
ВЫВОДЫ	192
БЛАГОДАРНОСТИ	194
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	195

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.о.	–	Аминокислотные остатки
атм	–	Атмосфера
АФС	–	Активная фармацевтическая субстанция
БРИКС/BRICS	–	Группа из пяти стран Бразилия, Россия, Индия, Китай, Южно-Африканская Республика.
БСА (BSA)	–	Бычий сывороточный альбумин
ГЛС	–	Готовое лекарственное средство
ГЛФ	–	Готовая лекарственная форма
ДГФР	–	Дегидрофолатредуктаза
ДМФА	–	N,N-диметилформамид
ДНК	–	Дезоксирибонуклеиновая кислота
Долл	–	Доллар
ДСН/SDS	–	Додецилсульфат натрия
ДТТ/DTT	–	Дитиотреитол
ед	–	Единицы
ИПТГ	–	Изопропилтио- β -D-галактозид
ИФА	–	Иммуноферментный анализ
кДа	–	Килодальтон
л	–	Литр
ЛАЛ-тест	–	«Лизат амебоцитов люмулуса» - метод определения бактериальных
LAL-тест	–	эндотоксинов
М	–	Моль/л
мг	–	Миллиграмм
МЕ	–	Международная единица активности
мин	–	Минута
мл	–	Миллилитр
мл/мин	–	Миллилитры в минуту
млрд	–	Миллиард
мМ	–	Миллимоль/л
мРНК	–	Матричная РНК
нМ	–	Наномоль/л
нм	–	Нанометр
нп	–	Пар нуклеотидов
об/мин	–	Обороты в минуту
ОБП ИБХ РАН	–	Опытное Биотехнологическое производство ИБХ РАН
ОФ ВЭЖХ	–	Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
ПААГ	–	Полиакриламидный гель
пмоль	–	Пикомоль
ПСК	–	Полисиаловая кислота
ПЦР	–	Полимеразная цепная реакция
ПЭГ	–	Полиэтиленгликоль
РНК	–	Рибонуклеиновая кислота
T α 1/Thym	–	Тимозин α 1
T β 4/TV4	–	Тимозин β 4

ТЕМЕД	–	N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
Трис	–	Трис(гидроксиметил)метиламин
ТФУ/ТФА	–	Трифторуксусная кислота
ФСП	–	Фармакопейная статья предприятия
цАМФ	–	Циклический аденозин-5-монофосфат
ч	–	Час
EDTA	–	Этилендиаминтетрауксусная кислота
6xHis	–	Последовательность из 6 гистидинов
AlaAcTr/	–	Аланиновая N-ацетилтрансфераза (ген RimJ)
Amp	–	Антибиотик ампициллин
АРНС3/І3	–	Токсин из морской тропической анемоны <i>Heteractis crispa</i> , пептальгин
ara	–	Арабиноза
АТФ	–	Аденозин-5-трифосфат
BNP	–	Мозговой натрийуретический пептид человека
CAI	–	Индекс адаптации кодонов (Codon Adaptation Index)
CBD	–	Хитин-связывающий домен
CelBD	–	Целлюлозо-связывающий домен (cellulose-binding domain)
CHAPS	–	3-(3-Холаמידопропил) диметиламмоний-3-пропансульфонат
СМА	–	Карбоксиметиласпартат
c-мус	–	Фрагмент протоонкогенного белка Мус
СРР	–	Cell-penetrating peptide
CV	–	Объем колонки (column volume)
desAcTb4	–	Дезацетилтимозин β4
dNTP	–	2-дезоксирибонуклеозид-5-трифосфат
Dsb	–	Дисульфидизомерза
DUB	–	Убиквитин-специфичные протеазы (deubiquitylating enzymes)
<i>E.coli</i>	–	<i>Escherichia coli</i>
EKL	–	Легкая цепь энтерокиназы (enterokinase light chain)
ELP	–	Эластин-подобные полипептиды
Endo	–	Эндостатин
ESI-TOF	–	Электроспрей ионизация с времяпролетной масс-спектрометрией
FDA	–	The Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов — агентство Министерства здравоохранения и социальных служб США
GB1	–	Белок домена GB1
GFP	–	Зеленый флуоресцирующий белок
GLP-1	–	Глюкагоноподобный пептид-1
Glu/Gl	–	Глюкагон
gor	–	Глутатионредуктаза
GSH	–	Глутатион восстановленный
GSSG	–	Глутатион окисленный
GST	–	Глутатион S-трансфераза
hEGF	–	Эпидермальный фактор роста человека
hIFNalpha-4	–	Интерферон альфа-4 человека

HIR	–	63-десульфатогирудин-1
HIRLep	–	[Leu1-Thr2]-десульфатогирудин-1
His	–	Гистидин
hNT3	–	Нейротрофин-3 человека
IBs	–	Тела включения
Ic	–	С-концевой фрагмент интеина
IDA	–	Иминодиуксусная кислота
IMAC	–	Металл-аффинная хелатная хроматография
In	–	N-концевой фрагмент интеина
lac	–	Лактоза
LB	–	Среда Luria-Bertani
MALDI-TOF	–	Время-пролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (Time-of-flight matrix-assisted laser desorption/ionization)
MBP	–	Мальтозо-связывающий белок
MCS	–	Multiple cloning site, последовательность, содержащая сайты узнавания рестриктаз
MESNA	–	2-меркаптоэтансульфоная кислота
<i>MthRIR1</i>	–	Интеин RIR1 из <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>
Mw	–	Молекулярная масса
<i>MxeGyrA</i>	–	Интеин GyrA из <i>Mycobacterium xenopi</i>
MYLK/MLCK	–	Киназа легкой цепи миозина
NaCNBH ₃	–	Цианборгидрид
NEB	–	New England Biolabs
NTA	–	Нитрилотриуксусная кислота
NTP	–	Нуклеозид-5'-трифосфат
OD ₆₀₀	–	Оптическое поглощение при 600 нм
ori	–	Точка начала репликации
Oxm	–	Оксинтомодулин
Oxy	–	Окситоцин
PEDF/PGS	–	Фактор дифференцировки пигментного эпителия (pigment epithelium-derived factor)
PhaP	–	Фазины
PHB	–	Полигидроксибутират
pI	–	Изоэлектрическая точка
PMSF	–	Фенилметилульфонилфторид
PT1	–	Токсин из среднеазиатского паука-«волка» <i>Alopecosa marikovskiyi</i> , пуротоксин-1
RBS	–	Сайт связывания рибосомы
rha	–	Рамноза
RhaR	–	Транскрипционный активатор рамнозного промотора
RhaS	–	Транскрипционный активатор рамнозного промотора
RUB1	–	Представитель семейства убиквитин-подобных белков
SARS-CoV	–	Коронавирусный тяжелый острый респираторный синдром (Severe acute respiratory syndrome coronavirus)
SBP	–	Стрептавидин-связывающий пептид
<i>SceVMA</i>	–	Интеин VMA из <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

SerAcTr	–	Сериновая N-ацетилтрансфераза <i>E.coli</i> (ген RimL)
SET	–	Повышающие растворимость вспомогательные последовательности (solubility-enhancing tag)
SICLOPPS	–	Split Intein-mediated Circular Ligation Of Peptide and proteins
Skp	–	17 кДа белок (Seventeen kilodalton protein)
S-S	–	Дисульфидная связь
<i>SspDnaB</i>	–	Мини-интеин DnaB из <i>Synechocystis sp.</i>
Strep	–	Стрептавидин
SUMO	–	Убиквитин-подобные малые молекулы (Small ubiquitin-modifier)
tag	–	Вспомогательная последовательность, пришитая к целевому белку
TAP	–	Тандемная аффинная хроматография (tandem affinity purification)
TEMED	–	Тетраметилэтилендиамин
TEV	–	Протеаза вируса гравировки мозаики табака
TEV-протеаза	–	Tobacco etch virus (TEV) protease, протеаза вируса гравировки табака
TF5	–	Термостабильная фракция 5 из тимусовой железы телёнка
TIR	–	Скорость инициации трансляции
trp	–	Триптофан
Trx	–	Тиоредоксин
trxB	–	Тиоредоксинредуктаза B
Tum/TMS	–	Тумстатин
Ub	–	Убиквитин
UBLs	–	Убиквитин-подобные белки (ubiquitin-like proteins)
UBP1	–	Убиквитин-специфическая протеаза
URM1	–	Представитель семейства убиквитин-подобных белков
X-Gal	–	5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид

ВВЕДЕНИЕ

Возникновение и стремительное развитие генной инженерии с середины 70-х годов XX-го века радикально изменило характер исследований по многим биологическим направлениям. Разработанные методы клонирования фрагментов ДНК, методы установления первичной структуры генов, а также метод полимеразной цепной реакции дали колоссальный импульс к развитию как фундаментальных, так и прикладных исследований. Благодаря этим методам ученые получили возможность проведения целенаправленных манипуляций с генетическим материалом, создания новых гибридных (рекомбинантных) генов. Фундаментальные исследования по изучению экспрессии генов, механизмов их регуляции и установлению структурных особенностей генетического аппарата клетки достаточно быстро приобрели выраженную прикладную направленность.

Технологии рекомбинантных ДНК, позволяющие экспрессировать чужеродные гены в клетках различных организмов, стали одним из важнейших научных достижений конца XX-го века, заложили фундамент современной биотехнологии и явились краеугольным камнем нового научного направления – молекулярной биотехнологии. Внедрение новых препаратов на основе рекомбинантных белков в диагностических или терапевтических целях по своей значимости для практического здравоохранения сопоставимо с открытием антибиотиков или разработкой вакцин.

В современной медицинской практике широкое применение для диагностики и терапии нашли биофармацевтические препараты на основе белков и пептидов, получаемые генно-инженерными способами. Создание генно-модифицированных микроорганизмов стало базой для развития современных направлений в прикладной биотехнологии, направленных на разработку ценных для практической медицины белков и пептидов. Вместе с вопросами генетической трансформации организма необходимо было решать вопросы эффективного биосинтеза, возможных посттрансляционных модификаций и создания новых штаммов. При разработке биотехнологии выбор нового хозяина определяется не только способностью к биосинтезу нового белка в организме, но и эффективностью его культивирования и простотой выделения целевого продукта. Ярким примером первого успешного практического применения технологии рекомбинантных ДНК в области молекулярной эндокринологии явилось производство в начале 80-х гг. XX века инсулина человека компанией Genentech с использованием прокариотической системы экспрессии [1].

За прошедшие 40 лет биофармацевтическая промышленность стала одним из основных драйверов современного развития индустрии высоких технологий в развитых странах. Так, в США фармацевтическая промышленность вкладывает не менее 15 – 20% доходов, что

составляет около 50 млрд. долл., в инновационные исследовательские разработки. Только за последние 5 лет для медицинского применения в Европе были зарегистрированы и разрешены к применению более 100 новых биофармацевтических препаратов: 68 моноклональных антител, 23 гормона, 16 факторов свертывания крови, 9 ферментов, 7 вакцин, 5 продуктов на основе нуклеиновых кислот и 4 продукта на основе клеточных культур. Из 155 одобренных биофармацевтических продуктов 81 (52%) были действительно инновационными, а остальные представляли собой биоаналоги: 97 препаратов были зарегистрированы и разрешены к применению в Соединенных Штатах, в то время как 109 препаратов получили одобрение на использование в Европейском Союзе [2].

Стратегическим документом, определяющим политику Российской Федерации в биотехнологическом секторе экономики, является Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года. В 2018 г. было выпущено распоряжение Правительства РФ № 337-р от 28 февраля об утверждении плана мероприятий «Развитие биотехнологий и генной инженерии» на 2018 – 2020 гг. Целями данной Комплексной программы развития биотехнологий в РФ на период до 2020 года «являются развитие внутреннего спроса, производства и экспорта биотехнологической продукции, а также формирование институциональных условий для проведения глубокой модернизации технологической базы промышленности за счет массового внедрения в производство методов и продуктов биотехнологий». А реализация осуществляется как путем реализации общесистемных мер развития сферы биотехнологий, так и мероприятий по развитию приоритетных секторов указанной сферы». В рамках разработанной дорожной карты объем производства продукции на основе промышленных биотехнологий должен возрасти с 12.9 млрд. рублей в 2018 г до 14.8 млрд. рублей в 2020 г. Одним из приоритетов этой программы является создание производственных центров и медицинских организаций, аккредитованных для проведения клинических исследований и связанных с разработкой и внедрением биомедицинских клеточных продуктов [3].

Несмотря на развитие новых направлений создания биофармацевтических препаратов, пептиды до сих пор остаются привлекательными объектами в качестве терапевтических средств в связи с их безопасным фармакологическим профилем, хорошей переносимостью и эффективностью терапевтического использования. Биотехнология производства пептидных препаратов на основе прокариот обладает высокой рентабельностью и лишена многих производственных сложностей, присущих биофармацевтическим производствам на основе эукариотических клеток.

В стоимостном выражении мировой рынок пептидных лекарств вырос с 14.1 млрд. долл. в 2011 году до примерно 25.4 млрд. долл. в 2018 году, при этом базовый рост новых

инновационных пептидных лекарств составил от 8.6 млрд. долл. в 2011 году (60%) до 17.0 млрд. долл. (66%) в 2018 году [4]. В настоящее время на рынке США имеется более 239 утвержденных FDA пептидных препаратов и 380 их готовых лекарственных форм, клинические испытания проходят около 140 и более 500 терапевтических пептидов находятся на стадии доклинической разработки [5].

Примером инновационных разработок в этой области стало создание группы препаратов для лечения сахарного диабета 2 типа на основе агонистов глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1). Объем их продаж в 2013 году достиг более 2.6 млрд долларов США. Наиболее значимый представитель этого класса – препарат Victoza (Novo Nordisk, США), достигший статуса «блокбастера».

На мировом рынке терапевтических пептидов наибольшую долю занимают препараты для лечения болезней системы обмена веществ и онкологических заболеваний: в первом случае – для снижения эпидемического роста ожирения, например, в случае сахарного диабета 2 типа, во втором – при необходимости замены классической химиотерапии и поддержании ремиссии [6]. При чем США занимает лидирующее положение по их потреблению, но ожидается, что и азиатский рынок будет иметь значительный рост. Помимо производства широко используемых лекарственных средств активно ведется разработка пептидных препаратов для лечения редких заболеваний, таких как: тедуглутид, агонист рецептора GLP-2 при синдроме короткой кишки, и пасиреотид, агонист рецептора соматостатина при синдроме Кушинга. В настоящее время наблюдается тенденция к внедрению пептидных препаратов для терапии инфекционных заболеваний и воспалений.

В настоящее время помимо инъекционных форм пептидных лекарств развиваются препараты с альтернативными путями введения, включая пероральный, интраназальный и трансдермальный способы доставки. Одним из примеров альтернативного пути введения пептидов является трансбуккальная доставка посредством комбинации наночастиц золота (Midatech) и технологии PharmFilm™ (Monosol Rx). Соответственно, Midasol Therapeutics в настоящее время проводит клиническую разработку системы трансбуккальной доставки, которая использует пассивированные инсулином гликонаночастицы золота. Другим примером является технологическая платформа TopAct™ от ActoGeniX, которая может обеспечить пероральную доставку пептидов, непосредственно экспрессируемых в желудочно-кишечном тракте [6].

С учетом высоких темпов развития мировой фармацевтической индустрии важнейшей задачей для отечественной биотехнологии является постоянный мониторинг новых медицинских подходов в лечении заболеваний, создание на первом этапе импортозамещающих препаратов, а в конечном итоге разработка новых инновационных лекарственных средств. Это

единственно возможный путь выхода РФ в число лидеров high-tech фармацевтической индустрии стран BRICS.

Целью данной работы является разработка методологии биотехнологических процессов биосинтеза рекомбинантных биологически активных полипептидов и создание на ее основе биотехнологий получения активных фармацевтических субстанций, предназначенных для приготовления готовых лекарственных форм.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи исследования:

- 1) разработать методологические подходы по применению интеиновых экспрессионных систем в создании биотехнологий получения рекомбинантных пептидов медицинского назначения,
- 2) создать высокопродуктивные штаммы-продуценты гибридных белков, содержащих целевой полипептид и белок-носитель,
- 3) разработать подходы получения растворимых гибридных белков, способных к протеолитическому расщеплению, включая оптимизацию условий рефолдинга,
- 4) разработать биотехнологии получения АФС рекомбинантных полипептидов медицинского назначения,
- 5) разработать методы постадийного технологического контроля получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантных полипептидов и готовых лекарственных форм,
- 6) масштабировать технологический процесс и наработать опытные партии для проведения доклинических испытаний,
- 7) разработать методы анализа конечного продукта, включая тестирование биологической активности, и проекты фармакопейных статей для полученных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов и готовых лекарственных форм,
- 8) разработать опытно-промышленные регламенты на биотехнологическое получение активных фармацевтических субстанций и готовых лекарственных форм.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

С момента своего становления в 70-х годах XX века биотехнология, как индустрия получения промышленных фармакологических препаратов, так называемых, biopharmaceutical, быстро развивается. Так уже к концу 2010 г. на рынке фармакологических препаратов сегмент биофармацевтических препаратов составлял 25% и половину продаж обеспечивали моноклональные антитела, гормоны и ростовые факторы [7]. Подавляющее большинство биофармацевтических препаратов, которые были одобрены FDA для терапевтического применения – это белки, полученные с помощью технологии рекомбинантной ДНК в различных экспрессионных системах. Они составляют примерно одну шестую часть общего фармацевтического рынка и являются его самым быстрорастущим сегментом (Рис. 1).

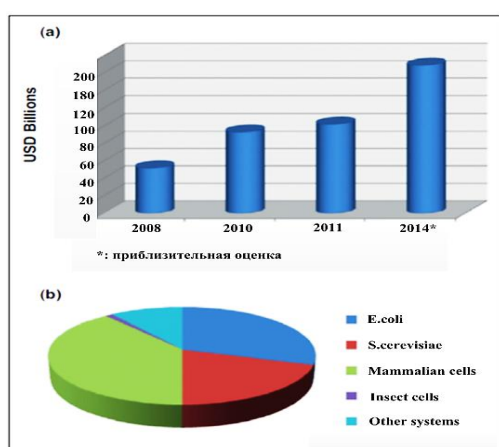


Рис. 1. Мировые продажи рекомбинантных пептидных лекарств (а) и процентное использование различных систем экспрессии для получения pharmaceuticals (b) [7].

Как правило, биофармацевтические препараты используются для компенсации недостатка белков (пептидов), необходимых для нормального функционирования организма. Из 211 биофармацевтических препаратов, которые получили одобрение FDA до 2012, 66 (31%) были произведены в *Escherichia coli*, 31 (15%) в дрожжах (из них 30 в *Saccharomyces cerevisiae* и 1 в *Pichia pastoris*) и 91 (43%) в клетках млекопитающих [8,9]. Таким образом, всего на *E. coli*, дрожжи и клетки млекопитающих вместе приходится 89 % находящихся в производстве одобренных биофармацевтических препаратов.

Спрос на рекомбинантные терапевтические пептиды и белки постоянно растет, что стимулирует ученых к созданию новых платформ систем экспрессии, что приводит к совершенствованию уже существующих и созданию новых биотехнологических процессов.

Наиболее используемыми являются бактериальные и дрожжевые экспрессирующие платформы [10]. В системах на основе *E.coli* и бактерий родов *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* и *Mycobacterium* в настоящее время получают более 90% всех рекомбинантных белков, находящихся на рынке. Широкое применение именно бактериальной платформы экспрессии обусловлено огромным запасом накопленных знания по биохимии, генетике, физиологии прокариотического организма *Escherichia coli*.

К наиболее интересным пептидным препаратам с молекулярной массой более 3 кДа, разработанным в последние годы, можно отнести анаболические препараты – терипаратид и его аналог второго поколения Абалопаратид производства компании Radius Health Inc. (США), имеющий с ним 41% гомологии. А также семиглутид (Ozempic, Novo Nordisk), модифицированный аналог глюкагон-подобного пептида GLP-1, – второе поколение препарата лираглутид (Victoza, Novo Nordisk). Получение этих препаратов осуществляется дорогостоящим химическим синтезом. Альтернативой является биотехнологический подход, основанный на использовании живых организмов в качестве биологических продуцентов целевых соединений.

Настоящий обзор посвящен существующим подходам для гетерологичной экспрессии генов рекомбинантных белков и пептидов в *E.coli*. В первой части настоящего обзора описывается идеология создания генно-инженерных конструкций на основе различных регуляторных элементов. Во второй части отображено разнообразие подходов использования различных белков-носителей для решения биотехнологических задач при получении целевого полипептида медицинского назначения. В третьей части обзора рассмотрено разнообразие существующих модифицированных штаммов-носителей.

1. Экспрессионные векторные системы *E.coli*

Для получения рекомбинантных белков к настоящему времени созданы многочисленные экспрессионные системы с промоторами, обеспечивающими высокий уровень транскрипции гибридных генов в *E.coli*. Наиболее используемые промоторы и содержащие их векторы представлены в таблице 1 [11, 12, 13].

Таблица 1. Промоторы, используемые в бактериальной системе экспрессии *E.coli* [11, 12, 13].

Промотор	Индуктор	Уровень экспрессии	РНК-полимераза	Вектор	Источник
lac промотор	ИПТГ	низкий	<i>E.coli</i>	pUC	NEB
trc и tac промотор	ИПТГ	умеренно высокий	<i>E.coli</i>	pMAL, pTrc, pGEX p8CBDek pKK223-3	NEB GE Healthcare
Промотор фага T7	ИПТГ	очень высокий	T7	pET	Novagen
PL фаговый промотор	Температурный сдвиг до 42-45°C	умеренно высокий	<i>E.coli</i>	pJLA pLEX	Invitrogen

Промотор	Индуктор	Уровень экспрессии	РНК-полимераза	Вектор	Источник
tetA промотор/ оператор	Тетрациклин	средний/ очень высокий	<i>E.coli</i>	pASK75 pZ series	A.Skerra H.Bujard
araBAD промотор (PBAD)	L-арабиноза	умеренно высокий	<i>E.coli</i>	pBAD	Invitrogen
rhaPBAD промотор	L-рамноза	умеренно высокий	<i>E.coli</i>	pRHA-67	Xbrance Bioscience
lacUV5 промотор	ИПТГ	низкий/ средний	<i>E.coli</i>	–	[11]
Гибридный lac/T5 промотор	ИПТГ	очень высокий	<i>E.coli</i>	pQE	Qiagen

Важнейшими характеристиками экспрессионных систем является копияность и стабильность плазмид в клетке штамма-производителя. Количество копий плазмидной ДНК в клетке может варьироваться в очень широком диапазоне в зависимости от последовательности точки начала репликации (*ori*), которая определяет число копий. Низкокопийными векторами считаются плазмиды, число которых составляет не более 10, среднекопийными – не больше 20, высококопийными – до 1000 копий на бактериальную клетку [14]. На копияность плазмиды влияет размер и особенности клонированного гена, а также совместимость с другими плазмидами, присутствующими в клетке. В зависимости от способности векторов сосуществовать с другими плазмидами в одной и той же бактериальной клетке плазмиды разделяют на группы совместимости.

Стабильность векторов определяется факторами контроля распределения реплицированных плазмид в дочерние бактериальные клетки. Функции обеспечения стабильности плазмиды при вертикальном переносе выполняются обособленными от репликации плазмид механизмами.

1.1. Транскрипционные регуляторные элементы векторов

1.1.1. Lac, tac и trc промоторные системы

Бактериальные промоторы, опероны которых регулируются метаболизмом сахаров (lacZYA, araBAD, rhaBAD), являются наиболее изученными [11, 12, 13]. Lac-промотор является довольно слабым и редко используется для высокоэффективной экспрессии рекомбинантных белков, однако многие экспрессионные системы используют его производные [15]. Одним из

таких производных является синтетический гибридный *tac*-промотор, сконструированный из последовательностей *trp*- и *lacUV5*-промоторов [15,16]. Он обладает более высокой транскрибируемой эффективностью (в 7-11 раз и в 2-3 раза по сравнению с дерепрессированными «материнскими» *lacUV5*- и *trp*-промоторами, соответственно) и отличается от *tac*-промотора длиной спейсерного домена на 1 нп (17 нп вместо 16 нп) [16 - 18]. *Lac*-промотор и гибридные *tac*- и *trc*-промоторы могут быть репрессированы *lac*-репрессором и активированы ИПТГ [18 - 20].

Коммерчески доступные экспрессионные системы, использующие *lac*-промотор или гибридные промоторы, доступны в сериях векторов *pUC*, *pMAL*, *pTrc*, *pPROEX* от различных фирм-производителей: New England BioLabs (NEB), Invitrogen, GE Healthcare (Таблица 1).

Современный экспрессионный вектор представляет собой функциональный многокомпонентный конструктор. Поэтому, даже используя один промотор, можно сделать векторные системы для решения различных задач. Примером такого структурного разнообразия является линия векторов *pMAL* фирмы New England BioLabs (NEB), в которых ген *malE*, кодирующий мальтозо-связывающий белок (МВР), находится под контролем сильного *tac*-промотора (Таблица 2).

Таблица 2. Векторы на основе *tac*-промотора фирмы-производителя New England BioLabs (NEB).

Вектор	Н-концевой tag	С-концевой tag	Сайты расщепления протеазами	Свойства
<i>pMAL-pIII</i>	МВР M13 рIII лидерная последовательность	–	Фактор Ха	Очистка с помощью аффинного tag Транспорт в периплазматическое пространство
<i>pMAL-c5X</i>	МВР	–	Фактор Ха	Очистка с помощью аффинного tag
<i>pMAL-c5X-His</i>		6His-tag		
<i>pMAL-c5E</i>	МВР	–	Энтерокиназа	Очистка с помощью аффинного tag
<i>pMAL-p5X</i>	МВР лидерная последовательность	–	Фактор Ха	Очистка с помощью аффинного tag Транспорт в периплазматическое пространство
<i>pMAL-p5E</i>			Энтерокиназа	

Набор векторов этой серии с разными лидерными последовательностями позволяет использовать целый ряд коммерчески доступных протеаз: фактор Ха, энтерокиназу или Genenase™.

Другим примером с использованием этого же промотора, но с другим белком-носителем (глутатион S-трансферазой) является серия векторов pGEX фирмы-производителя GE Healthcare. Векторные конструкции включают сайты узнавания различных протеолитических ферментов: тромбина (pGEX-1λT, pGEX-2T, pGEX-2TK, pGEX-4T-1, pGEX-4T-2, pGEX-4T-3), PreScission-протеиназы (pGEX-6P-1, pGEX-6P-2, pGEX-6P-3) и протеазы фактор Ха (pGEX-3X, pGEX-5X-1, pGEX-5X-2, pGEX-5X-3).

Фирма Invitrogen предлагает ряд векторов под названием pTrcHis для экспрессии генов под контролем trc-промотора. Векторы pTrcHis являются производными pBR322 плазмиды и предназначены для эффективной экспрессии гибридных конструкций, где на N-конце находится металл-связывающий домен из 6 гистидиновых остатков.

Поскольку эффективность экспрессионных систем на основе lac-промотора зависит от катаболической репрессии и метаболического статуса клетки, то применение этих векторов и их производных ограничено. Эта проблема была решена с открытием сильного промотора гена 10, кодирующего основной белок оболочки фага T7 [21].

1.1.2. T7 РНК-полимеразная система

Экспрессионная система на основе высокоселективной РНК-полимеразы бактериофага T7 впервые была разработана Studier FW et al. в 1986 г. и состоит из двух главных элементов: векторов серии pET и модифицированного штамма *E.coli*, содержащего DE3 фрагмент бактериофага T7 [21, 22]. Векторы содержат несколько важных элементов: ген lac-репрессора lacI, T7-промотор, специфичный для T7-РНК-полимеразы, lac-оператор, который блокирует транскрипцию, полилинкер, ген устойчивости к ампициллину и точку начала репликации вектора *ColE1 ori* (Рис. 2). Модификация штамма *E.coli* заключается в клонировании в хромосому гена ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага T7 (Рис. 3).

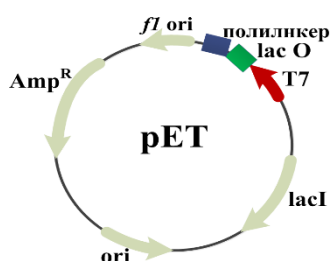


Рис. 2. Схема рЕТ вектора [17]. Плазмида содержит маркер устойчивости к ампициллину (AmpR), lacI ген (lacI), T7-промотор (T7), lac-оператор (lacO), полилинкерную последовательность (полилинкер), f1 ori и ori.

РНК-полимеразы *E.coli* и бактериофага T7 обладают разными скоростями элонгации новой цепи и используют разные промоторы. Эти различия позволили сконструировать

гибридную систему T7/lac-систему, в которой ген T7-полимеразы находится на хромосоме клетки-хозяина под контролем lac-промотора. Конститутивно синтезирующийся LacI репрессор блокирует lac-промотор и, тем самым, T7/lac-промоторную систему в целом (Рис. 3) [20].

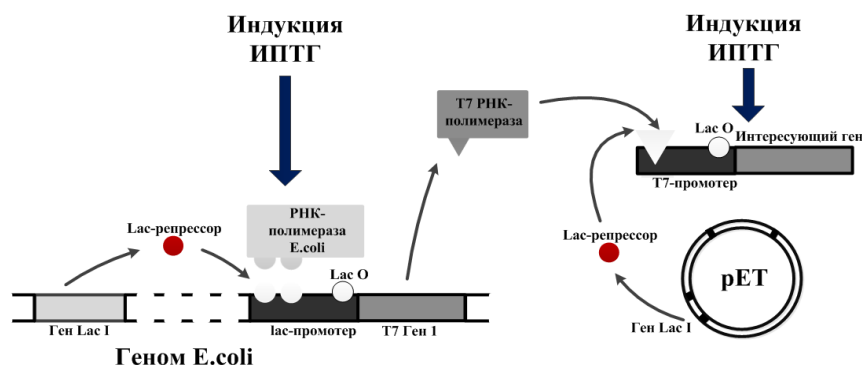


Рис. 3. Схематическое изображение регуляции работы T7 РНК-полимеразной системы [20].

Нуклеотидные замены в lac-промоторе, усиливающие его действие, сделали его независимым от цАМФ и менее чувствительным к глюкозе. Эта модификация обеспечивает эффективную индукцию транскрипции при добавлении ИПТГ даже в присутствии глюкозы.

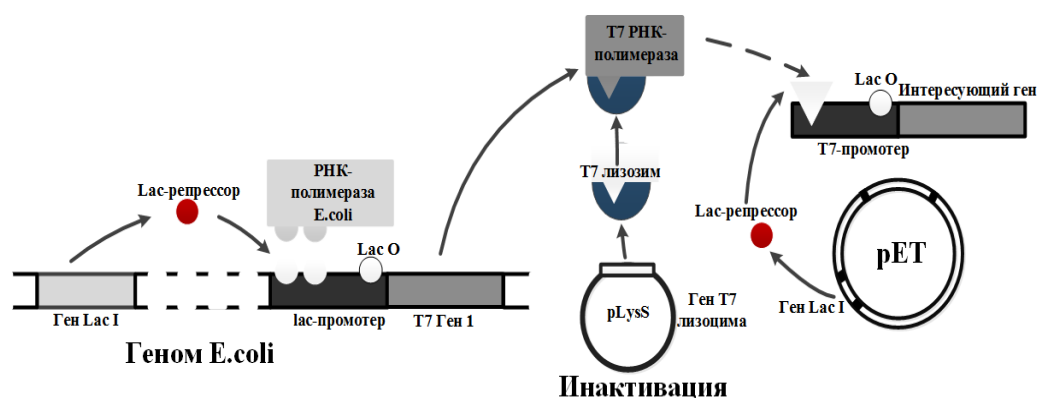


Рис. 4. Схематическое изображение регуляции работы T7 РНК-полимеразной системы с T7-лизозимом [21].

Одним из недостатков данной системы является базальная экспрессия T7 РНК-полимеразы, которая может привести к гибели клеток в случае синтеза токсичных белков. Для снижения уровня базальной экспрессии T7 РНК-полимеразы используется лизоцим фага T7, который ингибирует фермент [20]. Конститутивный биосинтез этого ингибитора с векторов pLysS или pLysE позволяет существенно снизить негативный эффект базальной экспрессии. Схематично это показано на рис.4. Другой способ подавления базальной экспрессии T7 РНК-полимеразы заключается во внесении глюкозы в культуральную среду [22].

В настоящее время экспрессионная система векторов pET, производных вектора pBR32, является одной из наиболее распространённых (включает более 40 векторов) [23]. Помимо регуляторных элементов pET-векторы содержат различные лидерные последовательности,

аффинные метки, сайты узнавания специфических протеаз, белки-носители и метки для ИФА [23 - 27].

Сочетание уникального сильного промотора с эффективным сайтом связывания рибосомы (RBS-ribosome binding site) гена 10, кодирующего ген белка оболочки бактериофага T7, обеспечивает высокий уровень экспрессии в системе рЕТ, что является ее несомненным достоинством. И в то же время это является слабостью данной системы: 1) при использовании такого промотора трудно добиться дозозависимой экспрессии, 2) в следствие высокого уровня транскрипции часто наблюдается образование нерастворимых белковых агрегатов, тел включения [28], 3) в ряде случаев система малоприменима для белков или пептидов, токсичных для клеток *E.coli*, 4) высокая стоимость и токсичность ИПТГ, используемого для индукции экспрессии, ограничивает его использование в производстве [29].

1.1.3. T5- промотор

Альтернативной системой для экспрессии являются векторы, содержащие промотор для бактериофага T5, предложенная Вujard и Lanzer [30]. Репрессия T5-промотора происходит за счет тандемно расположенных lac-операторов для достижения кооперативного эффекта (Рис.5) [31, 32]

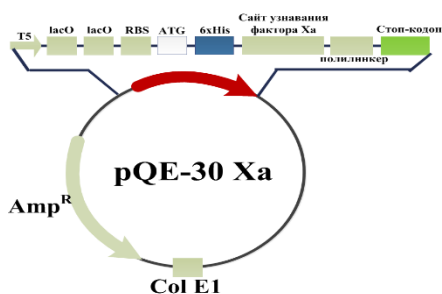


Рис. 5. Схема рQE-30 Ха вектора. Плазмида содержит маркер устойчивости к ампициллину (Amp^R), T5-промотор (T5), lac - оператор (lacO), сайт связывания рибосомы (RBS), сайт узнавания протеазой фактором Ха, полилинкерная последовательность (MCS), ColE1 –ori [30].

Система на основе данного промотора обеспечивает жесткий контроль экспрессии гена, индукция которой происходит при добавлении ИПТГ в культуральную среду. Коммерчески доступными экспрессионными системами с использованием T5-промотора является серия векторов рQE фирмы «Qiagen».

1.1.4. L-арабиноза-индуцируемый промотор рBAD

При исследовании арабинозного оперона в 1987 году было показано, его araBAD–промотор регулируется продуктом гена araC [33]. Регуляторный белок AraC является положительным и отрицательным регулятором, действуя как репрессор транскрипции при присоединении к оператору, а в присутствии арабинозы как активатор транскрипции с промотора P_{BAD} [34]. Базальная транскрипция с арабинозо-индуцируемого промотора может

быть супрессирована внесением глюкозы в культуральную среду. Глюкоза понижает уровень цАМФ, тем самым, снижая уровень транскрипции с катаболит-репрессируемого промотора P_{BAD}.

Поскольку P_{BAD} является дозозависимым промотором и имеет оптимизированный сайт связывания рибосомы, то экспрессионные системы с использованием строгого P_{BAD} промотора часто применяются для получения токсичных рекомбинантных белков или получения белков в растворимой форме. Экспрессионные векторы с арабинозным промотором P_{BAD} представлены в каталоге фирмы Invitrogen (Таблица 3).

Таблица 3. Векторы на основе L-арабинозо-индуцируемого промотора (Invitrogen).

Вектор	Н-концевой tag	С-концевой tag	Сайты расщепления протеазами	Свойства
pBAD/His	6xHis Xpress™ эпитоп для детекции anti-Xpress™ антителами	–	Энтерокиназа	Очистка с помощью аффинного tag
pBAD/Myc-His	–	c-тус эпитоп для детекции с anti-тус антителами 6xHis	Энтерокиназа	Очистка с помощью аффинного tag Детекция методом ИФА
pBAD/gIII	лидерная последовательность гена fd III бактериофага (gIII)	6xHis c-тус эпитоп для детекции anti-тус антителами	–	Секреция в периплазматическое пространство
pBAD-DEST49	Тиоредоксин	6xHis	Энтерокиназа	Очистка с помощью аффинного tag Повышение растворимости Детекция методом ИФА

1.1.5. L-рамноза-индуцируемый промотор rhaPBAD

В 1993 г. Egan и Schleif подробно описали индуцируемый рамнозой промотор rhaPBAD *E. coli* [35]. В данной системе L-рамноза действует как индуктор каскада транскрипционных активаторов RhaR/RhaS для запуска транскрипции с rhaPBAD-промотора [36]. Этот промотор так же подвергается катаболитной репрессии глюкозой и представляет интерес для производства рекомбинантных белков с жестко контролируемой экспрессией [37]. Описано успешное применение этого промотора для экспрессии токсичных для *E.coli* трансмембранного домена транскрипционного активатора холерного токсина ToxR из *Vibrio cholera* и трансмембранного домена нейротензинового рецептора крысы в лабораторном масштабе [38].

Данная система экспрессии представлена компаниями XbraneBioscience, Lucigen, Protech Technology Enterprise, Promega.

1.1.6. Тетрациклиновый промотор

Впервые TetA-промотор/оператор был использован при создании вектора pASK75 для гетерологичной экспрессии и одноступенчатой очистки Fab-фрагментов антител [39]. TetA-промотор регулируется посредством tetR-репрессора, который не кодируется генетическим аппаратом *E.coli*, что делает эту систему транскрипционно-независимой от штамм-продуцента *E.coli*. Индукция осуществляется при добавлении тетрациклина. Описаны примеры успешного использования экспрессионных векторов на основе tetA-промотора, однако эти эксперименты не выходили за рамки лабораторной наработки исследуемых белков [39, 40]. Фирмой Genosys Biotechnologies разработано семейство векторов на основе tetA-промотора (Таблица 4). Однако в связи с дороговизной используемого индуктора, для масштабного производства рекомбинантных белков данные вектора не применялись.

Таблица 4. Векторы на основе tetA-промотора/оператора (Genosys Biotechnologies).

Вектор	N-концевой tag	C-концевой tag	Сайты расщепления протеазами	Свойства
pASK-IBA2	OmpA сигнальная последовательность	Strep-tag II	Пептидаза <i>E.coli</i>	Очистка с помощью аффинного tag Секреция в периплазматическое пространство
pASK-IBA3	–	Strep-tag II	–	Очистка с помощью аффинного tag Детекция методом ИФА
pASK-IBA4	Strep-tag II OmpA сигнальная последовательность	–	Пептидаза <i>E.coli</i>	Очистка с помощью аффинного tag Секреция в периплазматическое пространство
pASK-IBA5	Strep-tag II	–	–	Очистка с помощью аффинного tag Повышение растворимости белка Детекция методом ИФА
pASK-IBA6	Strep-tag II OmpA сигнальная последовательность	–	Пептидаза <i>E.coli</i> Фактор Ха	Очистка с помощью аффинного tag Секреция белка в периплазматическое пространство Детекция методом ИФА

1.1.7. Фаговый pL и pR промотор

Поскольку вопрос о потенциальной токсичности химических индукторов экспрессии, таких как ИПТГ, остается открытым, получили развитие альтернативные варианты индуцирования биосинтеза, например, посредством температурного сдвига или изменения рН.

В первом случае последовательность целевого гена помещается под контроль фагового промотора pL или pR, который жестко регулируется термочувствительным cI-репрессором. Впервые этот подход был описан Elvin С.М. *et al.* в 1990 г. [41]. Большинство термоиндуцируемых промоторов репрессированы при температуре до 30 °С и активируются при 42 °С через активацию/деактивацию термолабильного репрессора cI857 (Рис. 6) [42, 43]. Такой способ экспрессии подходит для термостабильных белков. Однако, поскольку cI857-репрессор полностью активен при температуре от 29 °С и выше, данную систему экспрессии можно применять для экспрессии белков при низких температурах [44].

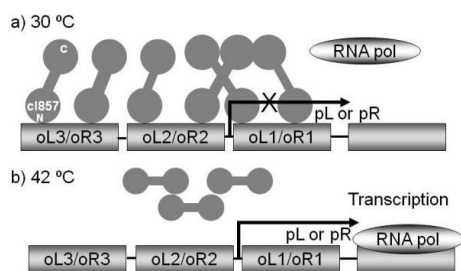


Рис. 6. Схема регуляции транскрипции cI857 репрессором. Репрессор с I857 взаимодействует с тремя доменами оператора (oL3 / oR3, oL2 / oR2 и oL1 / oR1), подавляя транскрипцию [42].

а) при 30° С cI857 образует димеры, которые связываются с областью oL или oR и блокируют транскрипцию целевого гена РНК-полимеразой.

б) взаимодействие cI857 с областями oL или oR прекращается после прогрева при 42°С, что позволяет начать транскрипцию с помощью РНК-полимеразы.

В работе Poindexter К. *et al.* описан рН-зависимый способ индукции системы на основе промоторов фага λ. Сдвиг рН до значения 9.0 инактивирует белок-репрессор, тем самым активируя промотор [45]. С использованием строгих pL или pR промоторов фага λ был создан целый ряд различных экспрессионных плазмид. Сила промотора может быть увеличена при тандемном расположении промоторов pL и pR, что было реализовано в серии экспрессионных векторов pJLA.

Экспрессионные вектора с промотором на основе термолабильного репрессора cI857 достаточно популярны. С их помощью были экспрессированы в *E.coli* гены интерферона α и интерферона γ, инсулина человека и гормона роста человека [46 - 50]. Однако эти работы носили исследовательский характер и объемы культивирования штаммов-продуцентов не выходили за рамки лабораторной практики. Очевидно, что в ферментере объемом от 200 л осуществить термоиндукцию, т.е. резко (за несколько минут) поднять температуру с 28 -29 °С до 42 °С, а через 10 мин снизить до 37 °С, сохранив при этом биосинтез белка, технически очень непросто. Поэтому использование этого подхода пока не вышло на масштаб промышленного производства.

2. Гибридные белки

Достижения в области рекомбинантных ДНК позволили конструировать новые гены, кодирующие белковые молекулы *de novo*. Это могут быть известные белки или пептиды, но с частично измененной «исправленной» или дополненной последовательностью аминокислотных остатков, или белки, состоящие из двух или более последовательностей разных белков. Сегодня такие химерные конструкции, получившие название «гибридные белки», обычно используются в качестве вспомогательного инструмента в процессе получения рекомбинантных полипептидов. Поэтому для целевого конечного продукта необходимым этапом является отщепление «вспомогательной последовательности».

Существует три принципиально разных варианта решения данной задачи: 1) расщепление гибридного белка химическим реагентом по лабильным аминокислотам, 2) отщепление вспомогательной последовательности протеолитическим ферментом по специфическому сайту, 3) автокаталитическое интеин-опосредованное расщепление гибридного белка.

2.1. Вспомогательные последовательности

Современные экспрессионные векторы дают возможность присоединять к N- или C-концам рекомбинантных белков короткие маркерные аминокислотные последовательности, получившие название *fusion tags*, с образованием химерных белков. Такие «тэги» должны обеспечивать простую детекцию рекомбинантных белков, высокий уровень их экспрессии и растворимость, а также эффективную очистку методом аффинной хроматографии [51]. Tag-последовательности обеспечивают 100-/1000-кратную очистку рекомбинантного белка из «грубых» экстрактов без предварительной очистки от нуклеиновых кислот и других клеточных компонентов. Ниже рассмотрены наиболее популярные аффинные метки, которые используются для выделения гибридных белков.

2.1.1. Аффинные метки

2.1.1.1. His-tag

Одним из наиболее распространённых методов очистки целевого рекомбинантного белка является металл-аффинная хроматография (ИМАС — *immobilized-metal affinity chromatography*). Принцип металл-аффинной хроматографии впервые был сформулирован в 1975 году и основан на сродстве ионов переходных металлов таких, как Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} и Co^{2+} к гистидину и цистеину (Рис. 7) [52]. Очистка рекомбинантных His-tag-содержащих белков посредством металл-аффинной хроматографии основывается на высоком сродстве и специфичности ионов

некоторых металлов к эпитопами, содержащим шесть или более остатков гистидина. Наиболее распространенная форма His-метки состоит из шести последовательных остатков гистидина (6xHis-tag). Поскольку это взаимодействие носит рН-зависимый характер, то для элюции His-tag-содержащих белков может быть использовано или изменение рН буфера, или добавление в буфер хелатирующих агентов, как EDTA или имидазол [53].

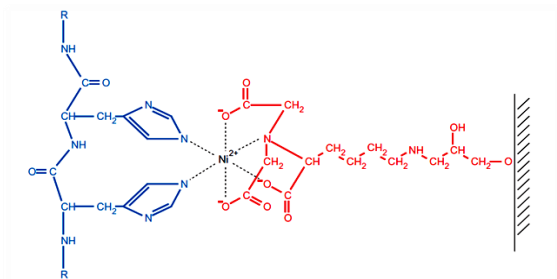


Рис. 7. Взаимодействие между соседними остатками гистидина в 6x-His-кластере [53].

В первых работах в качестве носителя использовалась иминодиуксусная кислота (iminodiacetic acid, IDA), которая была заряжена ионами такими, как Zn^{2+} , Cu^{2+} , или Ni^{2+} .

IDA имеет только 3 металл-хелатирующих сайта, в результате чего связывание ионов металлов довольно слабое, что отрицательно сказывается на эффективности очистки рекомбинантных белков. Фирма Hoffmann-LaRoshe разработала сорбент, в котором в качестве лиганда используется нитрилотриуксусная кислота (nitrilotriacetic acid, NTA). NTA связывает ион Ni^{2+} четырьмя валентностями (Рис. 8), а две оставшиеся валентности иона металла доступны для взаимодействия с имидазольными кольцами гистидиновых остатков. Это соотношение оказалось наиболее эффективным для очистки гистидин-содержащих белков.

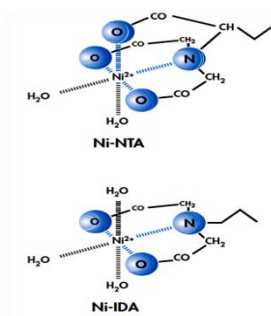


Рис. 8. Схематическое изображение связывания ионов никеля смолами NTA (вверху) и IDA (внизу) [52].
NTA- nitrilotriacetic acid (нитрилотриуксусная кислота);
IDA - iminodiacetic acid (иминодиацетат)

Позднее фирмой ClonTech для очистки гистидин-меченных белков был предложен другой тетрадентатный лиганд – TALON. Этот материал состоит из Co^{2+} -карбоксиметиласпартата (Co^{2+} -CMA), связанного с твердым носителем. Отмечено, что этот сорбент обеспечивает более низкое неспецифическое связывание белка, чем Ni^{2+} -NTA [54].

2.1.1.2. Strep-tag

Небольшая синтетическая последовательность Strep-tag, состоящая из 8 аминокислотных остатков (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) была использована Schmidt T.G.M. *et al.* в качестве

аффинной метки для очистки рекомбинантных белков на сорбенте с пришитым стрептавидином [55]. Компанией IBA Lifesciences был разработан и выпущен на рынок аффинный сорбент Strep•Tactin, модифицированный стрептавидин с аминокислотными заменами в позициях 44, 45 и 47 [55, 56]. Специфическое связывание белка, сшитого с Strep-Tag II, к сорбенту Strep•Tactin в 100 раз сильнее, чем со стрептавидином [57]. Элюцию связавшегося белка проводят посредством 2,5 мМ раствора дестиобиотина (аналога биотина).

Аналогом Strep-tag является стрептавидин-связывающий пептид SBP-tag, состоящий из 38 аминокислот. При хроматографической очистке гибридных белков с SBP-tag для элюции используется раствор 2 мМ биотина.

Lamla T. *et al.* был предложен еще один вариант аффинной метки Strep-tag, получивший название nano-tags и состоящий из 9 или 15 аминокислотных остатков [58]. В зависимости от длины последовательности они имеют разные константы диссоциации: 17 нМ и 4 нМ, соответственно. Данную систему используют в научных исследованиях для визуализации гибридного белка посредством Western-блоттинга. Описан пример успешного применения этой схемы для получения EC4 домена E-кадгерина – мембранного гликопротеина, участвующего в регуляции межклеточной адгезии [59].

2.1.1.3. GST-tag

Использование глутатион S-трансферазы (GST) для одноступенчатой очистки рекомбинантного белка впервые было описано Smith D.B. *et al.* в 1988 г. [60]. GST представляет собой белок из *Schistosoma japonicum*, состоящий из 211 аминокислот (26 кДа). Идея использования GST в качестве аффинной метки основана на его способности образовывать достаточно прочный нековалентный комплекс с молекулами глутатиона. Глутатион представляет собой трипептид (Glu-Cys-Gly), который иммобилизуют через сульфгидрильные группы на твердом носителе, как правило, на агарозе.

Связывание гибридного белка с глутатион-иммобилизованным сорбентом происходит в условиях, близких к физиологическим, что позволяет сохранить структуру и функциональную активность GST. Элюция производится 10 мМ раствором восстановленного глутатиона в неденатурирующих условиях. В определённых случаях GST может способствовать незначительному повышению степени растворимости гибридного белка. GST-tag защищает рекомбинантный белок от воздействия внутриклеточных протеиназ и легко детектируется специфическими антителами. Мягкие условия очистки рекомбинантных белков, содержащих GST-tag, сделали это подход достаточно популярным для исследовательских работ [61].

GST-tag используется в качестве N- или C-концевой последовательности в различных экспрессионных системах (бактериальных, дрожжевых, клетках насекомых и млекопитающих),

однако для разработки крупномасштабного производства этот вариант не используется [62 - 65].

2.1.1.4. Calmodulin-tag

Белок, обладающий способностью специфически связываться с кальмодулином в присутствии ионов кальция, впервые был описан Leto T.L. *et al.* в 1989 г при изучении неэритроидного альфа-спектрина [66]. Кальмодулин-связывающая последовательность из 24 аминокислотных остатков Lys-Thr-Ala-Ser-Pro-Trp-Lys-Ser-Ala-Arg-Leu-Met-Val-His-Thr-Val-Ala-Thr-Phe-Asn-Ser-Ile-Lys-Glu достаточно консервативна выявлена у многих млекопитающих практически без изменений. Впервые идея использовать специфическое связывание рекомбинантных белков с кальмодулином для их очистки была предложена в работе Stofko-Nahn RE *et al.* [67]. В качестве аффинной метки в данной работе выступал небольшой пептид, состоящий из 26 аминокислот киназы легкой цепи миозина (Myosin light-chain kinase, MYLK или MLCK). Этот пептид получил название calmodulin-tag. Гибридный белок, содержащий calmodulin-tag, связывается с кальмодулином в присутствии кальция (концентрация 0.2 мМ) [68]. Использование сорбента с ковалентно связанным кальмодулином (обычно это агарозный гель) позволяет специфически элюировать гибридный белок буферным раствором, содержащим EDTA. Такой подход был успешно использован в лабораторной практике, однако в масштабируемом производстве не применялся из-за высокой стоимости сорбента [69].

2.1.1.5. FLAG-tag

FLAG-tag, представляющий собой последовательность из 8-ми аминокислотных остатков (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) с сайтом расщепления энтерокиназы, был специально разработан Норр Т.Р. *et al.* для иммуно-аффинной хроматографии при очистке рекомбинантного интерлейкина 2 [70]. Гексапептидная последовательность Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys на С-конце обеспечивает максимальную гидрофильность FLAG-последовательности, необходимую для эффективного фолдинга молекулы с эпитопом на внешней стороне [71].

FLAG-tag может быть присоединен к любому из концов интересующего белка, однако присоединение к N-концу отличается более эффективным связыванием с соответствующими антителами. В настоящее время коммерчески доступны три изоформы M1, M2 и M5 моноклональных тел с разным сродством к эпитопу связывания (Merck Millipore).

FLAG-tag специфично может быть удален посредством сайт-специфической протеазы – энтерокиназы, которая узнает свой сайт расщепления на С-конце в виде пяти концевых аминокислот FLAG –последовательности (Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) (Рис. 9) [71].

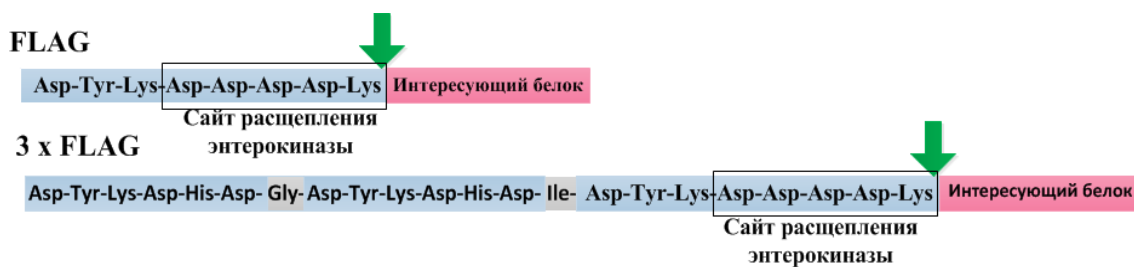


Рис.9. Схема ферментативного отщепление FLAG-tag и 3xFLAG-tag [71].

Фирма Merck предлагает для получения рекомбинантных белков в бактериальной системе экспрессии векторы pFLAG и p3xFLAG под контролем T7 промотора. Векторная система p3xFLAG позволяет экспрессировать гибридные белки с тремя тандемно расположенными FLAG-последовательностями на N-конце.

С помощью FLAG-tag были выделены несколько рекомбинантных белков таких, как: щелочная фосфатаза, интерлейкин-18 мыши. Однако смола с иммобилизованными антителами (например, ANTI-FLAG фирмы-производителя Merck) одна из наиболее дорогих, что делает маловероятным использование FLAG-последовательности в промышленном биотехнологическом производстве [72].

Еще один вариант использования FLAG-tag был предложен для реализации идеи тандемной аффинной хроматографической очистки (tandem affinity purification – TAP). В этом варианте для очистки рекомбинантного белка FLAG-tag был использован вместе с Strep-tag, что позволило добиться высокой степени очистки рекомбинантных белков млекопитающих [73].

2.1.1.6. Arg-tag

Идея использовать последовательность из нескольких аргининов в качестве аффинной метки впервые была предложена Smith J.C. *et al.* в 1984 г. [74]. Так как аргинин является основной аминокислотой, то небольшая аминокислотная последовательность из 5-6 остатков аргинина на C-конце рекомбинантного пептида представляет собой положительно заряженный кластер, благодаря чему рекомбинантный белок легко сорбируется на катионообменном сорбенте и элюируется в градиенте концентрации NaCl.

Последовательность из 9 аминокислотных остатков аргинина, получившая название Arg-tag, широко используется в качестве сигнальной метки для проникновения гибридных белков, нуклеиновых кислот, олигонуклеотидов, нуклеопротеокомплексов, наночастиц и липосом в различные клетки (т.е. выступает в роли, так называемого, cell-penetrating peptide (CPP)). Так, полиаргининовая последовательность в некоторых случаях в 20 раз эффективней классического CPP 2 [75,76]. Еще одним полезным свойством Arg-tag является его способность к повышению растворимости гибридного белка [76].

Применение ионообменной хроматографии для выделения целевого белка весьма привлекательно с экономической точки зрения. Поэтому были разработаны другие положительно или отрицательно заряженные вспомогательные последовательности, состоящие из аминокислотных остатков лизина, аспарагиновой или глутаминовой кислоты.

2.1.2. Углевод-связывающие пептиды

Одним из вариантов биоспецифической аффинной хроматографии является использование взаимодействия между углеводным компонентом и углевод-связывающим доменом белка. Гибридный белок, содержащий углевод-связывающий домен, будет эффективно связываться с углеводной матрицей. Главным преимуществом этой системы – существенно снижение затрат на дорогие аффинные сорбенты. Полисахаридная матрица отличается относительной дешевизной, что делает этот вид аффинной хроматографии весьма привлекательным с экономической точки зрения.

2.1.2.1. Хитин-связывающий домен

Хитин-связывающий С-концевой домен хитиназы A1 из *Bacillus circulans* WL-12 (chitin-binding domain, CBD), состоящий из 51 аминокислотного остатка, был описан Watanabe T. *et al.* в 1993 г [77]. Хитин-связывающий домен связывает хитин – полисахарид, широко распространённый в природе и входящий в состав клеточных стенок грибов, экзоскелета насекомых, нематод и т.д. Принцип необратимого связывания CBD с хитином лежит в основе аффинной хроматографии гибридного белка, содержащего на N- или С-конце хитин-связывающий домен. Компанией New England Biolabs был разработан эффективный сорбент на основе хитина и сейчас активно используется в ИМПАКТ-CN и ИМПАКТ-TWIN системах как часть интеин-опосредованной технологии для одностадийной очистки белков [78, 79].

2.1.2.2. Целлюлозо-связывающий домен

Описано около 13 белковых семейств, содержащих целлюлозо-связывающий домен (Cellulose-binding domain, CelBD). Размер этого домена варьируется от 4 до 20 кДа, а сам домен может находиться как на N- или С-конце, так и являться внутренним доменом гибридного белка. Разные CelBD имеют различное сродство к целлюлозе, в том числе и необратимое [80]. В качестве аффинной метки для гибридных белков используются CelBD, принадлежащие к семейству II и III и обладающие сравнительно слабым сродством к целлюлозе. Элюцию гибридных белков, содержащих такие домены, можно проводить в мягких условиях в присутствии этиленгликоля. Связывание некоторых CelBD с целлюлозой настолько прочное,

что для элюции гибридных белков необходимо использование сильных денатурирующих агентов, вроде мочевины или гуанидингидрохлорида.

Данный вид аффинной хроматографии обладает рядом преимуществ, среди которых: широкий рабочий диапазон pH от 3.5 до 9.5, низкая неспецифическая аффинность, инертность, дешевизна и общедоступность сорбента. Поэтому сорбент на основе целлюлозы может быть внедрен в промышленную биотехнологию для производства фармакологических препаратов [81].

2.1.2.3. Мальтозо-связывающий домен

Мальтозо-связывающий белок MBP, имеющий размер 40 кДа, кодируется в геноме *E.coli* K12 геном *malE* [82, 83]. Впервые последовательность MBP была использована Bedouelle H *et al.* в 1988 г. для повышения уровня экспрессии генов нуклеазы А из *Staphylococcus aureus* и фрагмента Кленова в *E.coli*, а также для упрощения очистки [84]. Гибридные белки, содержащие ферменты, были выделены с помощью одностадийной аффинной хроматографии на амилозном сорбенте и проявляли высокую ферментативную активность. Хроматографию проводили в очень мягких условиях без использования денатурирующих агентов или высоких концентраций солей, элюируя гибридные белки раствором 10 mM мальтозы. Позднее были созданы векторы, предназначенные для получения гибридных белков, содержащих целевой белок с N- или C-концевым MBP, разделенных сайтом узнавания специфических протеаз [85, 86]. Спейсерная последовательность из остатков аспарагина, встроенная между MBP и целевым белком, увеличивает аффинность к амилозе. Для удобства детекции MBP-связанных белков компаниями-производителями разработано большое количество различных иммуноферментных тест-систем.

Следует отметить, что последовательность MBP в качестве метки часто используется в комбинации с небольшими аффинными последовательностями такими, как His-tag. Это позволяет проводить «двойную» аффинную очистку как за счет сродства к углеводной матрице, так и к металл-хелатным сорбентам [87 - 89].

В настоящее время доступно несколько векторов серии pMAL (New England Biolabs) и pIVEX (Roche), в которых между геном *malE*, кодирующим MBP, и полилинкерной последовательностью находится последовательность сайта расщепления фактором Ха или энтерокиназы [90].

В ряде работ отмечено еще одно полезное свойство MBP – повышение растворимости эукариотических белков в бактериальной системе экспрессии [91]. Sachdev D. *et al.* была предложена модель механизма, объясняющего повышение растворимости MBP-содержащего гибридного белка. Согласно ей, при слабом взаимодействии не до конца свернутого

рекомбинантного белка с близко расположенным МВР предотвращаются внутримолекулярные взаимодействия, приводящие к необратимой агрегации белковой молекулы до момента завершения образования ее нативной конформации [91].

Таким образом, МВР можно отнести так же к вспомогательным последовательностям, которые повышают растворимость гибридных белков.

2.1.3. Неаффинные последовательности

Получение рекомбинантного белка в растворимой форме часто превращается в непростую технологическую задачу. Иногда эту задачу удается решить присоединением вспомогательной последовательности – хорошо растворимого белка-партнера. Среди таких вспомогательных партнеров следует отметить уже упоминавшиеся выше мальтозосвязывающий белок и глутатион-трансферазу. Также к таким белкам-партнерам относят тиоредоксин (Trx), убиквитин (Ub), SUMO (Small ubiquitin-modifier), SET (Solubility-enhancing tag), DsbC (Disulfide bond C), Skp (Seventeen kilodalton protein), GB1 (Protein GB1 domain), [89 - 90, 92]. Рассмотрим более подробно некоторые из них.

2.1.3.1. Тиоредоксин

Тиоредоксин – небольшой белок с молекулярной массой около 12 кДа, встречающийся практически во всех организмах: бактериях, дрожжах, растениях, животных [89]. Ген тиоредоксина довольно консервативен и мало изменялся в ходе эволюции. Впервые клонирование и экспрессия гена тиоредоксина человека в *E.coli* были описаны в работе Wollman E.E. *et al.* в 1988 г. [93]. Важным свойством тиоредоксина, полезным для биотехнологии, оказалась его способность повышать растворимость гибридных белков, предотвращая образование в клетках нерастворимых агрегатов, тел включения [94, 95]. Сравнительное исследование влияния МВР и тиоредоксина на растворимость гибридных белков показало, что, хотя тиоредоксин несколько уступает МВР в способности повышать растворимость гибридных белков, он обеспечивает высокий уровень экспрессии целевых пептидов в растворимой форме [96].

Кроме образования тел включения при экспрессии гетерологичных генов в бактериальных системах существует еще одна важная проблема – неэффективная трансляция большинства эукариотических мРНК. Решение этой проблемы – изменение 5'-конца нуклеотидной последовательности целевого гена с использованием вспомогательной последовательности. В этом случае проблема неэффективной трансляции эукариотических мРНК решается за счет эффективной экспрессии рекомбинантного продукта в составе гибридного белка, которая определяется вспомогательной последовательностью.

Преимущество тиоредоксина в качестве белка-партнера заключается в высокоэффективной трансляции в бактериальной клетке – он накапливается в большом количестве в растворимой форме (до 40 % от общего клеточного белка) [96]. В исследованиях Sachdev D. *et al.* и LaVallie E.R. *et al.* было показано, что повышение растворимости гибридного белка является эффективным в случае присоединения тиоредоксина как к N-концу, так и к C-концу [97, 98].

Еще одно полезное свойство тиоредоксина – его термостабильность. Температура его инактивации составляет 85 °С и, находясь в составе гибридного белка, тиоредоксин повышает его термостабильность. Это свойство позволяет проводить эффективную предварительную очистку гибридного белка термической обработкой клеточных лизатов, подобрав температуру, при которой балластных белков осаждаются, а гибридный белок не агрегирует [99]. Другой подход к очистке гибридного белка с тиоредоксином основан на его клеточной локализации. Тиоредоксин *E.coli* является цитоплазматическим белком, однако имеет особую локализацию в клетке, около зон адгезии между внутренней и наружной мембраной клеточной оболочки [100]. Поэтому при осмотическом шоке или циклическом замораживании/размораживании клеточной биомассы тиоредоксин количественно высвобождается, переходя в раствор.

2.1.3.2. Убиквитин

Убиквитин — небольшой (8.5 кДа) консервативный белок эукариот, участвующий в регуляции процессов внутриклеточной деградации других белков, был открыт Goldstein G. *et al.* в 1975 г. [101]. Убиквитин не обнаружен у прокариот, но присутствует в одноклеточных эукариотических организмах и почти во всех тканях многоклеточных эукариот. Ген убиквитина весьма консервативен и мало подвержен эволюционным изменениям [102].

Рекомбинантные гибридные убиквитин-содержащие белки стали объектом для изучения еще в конце 80-х гг. XX века. Почти сразу было обнаружено, что для таких рекомбинантных генов уровень экспрессии в *E.coli* существенно повышается [103 - 105]. По мнению некоторых авторов, использование убиквитина в качестве белка-партнера предпочтительно для получения рекомбинантных белков с нативной структурой [106 - 107]. Содержание убиквитин-содержащих гибридных белков в клетке может достигать 50 %, что существенно выше 20-30 %, обычно достигаемых при использовании систем экспрессии на основе тиоредоксина.

В клетках эукариот существуют природные ферменты (DUB, deubiquitylating enzymes), отщепляющие Ub-последовательность от гибридных белков [107]. Прокариоты не имеют Ub-системы, поэтому при использовании бактериальной системы экспрессии в бактериальную клетку дополнительно вводится плазида, с которой экспрессируется дрожжевой фермент DUB UBP1 *Saccharomyces cerevisiae*, обеспечивающий расщепление гибридной конструкции с высвобождением Ub. Система экспрессии Ub/DUB очень эффективна при получении

растворимых рекомбинантных белков в больших количествах. Для облегчения очистки рекомбинантных белков на основе плазмиды pET15b (Novagen) был сконструирован вектор pHUE, в котором перед последовательностью убиквитина была клонирована нуклеотидная последовательность, кодирующая His-tag [107]. Схематично строение плазмиды изображено на Рис. 10.

Высокий уровень экспрессии рекомбинантных генов в векторе pHUE, по-видимому, обусловлен свойством убиквитина увеличивать растворимость гибридного белка. Пока механизм повышения растворимости целевого гибридного белка до конца не ясен, но выдвинуто предположение, что модель механизма, предложенная для мальтозо-связывающего белка, так же относится и к убиквитину [105].

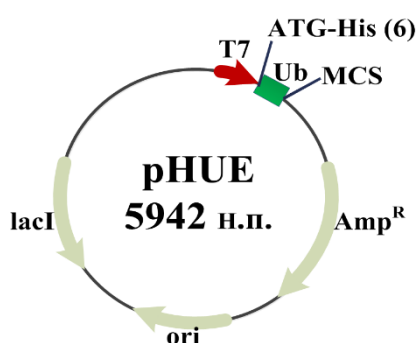


Рис. 10. Система экспрессии с убиквитином в качестве белка партнера, вектор pHUE (histidine-tagged ubiquitin expression plasmid) [106]. T7 – T7 промотор (стрелками обозначено направление транскрипции), MCS-полилинкерная последовательность, lacI-ген Lac-репрессора, AmpR-ген лактамазы маркер устойчивости к ампициллину, ATG-старт-кодон, His (6) - полигистидиновая последовательность (His-tag), Ub-последовательность убиквитина.

Убиквитины из различных источников и убикитин-подобные белки интенсивно изучаются. В частности, было установлено, что клеточные мишени убикитин-подобных белков (ubiquitin-like proteins, UBLs) отличаются от мишеней убиквитина [109 - 111]. Помимо убиквитина семейство Ubl включает SUMO, RUB1, HUB1, ISG15, APG12, URM1 и Ubi-L. Все представители семейства Ubl присоединяются к белку-мишени через остатки лизина. В настоящее время исследование семейства Ubl носит скорее академический фундаментальный характер, однако один из представителей, получивший название SUMO, оказался очень полезен и был использован для прикладных биотехнологических разработок [112].

2.1.3.3. SUMO (small ubiquitin-like modifier)

Для количественного сайт-специфического расщепления гибридного белка, содержащего убикитин, необходимо эквимоллярное соотношение субстрата и специфического фермента [108]. Поэтому была разработана более экономичная технология с альтернативной экспрессионной системой, в которой в качестве белка-партнера используется SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier).

SUMO является одним из наиболее хорошо охарактеризованных убикитин-подобных молекул (Ubl) после убиквитина. SUMO представляет собой небольшой пептид, состоящий из 100 аминокислот [112]. SUMO высоко консервативен среди эукариот. Так, у дрожжей был

найден один ген SUMO, у позвоночных – три (SUMO-1, SUMO-2 и SUMO-3), однако среди прокариот генов SUMO найдено не было [111]. Процесс присоединения SUMO-последовательности является обратимой пост-трансляционной модификацией белков, необходимой для их участия в различных клеточных процессах, среди которых апоптоз, активация и стабильность белков, ответ на стресс и т.д. [110, 114].

Аминокислотные последовательности убиквитина (Ub) и SUMO совпадают примерно на 20 %, имеют похожую трехмерную структуру плотно свернутой глобулы из β -листов, завернутых вокруг одной α -спирали [115 - 117]. Присоединение SUMO к белку-мишени, как и в случае с убиквитином, является жестко регулируемым и динамичным процессом. Отщепление tag-последовательности происходит специфической SUMO-протеазой [113, 118].

SUMO-tag была предложена Malakhov M.P. et al. в качестве эффективной технологии получения гетерологичных рекомбинантных белков в *E.coli* [118]. Для увеличения степени экспрессии рекомбинантного гена и облегчения очистки рекомбинантного белка было предложено дополнить SUMO-tag полигистидиновой последовательностью. Это позволило использовать металл-аффинную хроматографию и получать белки, относящиеся к группе сложнополучаемых в традиционных системах бактериальной экспрессии [118]. Подход оказался успешным: увеличение степени экспрессии гибридного гена и облегчение очистки с использованием Ni^{2+} - хроматографии позволило получить ряд рекомбинантных белков, в том числе белки коронавируса тяжелого острого респираторного синдрома (Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) proteins) [112, 114, 116 - 120].

Применение системы SUMO-tag крайне привлекательно для генно-инженерного получения белков и пептидов медицинского назначения, у которых специфические N-концевые аминокислотные остатки играют ключевую роль для биологической активности и стабильности.

В настоящее время имеется несколько коммерческих экспрессионных векторов на основе системы SUMO-tag: «Champion pET SUMO Protein Expression System» (Invitrogen) и pET SUMO (LifeSensor).

Следует отметить, что фундаментальные исследования убикитин-подобных белков продолжаются. В частности, при геномном анализе инфузорий был идентифицирован новый тип полиубикитин-подобных генов, содержащих тандемные повторы убикитин-подобных и интеин-подобных доменов [121].

2.1.4. Лидерные последовательности

Другим подходом к решению проблемы агрегации и неполного рефолдинга белков с одновременным отщеплением вспомогательных последовательностей является использование в

составе гибридных белков сигнальных последовательностей, предназначенных для экспорта во внеклеточное пространство. Такие белки синтезируются в клетке в виде пробелков с N-концевой сигнальной последовательностью из 18-40 аминокислотных остатков, которая отщепляется периплазматической пептидазой в ходе транслокации через внутреннюю мембрану [122].

Сравнительный анализ последовательностей показал наличие трех общих черт: на N-конце сигнальной последовательности имеются 1-3 положительно заряженных аминокислотных остатка; центральный участок состоит из 14-20 нейтральных аминокислот, формирующих гидрофобный кор, и гидрофильный C-конец, который распознается лидерной пептидазой [123]. Большинство применяемых в генной инженерии сигнальных последовательностей взяты из естественных секреторных белков (например, OmpA, OmpT, PelB, β -лактамазы и щелочной фосфатазы). Секреция рекомбинантных белков в периплазму может обеспечить повышение стабильности продукта, правильное замыкание внутримолекулярных дисульфидных связей и возможность наработки гибридных белков, токсичных для клетки-хозяина [124, 125].

Однако использование секреции для биотехнологии получения рекомбинантных полипептидов ограничивается лабораторными масштабами и практически не применяется при ферментации штаммов-продуцентов в ферментерах объемом 100 - 1000 л. Основная проблема – количественное извлечение целевого белка из культуральной жидкости и периплазматического пространства. Поэтому экономическая целесообразность подталкивает к поиску других альтернативных технологий.

2.1.5. Использование специфических протеаз

Удаление белков-носителей или аффинных последовательностей часто является необходимой процедурой для полипептидов медицинского назначения. Наиболее очевидный путь удаления «лишней» белковой последовательности – использование специфических протеаз. Для этого гибридный рекомбинантный белок должен содержать специфический сайт узнавания протеазой между последовательностью целевого белка и белка-партнера.

Для этого используются различные протеазы: ферменты желудочно-кишечного тракта, факторы системы свертываемости крови и вирус-индуцируемые ферменты. Наиболее часто используемыми в генной инженерии протеазами являются: энтерокиназа, фактор Ха, SUMO-протеаза, протеаза вируса гравировки мозаики табака (TEV), тромбин, 3С протеаза, TAGZyme System.

Выбор протеолитического фермента для расщепления конкретного белка является чрезвычайно важным ключевым моментом. Во-первых, протеаза не должна оставлять

дополнительные «лишние» аминокислотные остатки в месте расщепления гибридного белка, которые могут повлиять на биологические свойства конечного целевого белка. Во-вторых, протеаза не должна вносить дополнительные (специфические или неспецифические) разрывы в аминокислотную последовательность целевого полипептида. В-третьих, необходимо учитывать, что протеазы имеют свой оптимум рН, в котором они проявляют наибольшую активность, и важно, чтобы изоэлектрическая точка расщепляемого белка не попадала в этот диапазон рН. Поэтому создание технологии получения рекомбинантных белков или пептидов с использованием протеолитического расщепления всегда является задачей, требующей индивидуального решения для каждого продукта.

Одной из причин низкой эффективности расщепления гибридного белка может стать экранирование сайта расщепления и невозможность доступа к нему протеазы ввиду стерических параметров рекомбинантной молекулы. При этом наши знания о структуре белка на сегодняшний момент не позволяют достоверно моделировать пространственную структуру нового гибридного белка, зная его первичную структуру. Поэтому теоретический вопрос о доступности сайта расщепления гибридного белка для протеолиза может быть решен только экспериментально. Ниже приведены данные о специфических протеазах, которые наиболее часто используются в биотехнологических разработках для расщепления гибридных белков.

2.1.5.1. Энтерокиназа

Энтерокиназа – специфическая сериновая эндопротеиназа, впервые выделенная и охарактеризованная еще в 70-х гг. XX века [126, 127]. Энтерокиназа является мембранно-ассоциированным белком и состоит из двух цепей: тяжелая цепь (115 кДа) отвечает за связывание фермента с мембраной, тогда как легкая цепь (Enterokinase light chain, EKL, 35 кДа) обладает полной ферментативной активностью. Собственно, сама легкая цепь сейчас и используется в практической химии белка под названием энтерокиназа. Ген легкой цепи энтерокиназы был клонирован и экспрессирован сначала в *E.coli*, а затем в дрожжах [72, 128].

Легкая цепь энтерокиназы распознает последовательность Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-X (DDDDK^X) и вносит разрыв после лизина с разной эффективностью протеолиза в зависимости от аминокислоты в положении X. Если в положении X стоит аминокислотный остаток с «жестким» (пролин) или большим трехмерным заместителем (например, триптофан), эффективность расщепления составляет менее 70 %. В случае аланина, изолейцина, аспарагина в этом положении эффективность протеолиза превышает 80 % [130]. Было показано, что энтерокиназа может вносить разрывы в неспецифических сайтах.

2.1.5.2. Тромбин

Тромбин (фактор свёртывания II) является важнейшим компонентом системы свёртывания крови человека и млекопитающих. Это сериновая протеаза, которая распознает сайт Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser (LVPR[^]GS) и вносит разрыв между аргинином и глицином [131]. Несмотря на то, что тромбин – довольно высокоспецифичная протеаза, препарат этого фермента из-за примесей других протеаз, в первую очередь плазмина, может гидролизовать пептидные связи в неспецифических местах. Тромбин удобно использовать при работе с мембранными белками, поскольку протеаза нечувствительна к буферным растворам, содержащим различные детергенты [132]. После фермент-зависимого протеолиза тромбин может быть легко удален посредством хроматографии на колонке с сорбентом Benzamidine Sepharose 6B (GE Healthcare), предназначенном для очистки или удаления сериновых протеаз.

Однако использование тромбина ограничивается лабораторными исследованиями [132, 133]. Наиболее существенным недостатком протеазы является способ ее получения из плазмы крови млекопитающих. До тех пор, пока не будет разработан биотехнологический способ получения тромбина, его возможное применение в промышленных масштабах затруднительно.

2.1.5.3. Фактор Ха

Фактор Ха – это специфическая протеаза, которая образуется в крови из фактора X путем расщепления N-концевого участка его тяжелой цепи [135]. Фактор Ха и тромбин являются наиболее часто используемыми сериновыми протеазами, несмотря на то, что фактор Ха часто вносит неспецифические разрывы в белковую молекулу. Подобно энтерокиназе, фактор Ха вносит разрыв по C-концу после аргинина в последовательности Pe-Glu/Asp-Gly-Arg (IE/DGR[^]X, где X-любая аминокислота, кроме пролина и аргинина). Использование фактора Ха для расщепления гибридных белков ограничено лабораторными исследованиями [136 - 137]. Аналогично тромбину, фактор Ха не получают биотехнологическим путем, поэтому его использование в промышленных объемах экономически нецелесообразно.

2.1.5.4. Протеаза вируса гравировки табака

Протеаза вируса гравировки табачной мозаики (Tobacco etch virus – TEV-protease) является высокоспецифичной цистеиновой протеазой и была впервые охарактеризована почти 30 лет назад [138 - 139]. TEV-протеаза определяет специфическую последовательность Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Ser (ENLYFQ[^]S) и вносит разрыв между глутамином и серином. TEV-протеаза высоко специфична, активна в различных условиях и эффективно расщепляет пептидную связь при низкой температуре. Фермент активно применяется как при лабораторных исследованиях, так и в промышленном производстве [140 - 141]. Одним из недостатков использования TEV-

протеазы является определенной аминокислота на N-конце целевого белка. Это же может являться и ее достоинством, если целевой пептид имеет в первом положении подходящую аминокислоту. Природная TEV-протеаза весьма чувствительна к действию некоторых веществ, ее активность значительно снижается в присутствии детергентов [132, 141]. В настоящее время обычно используют рекомбинантную TEV-протеазу, которая сохраняет высокую активность во всех буферах для элюции при аффинной хроматографии, содержащих высокие концентрации обычно используемых в процедурах очистки белка добавок, таких как, этиленгликоль, EDTA, Triton X-100, Tween-20, NP-40, CHAPS, мочевины, ДСН, гуанидингидрохлорид и β -меркаптоэтанол [142]. Это существенно расширяет возможности использования рекомбинантной TEV-протеазы для работы с гибридами мембранных белков.

2.1.5.5. С протеаза

Специфическая протеаза реновируса 3С человека также может быть использована для расщепления рекомбинантных белков [144]. Сайт расщепления этого фермента LEVLFQ/GP [145]. Рекомбинантный фермент, содержащий His-tag был клонирован и экспрессирован в *E.coli*, что позволило получать его в значительных количествах с помощью металл-аффинной хроматографии [146].

2.1.5.6. SUMO-протеаза

Высокоспецифичная SUMO-протеаза узнает часть SUMO-последовательности и вносит разрыв на С-конце после консервативной последовательностью Gly-Gly. Активность фермента сохраняется в присутствии различных тиол-содержащих агентов и детергентов [147].

В работе Catic A. *et al.* был впервые описан белок ElaD из *E.coli*, который, как Ub-протеаза, специфически отщепляет Ub-последовательность от гибридного белка, но не отщепляет SUMO-конъюгаты [149]. Аналогичные протеазы были обнаружены у бактерий *Salmonella* и *Shigella* [148 – 149]. Тот факт, что в *E.coli* нет системы для синтеза убиквитина, но, оказывается, есть система его отщепления, имеет прикладное следствие. Это значит, что экспрессирующая система с SUMO-tag является предпочтительной для получения рекомбинантных белков в *E.coli* [149]. В целом, использование SUMO-последовательностей с отщеплением SUMO-протеазой является высокотехнологичной и может использоваться в промышленной биотехнологии [150].

2.2. Интеин-содержащие системы

2.2.1. Белковый сплайсинг

Впервые информация о белковом сплайсинге была опубликована Kane *et al.* в 1990 г. [151]. Тогда из-за схожести процессинга мРНК и сплайсинга белков, интеины называли «protein intron» и только в 1994 году они получили свое окончательное название – интеины (от **internal protein**) [152]. Согласно этому определению сплайсинг белков – посттрансляционный процесс с точным вырезанием внутренней части, соответствующей интеину, из белка-предшественника с последующим лигированием фланкирующих последовательностей, получивших название N- и C-экстеинов, с образованием зрелого белка. При этом данный процесс не требовал присутствия кофакторов или ферментов, т.е. является автокаталитическим. Схема экспрессии гена, кодирующего интеин-содержащий белок, и его сплайсинга представлена на Рис 11.

2.2.2. Особенности первичной структуры интеинов

Реакция белкового сплайсинга происходит при участии структурных и каталитических элементов, расположенных непосредственно в последовательности интеина, и нескольких экстеиновых остатков, граничащих с участками разрезания и лигирования [153 - 154]. При биоинформатическом анализе аминокислотных последовательностей более 100 интеинов были выделены 3 консервативных домена: N-концевой, C-концевой и центральный эндонуклеазный домен или короткий линкер [154, 155].

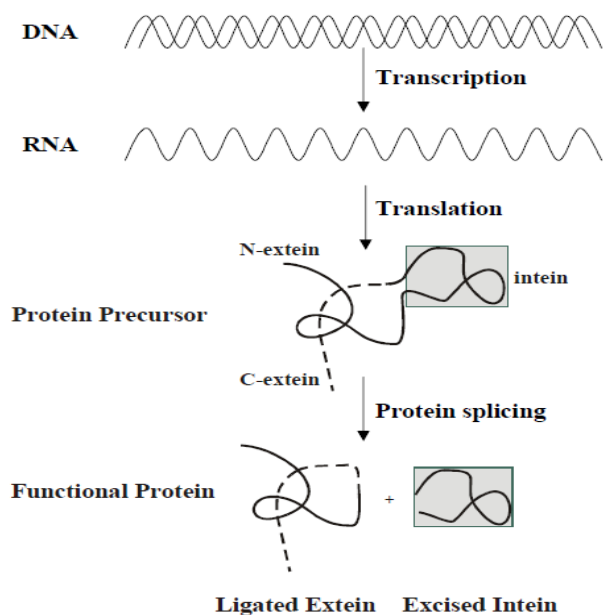


Рис. 11. Схема экспрессии гена, кодирующего интеин-содержащий полипептид [151].

Общая длина интеинов варьируется в диапазоне от 134 (мини-интеины) до 600 аминокислотных остатков. В N-терминальном домене выделяют 4 консервативных блока A, N2, B, N4, в C-терминальном и эндонуклеазном — соответственно F, G и C, D, E, H (Рис. 12).

В интееине последняя аминокислота практически всегда является Asn (очень редко - Gln), а предпоследняя – His. Эти две аминокислоты (Asn и His) являются критичными для сплайсинга [154, 156]. Также важную роль играет первая аминокислота С-экстеина (+1 аминокислота). Большинство открытых С-экстеинов в этом положении содержит одну из трех аминокислот – Ser, Cys и Thr [157]. Мутагенез в этих положениях приводит к полной терминации сплайсинга интееинов *in vivo* и накоплению разветвленных интермедиатов [156, 158].

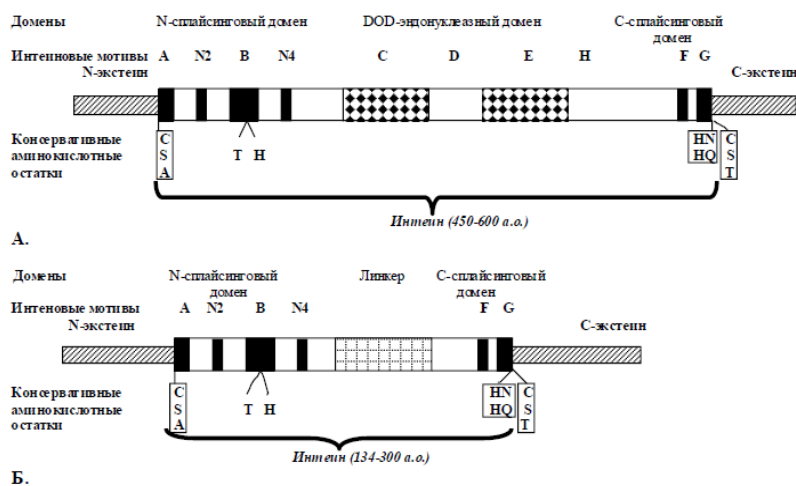


Рис. 12. Схема строения классических интееинов (А) и мини-интееинов (Б) [158].

2.2.3. Канонический механизм белкового сплайсинга

В связи с тем, что белковый сплайсинг является автокаталитическим процессом, протекающим с высокой скоростью, и не зависит от внешних факторов, долгое время невозможно было обычными методами обнаружить промежуточные соединения и установить его механизм [159, 160]. Единственным способом исследования механизма сплайсинга было получение устойчивых промежуточных разветвленных интермедиатов и их идентификация рентгеноструктурным анализом. Создание модифицированных интееин-содержащих гибридных белков с заменами критичных для сплайсинга аминокислот позволило определить основные стадии и предложить возможный механизм белкового сплайсинга (Рис. 13) [161].

Реакция сплайсинга протекает в 4 стадии:

стадия 1 – образование эфирной (тиоэфирной) связи между боковой цепью первого интееинового остатка (серин или цистеин) и карбонильным атомом углерода, прилежащего N-экстеиновому остатку (N-S (N-O) перэтерификация);

стадия 2 – нуклеофильная атака тиольной/гидроксильной группы первого С-экстеинового остатка по эфирной связи, образовавшейся на первом этапе (Рис. 13). На втором этапе происходит перенос N-экстеина на боковую группу первой аминокислоты С-экстеина (реакция трансэтерификации) и образуется разветвлённый интермедиат;

стадия 3 – циклизация С-концевого аспарагина интееинового домена с разрывом пептидной связи и выщеплением интееина;

стадия 4 – спонтанная перегруппировка эфирной/тиоэфирной связи между экстеиновыми фрагментами в более стабильную пептидную связь.

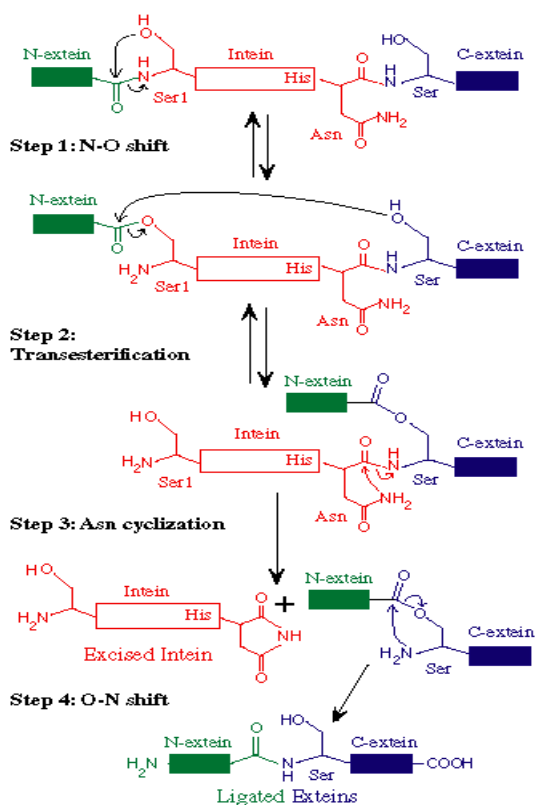


Рис. 13. Схема механизма белкового сплайсинга [159].

На модели модифицированного интеина *SceVMA* было показано, что расщеплению пептидной связи на N-конце интеина предшествует образование тетраэдрического интермедиата, что согласуется с представленной моделью (Рис. 14) [162, 163]. Поляризованный атомом кислорода Gly-1 SH-группа Cys1 атакует карбонильный атом углерода Gly-1. Последующая трансэтерификация возможна за счёт того, что N- и C-концевые субдомены интеина образуют антипараллельные β -слои, тесно связанные водородными и гидрофобными взаимодействиями.

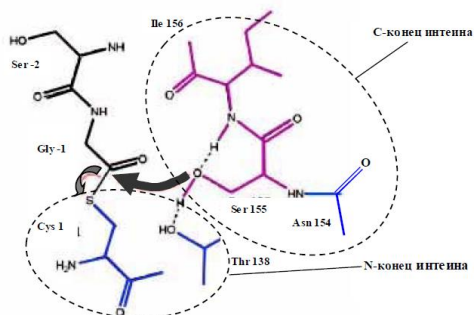


Рис. 14. Схема нуклеофильной атаки N-конца интеина боковым радикалом +1 аминокислоты. Стрелками показано смещение электронной плотности [156]. Ser-2, Gly-1 – C-концевые аминокислоты N-экстеина; Cys 1 – первая аминокислота интеина; Thr 138 – аминокислота в теле интеина; Asn 154 – C-концевая аминокислота интеина; Ser 155, Ile 156 – N-концевые аминокислоты C-экстеина.

Исследуя механизм сплайсинга, Cooper A.A. and Stevens T.H. показали, что в разрезании пептидной связи важную роль играет C-концевой аспарагин, так как мутации по этому остатку приводят к ингибированию сплайсинга [164]. Конформация разрываемой связи является

напряженной и способствует циклизации аспарагина. В то время как расположенный перед ним остаток гистидина оказывает стабилизирующее воздействие на переходное состояние за счёт образования водородной связи с карбонильным кислородом аспарагина. Было показано, что протон гистидина переносится на амидную группу циклизующегося аспарагина, с одновременным разрывом соответствующей пептидной связи [159]. Образовавшаяся между экстеинами эфирная (или тиоэфирная) связь самопроизвольно трансформируется в более стабильную амидную, при этом сукцинимид гидролизуется с образованием аспарагинового остатка [165].

2.2.4. Альтернативный механизм белкового сплайсинга для интеинов, содержащих аланин на N-конце

Путем биоинформатического анализа были выделены три семейства интеинов с N-концевым аланином вместо серина и цистеина, присутствующих в этом положении в большинстве случаев. Это интеины, входящие в состав предшественников хеликаз DnaB и Snf2 у зубактерий и белка KlbA у архебактерий. Согласно устоявшейся теории белкового сплайсинга первый этап реакции белкового сплайсинга невозможен без участия N-концевого нуклеофила, поэтому предполагалось, что подобные интеины неактивны [166]. Однако позднее было показано, что интеин *Mja* KlbA способен к сплайсингу и был предложен альтернативный механизм сплайсинга [166 - 168]. По-существу единственным отличием альтернативного механизма от классической модели белкового сплайсинга является отсутствие первой стадии, т.е. происходит атака первого остатка цистеина в С-экстеине по амидной связи на N-конце интеина с образованием разветвлённого интермедиата (Рис. 15).

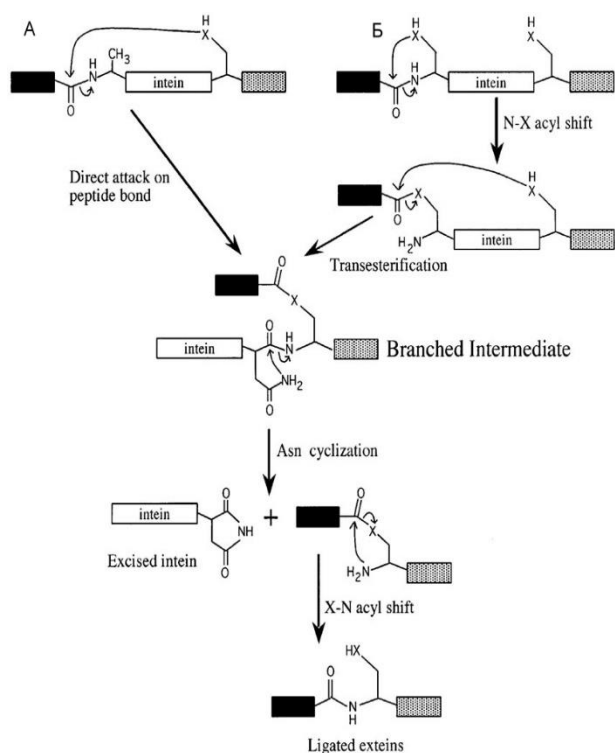


Рис. 11. Альтернативный (А) и канонический (Б) механизм белкового сплайсинга [168].

2.2.5. Факторы, влияющие на процесс белкового сплайсинга

В исследовании белкового сплайсинга *in vitro* с участием интеинов *Sc*VMA и *Psp*Pol-1 было показано, что для образования тиоэфирной связи для первой лимитирующей стадии реакции оптимальны слабокислые условия (pH 6.0) [154, 169].

В то время как сплайсинг, катализируемый интеинами из термофильных архейных организмов, происходит только при повышенных температурах (около 60 °С) [152], для мезофильных организмов показана наибольшая эффективность сплайсинга при 25 °С, а не при 37 °С. Это связано с тем, что белок-предшественник принимает правильную конформацию при более низкой температуре, в то время как при 37 °С происходит неправильный фолдинг белка и образуются неактивные агрегаты [153].

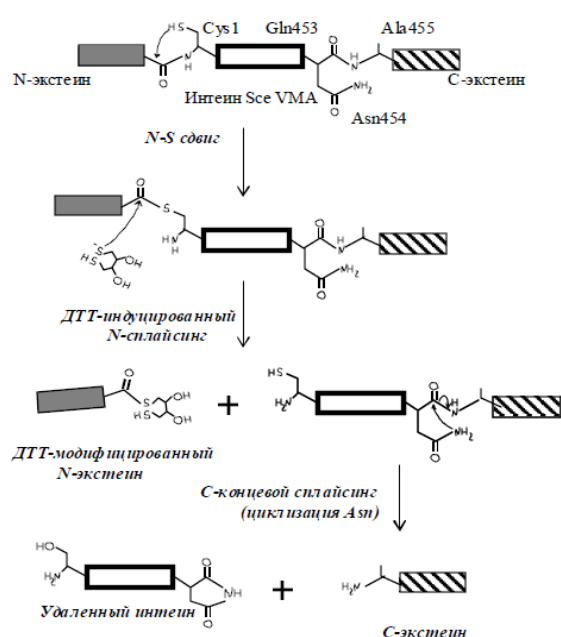


Рис. 12. Схема сплайсинга с участием модифицированного интеина *Sc* VMA в присутствии ДТТ [171].

Воздействие нуклеофильных агентов, таких как цистеин, гидроксиламин, дитиотреитол и др., приводит к расщеплению эфирной связи в интермедиатах, образованных на первых двух стадиях белкового сплайсинга, и, соответственно, к отделению N-концевого эстеина (Рис. 16) [170, 171].

Рентгеноструктурный анализ показал, что в C-концевом субдомене неактивного предшественника интеина *Sc* VMA с первым C-эстеиновым остатком связан ион цинка [162]. В работе Ghosh I. *et al.* на модели транс-сплайсинга интеинов *Ssp*DnaB и *Ssp*DnaE было сделано и подтверждено предположение об ингибирующем действии иона цинка на реакцию трансэтерификации, приводящем к остановке сплайсинга [172]. Связывание ионов цинка хелатирующими агентами, такими как EDTA, уже на стадии культивирования, приводило к сплайсингу белка-предшественника. Ионы других двухвалентных металлов Ca^{2+} и Mg^{2+} не оказывали влияние на процесс сплайсинга [172, 173].

Сплайсинг с участием модифицированного интеина *SspDnaE* с мутацией Cys1Val не ингибируется ионами цинка. Ингибирование интеинов *Mtu RecA* и *Sce VMA* ионами цинка обусловлено не только взаимодействием с первым остатком цистеина в С-экстеине, но и наличием дополнительных хелатирующих сайтов (предпоследний гистидин и Glu80 в *SceVMA*) [173].

Открытие явления белкового сплайсинга кроме неоспоримого вклада в представления о молекулярных основах жизни позволило по-новому подойти к решению ряда биотехнологических задач.

2.2.6. Системы очистки рекомбинантных белков на основе интеинов

В предыдущих разделах настоящего обзора литературы уже упоминался подход к очистке рекомбинантных белков с использованием различных дополнительных аффинных меток [51, 55, 58, 66, 74, 79]. Классический подход протеолитического расщепления гибридных белков для получения фармацевтических полипептидов является достаточно затратным и снижает экономическую рентабельность технологии.

Открытие интеинов позволило по-новому подойти к проблеме аффинных меток. Присоединение метки к одному концу интеина, связанного другим концом с целевым белком, дает возможность простой одностадийной очистки с помощью аффинного сорбента. Для этого гибридный белок сорбируется на смоле, индуцируется автокаталитическое расщепление, далее целевой полипептид элюируется, а белок-носитель, содержащий интеин и аффинный tag, остается на сорбенте.

Однако уже в первых работы по созданию подобных систем была показана необходимость предотвращения внутриклеточного сплайсинга, что было возможно посредством модификации (замены одной или нескольких аминокислот) последовательностей интеинов по положениям, критическим для сплайсинга [158, 171, 173]. В то же время сплайсинг *in vitro* с участием такого модифицированного белка может быть индуцирован тиольными соединениями, такими как дитиотреитол, β-меркаптоэтанол, MESNA или цистеин [171, 174].

Эта идея была реализована компанией New England BioLabs в экспрессионных системах интеин-опосредованной очистки белков, основанных на контролируемом расщеплении гибридных белков, содержащих N- или С-концевые модифицированные интеины: интеина VMA1 из *Saccharomyces cerevisiae* (система IMPACT-CN) и интеинов GyrA из *Mycobacterium xenopi*, DnaB из *Synechocystis sp.* и RIR1 из *Methanobacterium thermoautotrophicum* (система IMPACT-TWIN) [175 – 176].

Клонирование гена, кодирующего целевой полипептид, осуществляется в экспрессионный вектор таким образом, чтобы получить гибридный ген, содержащий в одной

рамке считывания целевой белок и N- или С-концевой модифицированный интеин и аффинную метку (Рис. 17). Такая конструкция гибридного белка позволяет проводить расщепление с освобождением целевого полипептида без использования экзогенных протеиназ, а наличие хитин-связывающего домена – легко очищать гибридный белок от примесных клеточных компонентов на аффинном сорбенте [77].

При получении целевого белка на N-конце интеина используется модифицированный интеин с заменой С-концевого аспарагина на аланин, блокирующей отщепление хитин-связывающего домена. Расщепление таких гибридных белков по N-концу интеина происходит на хитиновом сорбенте в присутствии тиол-содержащего агента (ДТТ, β-меркаптоэтанол, MESNA и др.) с высвобождением целевого полипептида в виде тиоэфирного производного (Рис. 17 В, С) [170, 174]. Такой полипептид с активированным С-концом может в дальнейшем использоваться в реакции нативного химического лигирования для присоединения синтетического пептида или флуоресцентной метки или циклизации молекулы.

Для получения целевого белка с помощью системы IMPACT-CN на С-конце гибридного белка используется модифицированный интеин *Sce* VMA, в котором сделана замена His453Gln для тиол-зависимого контроля процесса расщепления. При этом хитин-связывающий домен встроен в центральную область интеина вместо эндонуклеазного домена. К N-концу интеина присоединен небольшой фрагмент N-экстеина из 15 а.о., а целевой белок присоединен своим N-концом к С-концевому аспарагину интеина. Под действием тиольных реагентов, таких как ДТТ, β-меркаптоэтанол, MESNA или цистеин, происходит отщепление целевого белка и короткого N-экстеинового фрагмента от интеина *Sce*VMA.

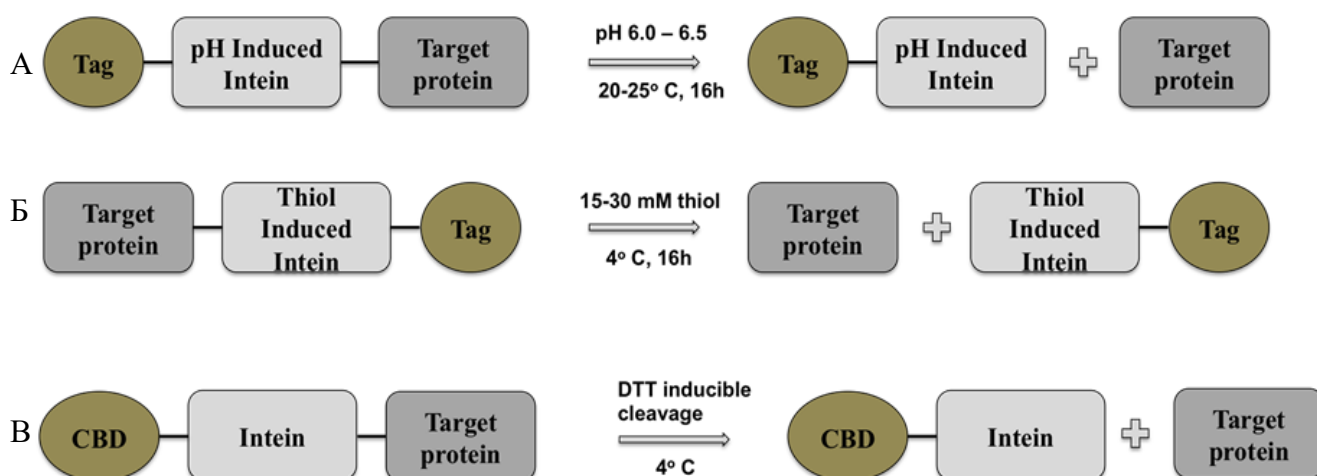


Рис. 17. Схема интеин-опосредованного получения целевых белков. А. С-концевое рН-индуцируемое расщепление гибридного белка. Б. N-концевое тиол-индуцируемое расщепление гибридного белка. В. С-концевое тиол-индуцируемое расщепление гибридного белка

Показательным примером использования системы IMPACT-CN может служить получение кателицидинподобного пептида SMAP-29 [177]. Сам пептид SMAP-29 токсичен по отношению к *E. coli*. Ген целевого пептида был клонирован в разном положении относительно интеина. Синтез гибридного белка с N-концевым SMAP-29 приводил к гибели клеток (Рис. 17Б). При синтезе гибрида, содержащего последовательность пептида на С-конце интеина *Sce VMA*, ингибирования бактериального роста не наблюдалось. Химерный белок иммобилизовывали на смоле с хитиновым сорбентом, а расщепление инициировали добавлением тиольного реагента (Рис. 17В). Выделенный рекомбинантный продукт проявил высокую дозозависимую бактерицидную активность.

С помощью системы IMPACT-CN было осуществлено выделение и очистка рекомбинантных белков, таких как MBP (мальтоза-связывающий белок), MsrB, T4 ДНК лигазы, рестриктаз BamHI, FseI и других. Для этого использовались оба варианта конструкций, в которых белок получался на N- или С-конце модифицированного интеина *Sce VMA* [174].

После появления системы IMPACT-CN были выявлены многие ее недостатки, а именно: большой размер белка-носителя, невозможность одновременного проведения стадий рефолдинга белка и автокаталитического расщепления, а также необходимость удаления фрагмента N-концевого экстеина при расщеплении гибридного белка. Многие эти недостатки были решены в системе IMPACT-TWIN на основе модифицированных мини-интеинов DnaB из *Synechocystis sp.*, GyrA из *Mycobacterium xenopi*. и RIR1 из *Methanobacterium thermoautotrophicum* [176, 178]. Используя один из векторов IMPACT-TWIN-системы можно получить три конструкции с различным расположением целевого белка относительно интеина/интеинов: на С-конце интеина-1, на N-конце интеина-2 и между двумя интеинами (Рис. 18).

Мини-интеин *SspDnaB* содержит мутацию Cys1Ala, блокирующую отщепление N-концевого экстеина и, как следствие, сплайсинг, но не влияющую на отщепление С-концевого хитин-связывающего домена (Рис. 18А). Гибридный белок мини-интеин *SspDnaB* с целевым белком на С-конце после иммобилизации на хитиновой смоле претерпевает рН-зависимое расщепление с высвобождением целевого белка.

В мини-интеинах *MthRIR1* и *MxeGyrA* сделана замена С-концевого аспарагина на аланин, которая блокирует реакцию белкового сплайсинга и отщепление С-концевого хитин-связывающего домена, но не влияет на образование эфирной (тиоэфирной) связи между боковой цепью первого интеинового остатка (серином или цистеином) и карбонильным атомом углерода прилежащего N-концевого целевого белка. Расщепление гибридных белков, содержащих мини-интеины *MthRIR1* и *MxeGyrA* на С-конце, а целевой белок на N-конце, индуцируется тиольными реагентами, такими как DTT и MESNA (Рис. 18Б).

Конструкции с положением целевого белка между двумя интеинами дают возможность получения циклических форм белка (Рис. 18В) [176].

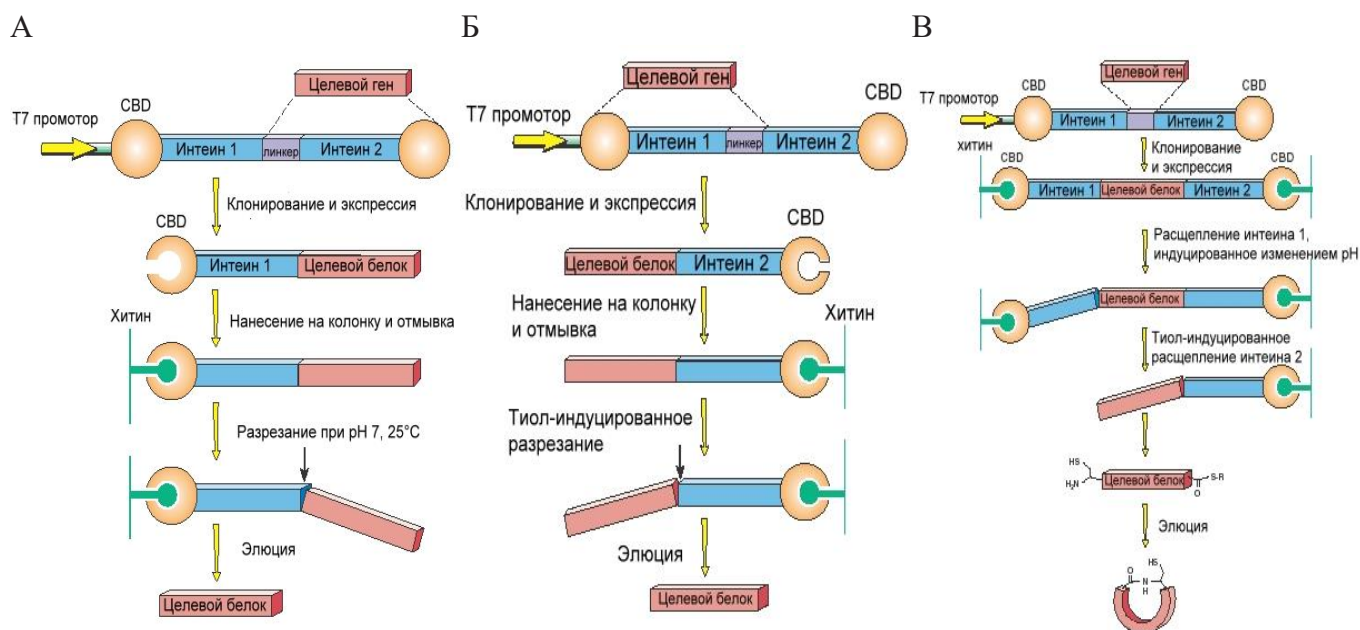


Рис. 18. Принципиальная схема получения целевых белков с помощью системы IMPACT-TWIN [176].

Ниже приведены некоторые примеры использования системы IMPACT-TWIN. С ее помощью был получен порин А, основной компонент внешней мембраны *Neisseria meningitides*, функционирующий как катионоактивный белок. Порин А активирует бактерицидный иммунный ответ после инфицирования и является потенциальным претендентом для включения в новые менингококковые вакцины. Авторами были подобраны оптимальные условия расщепления: индукция в течение 5 дней при pH 7.0 и температуре 4 °С. По мнению авторов, данная система может быть успешно использована для получения других бактериальных белков внешней мембраны для разработки вакцин [179 - 181].

Для экспрессии нативных рекомбинантных белков в клетках *E. coli* был сконструирован вектор pSB на основе мини-интеина *SspDnaB*. Ген человеческого интерферона альфа-4 (hIFNalpha-4) клонировали в векторе pSB и для экспрессии использовали штамм *E. coli* Origami B (DE3). Содержание hIFNalpha-4 при культивировании штамма-продуцента составило не менее 22 % общего клеточного белка. Эксперимент показал возможность получения рекомбинантных человеческих белков в клетках *E. coli* с правильно свернутой полипептидной цепью [182].

Нейротрофин-3 человека (hNT3), небольшой белок с молекулярной массой 14 кДа, является членом большого семейства нейротрофинов, участвующих в стимулировании роста, дифференциации и восстановления нервных клеток [183]. Предполагается, что hNT3 может использоваться в медицинских целях, как потенциальное терапевтическое средство при нервных заболеваниях, таких как поражение нервной системы, невралгия, периферийная

невропатия. hNT3 был получен в составе гибридного белка на N-конце модифицированного мини-интеина *MxeGyrA*, в котором в качестве аффинной метки использовался хитин-связывающий домен (Рис.19). Очистку, тиол-индуцируемое расщепление гибридного белка и выделение hNT3 проводили на колонке с хитиновым сорбентом [183]. Полученный белок был использован для научных исследований.



Рис. 19. Схема гибридного белка, содержащего нейротрофин-3 человека.

Интересный вариант использования интеиновой технологии был применен при конструировании гибридного белка, содержащего флуоресцентную метку, зеленый флуоресцирующий белок GFP [178]. Поскольку образование хромофора GFP зависело от правильности сворачивания полипептидной цепи, то появление флуоресценции свидетельствовало о нативной структуре белковой молекулы.

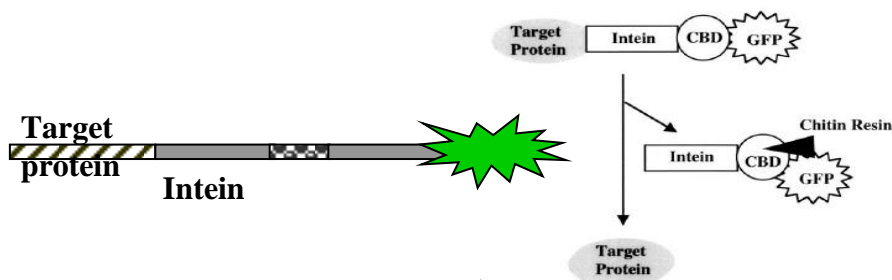


Рис. 20. Конструкция гибридного белка, содержащего GFP [178].

Была создана конструкция, в которой модифицированный мини-интеин *SspDnaE* был заключен между С-концевым GFP и N-концевым целевым белком (Рис. 20). В структуру мини-интеина был встроен хитин-связывающий домен (CBD). N-концевое расщепление интеина индуцировалось тиольными реагентами и приводило к высвобождению целевого белка.

Получение небольших по размеру пептидов (1–7 кДа), подверженных внутриклеточной деградации, также удобно осуществлять с помощью интеиновых систем. Примером такой технологии является получение мозгового натрийуретического пептида человека (brain natriuretic peptide, BNP) [184], статирина человека [185], ряда антимикробных пептидов [186], глюкагона человека [187], эпидермального фактора роста человека [188], оксинтомодулина [189], тимозина $\alpha 1$ [190] и тимозина $\beta 4$ [191].

Интеин-опосредованные экспрессионные системы получили распространение в лабораторной практике и в литературе имеются указания на возможность их использования и для промышленного применения [180 – 182, 192].

2.2.7. Интеин-опосредованное лигирование белков

Система IMPACT-TWIN позволяет проводить интеин-опосредованное лигирование двух разных белков [193]. Расщепление гибридных белков с С-концевым интеином происходит с освобождением целевого белка в виде тиоэфирного производного [169]. Такой белок, с активированным С-концом, может в дальнейшем использоваться в реакции нативного химического лигирования, позволяющей присоединить к белку синтетический пептид, другой белок или флуоресцентную метку, получить циклические или полимерные конструкции. Механизм образования циклических и полимерных конструкций представлен на Рис. 21 [193 - 194].

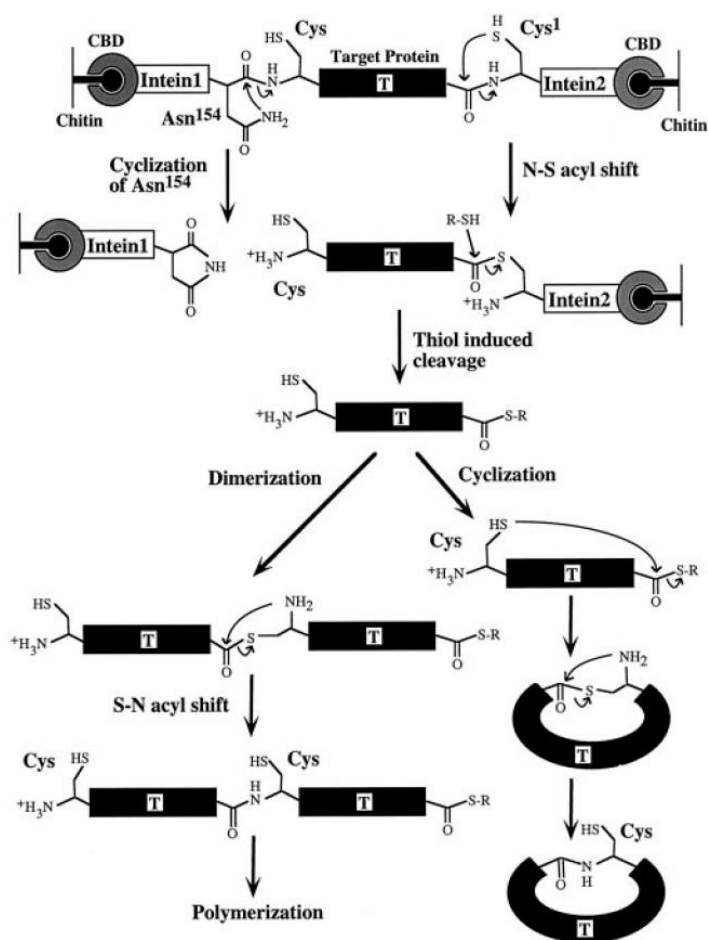


Рис. 21. Механизм получения циклических и полимерных форм белка [195].

Используя этот подход активации пептидов, вызванной N- и С-концевым расщеплением интеина *Sce VMA*, удалось лигировать мальтозо-связывающий белок (МВР) и Т4 ДНК-лигазу [194]. При этом в полученном гибридном белке ферментативная активность ДНК-лигазы сохранилась.

Практическим примером реализации этого подхода является получение циклической формы тиоредоксина с использованием IMPACT-TWIN системы. Расщепление по С-концу мини-интеина *SspDnaB* происходило при комнатной температуре при изменении pH с 8.5 до 7.0, при этом высвобождаемый белок имел N-концевой цистеин. Расщепление по N-концу мини-интеина *MxeGyrA* индуцировалось тиольным реагентом MESNA при 4°C, высвобождаемый белок имел активированный С-концевой тиоэфир. В результате внутримолекулярной реакции между N- и С-концами белка была получена циклическая форма тиоредоксина [195].

Также, циклические формы белков можно получать, используя конструкции с интеинами, способными к транс-сплайсингу (Рис. 22). Методика, с помощью которой возможно циклизовать белки, получила название SICLOPPS (Split Intein-mediated Circular Ligation Of Peptide and ProteinS) [196].

Такой подход был продемонстрирован на примере циклизации дегидрофолатредуктазы (ДФР) *E.coli* [197]. Процесс циклизации происходит по механизму транс-сплайсинга. После ассоциации фрагментов In и Ic с образованием активного интеина происходит сплайсинг с последующим лигированием N- и С-конца ДФР. Ферментативная активность циклической формы дегидрофолатредуктазы сохранилась, и существенно повысились период полужизни и термостабильность белка. Также с помощью этого подхода была получена циклическая форма GFP *in vivo* [198]. Причем авторы особо отмечают, что при использовании этого метода не возникает никаких побочных продуктов – линейных или полимерных молекул, в отличие от других способов циклизации белков.

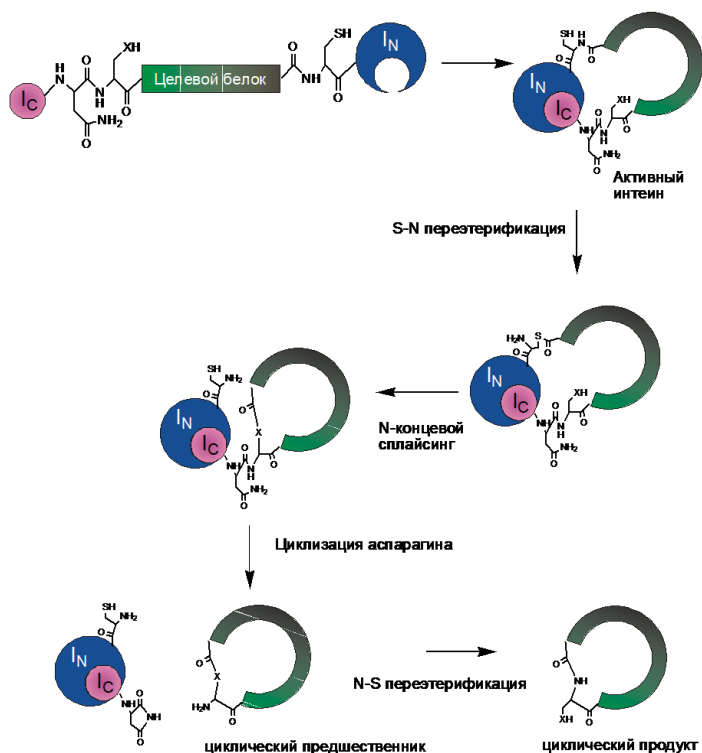


Рис. 22. Схема механизма циклизации белка методом SICLOPPS [197].

2.2.8. Модернизированные системы интеин-опосредованного выделения белков на основе полигидроксибутиратных гранул и эластин-подобных пептидов

Идеология интеин-опосредованного выделения полипептидов с использованием аффинного сорбента является очень эффективной и комфортной для работ в лабораторных условиях. Но использование аффинного сорбента является весьма дорогостоящим при промышленном производстве. Для того, чтобы исключить стадию аффинной хроматографии были разработаны подходы с использованием полигидроксибутиратных гранул (PHB) и эластин-подобных полипептидов (ELP) [186, 199].

2.2.8.1. Система очистки на основе полигидроксибутиратных гранул

Полигидроксибутираты (PHB) являются подклассом биodeгадирующих полимеров, синтезируемых в различных организмах, и обычно являющихся местами накопления избыточного количества углерода в отсутствие кислорода, азота или фосфора. Внутри клетки полигидроксибутираты имеют форму маленьких гранул, различающихся по морфологии в зависимости от организма и источника углерода. Были сконструированы модифицированные штаммы *E.coli*, способные накапливать значительные количества PHB [200]. Белки, связывающиеся с полигидроксибутиратами, получили название фазины (PhaP). Способность фазинов связываться с PHB гранулами была использована при создании новой технологии очистки белков на основе интеинов [201 - 203]. В этом случае, экспрессирующие клетки содержали 2 плазмиды: с одной из них экспрессировались гены, отвечающие за синтез PHB, в то время как с другой экспрессировался ген целевого белка в составе гибрида с интеином и фазином. Большой молекулярный вес PHB гранул позволяет легко отделять их от других клеточных компонентов путем центрифугирования, а также облегчает связывание с ними белка, содержащего фазин. Пример использования PHB для выделения интерферона α свиньи представлен на Рис. 23 [204]. Высокий выход рекомбинантного PoIFN α (до 30–35 мг с литра клеточной культуры) был получен в условиях интеин-опосредованного расщепления при pH 6.5 за 24 – 36 ч при 20 ° C. В данной работе продемонстрирована возможность крупномасштабного производства высокочистого и активного рекомбинантного PoIFN α с использованием PHB гранул при интеин-опосредованном отделении целевого белка.

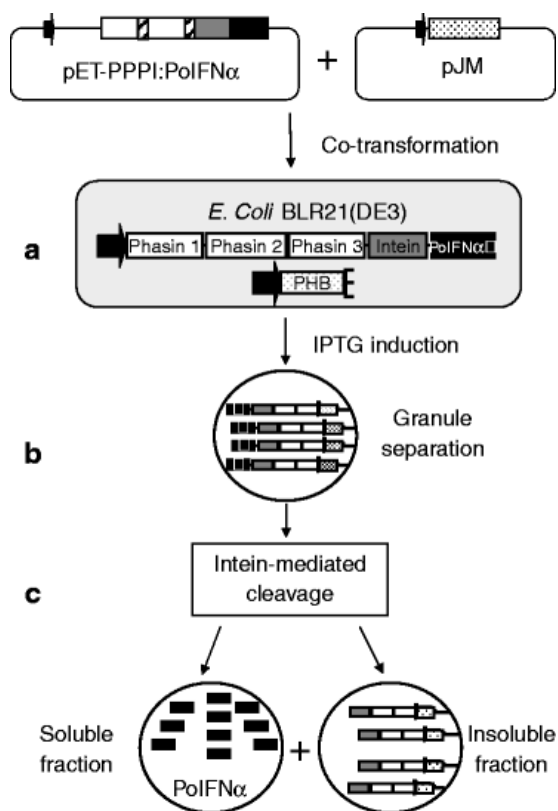


Рис. 23. Схема получения интерферона α свиньи с использованием полигидроксибутиратных гранул [204].

2.2.8.2. Система очистки на основе эластин-подобных полипептидов

Альтернативной технологией интеин-опосредованной очистки белков без использования аффинной хроматографии является система очистки на основе эластин-подобных полипептидов (ELP) [205]. ELP состоит из повторяющихся последовательностей из 5 а.о. V-P-G-X-G, где X – любая аминокислота. Под действием соли и температуры эти полипептиды меняют свои свойства и начинают агрегировать между собой, образуя нерастворимые комплексы, легко отделяющиеся центрифугированием. Впервые идея использовать ELP в качестве дополнительной последовательности (tag) для очистки гибридных белков была опубликована в работе Meyer D.E. *et al.* в 1999 г. [205]. Использование гибридного белка с сайтами узнавания тромбином и TEV-протеазой, предложенное позднее Hassouneh W. *et al.*, не нашло широкого применения [206]. Популярность ELP-tag резко возросла после соединения с интеиновой технологией [207]. Создавая гибридные белки, содержащие эластин-подобный полипептид, интеин и целевой белок (*ELP-intein-target protein*), можно довольно легко и быстро очищать и выделять такие гибридные белки путем добавления соли и изменения температуры (Рис. 24А). Добавление соли или повышение температуры до 30 °С, приводит к тому, что ELP части молекул гибридного белка агрегируют между собой в осадок, позволяя таким образом легко отделить белок от остальных растворимых компонентов клеточного лизата центрифугированием. Далее, изменением pH раствора до значений 6.0 - 7.0 добиваются

расщепления по С-концу интеина с высвобождением целевого белка [208]. Модификация этого способа заключается в разделении молекулы интеина на две части для предотвращения преждевременного расщепления гибридного белка *in vivo* (Рис. 24Б) [209].

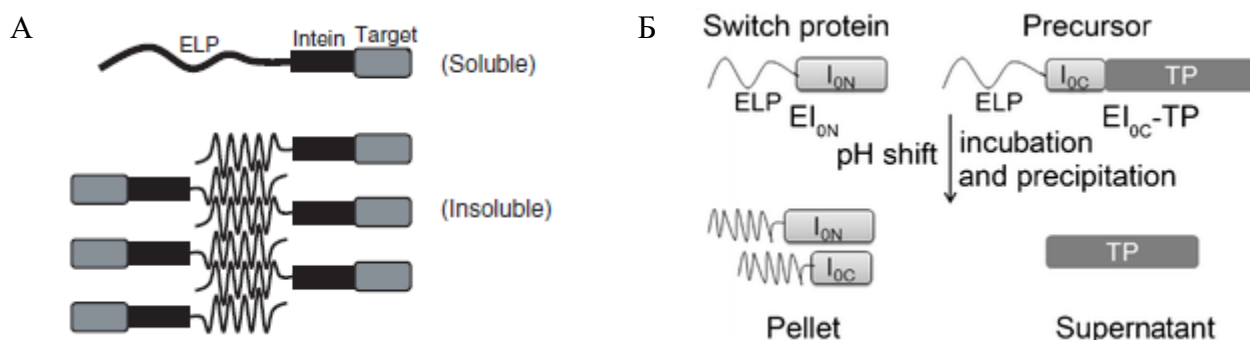


Рис. 24. А. Схема интеин-опосредованного получения белков с использованием ELP. Б. Модифицированная схема ELP-интеин-опосредованного получения белков [209].

В работе Banki M.R. *et al.* описан простой и эффективный ELP-интеин-опосредованного метода, который заключается в замене стадии центрифугирования на стадию микрофильтрации [207]. Однако технология использования ELP, успешно реализованная в исследовательских лабораториях, пока не используется в биотехнологическом производстве [210 - 211].

3. Штаммы-продуценты рекомбинантных белков

В настоящее время в распоряжении генных инженеров имеются предоставляемые разными фирмами многочисленные готовые наборы реагентов для получения рекомбинантных ДНК, начиная от молекулярных инструментов и заканчивая бактериальными штаммами и эукариотическими клеточными линиями, обеспечивающими эффективную экспрессию рекомбинантных генов. Для получения конкретных рекомбинантных белков осуществляется подбор штаммов *E.coli* с целью достижения максимальной экспрессии гена и высокого выхода целевого белка. Экспрессия в *E.coli* до сих пор остается предпочтительной при решении большинства задач, связанных с наработкой гетерологичных рекомбинантных полипептидов. Приблизительно 100 000 рекомбинантных белков получены в настоящее время с использованием *E. coli*, что составляет около 90 % всех белков, приведенных в базе данных белков Protein Data Bank (PDB) [212]. В том случае, если экспрессия гена в клетках *E. coli* сопровождается низким выходом или плохой растворимостью рекомбинантного белка вследствие неправильного фолдинга, повышенной деградацией или другими негативными факторами, приходится рассматривать клетки-хозяева альтернативного происхождения, источниками которых могут быть другие бактерии, археи, а также низшие и высшие эукариоты. За последние 15 лет в мире по тематике получения рекомбинантных белков в дрожжах было опубликовано свыше 3 тысяч научных исследований, за тот же период по тематике получения

рекомбинантных белков в *E. coli* было опубликовано почти 10 тыс. работ. При этом большая и все возрастающая часть исследований посвящена не фундаментальным, а прикладным направлениям, связанным с практическим применением биотехнологических разработок.

Основными преимуществами биотехнологического использования *E. coli* для получения рекомбинантных полипептидов являются:

- высокие уровни экспрессии;
- низкая стоимость культивирования;
- простота условий культивирования;
- быстрый рост;
- простое преобразование протоколов;
- возможность изменения многих параметров с целью оптимизации экспрессии;

Эти положительные черты экспрессионных систем *E. coli* неоднократно отмечались в научных обзорах и методологических исследованиях [213 - 215]. Решение прикладных биотехнологических задач значительно облегчается благодаря колоссальному объему накопленных знаний о генетике, биохимии и физиологии *E. coli*, приведших к созданию новых штаммов-носителей. Наиболее популярные коммерческие штаммы-носители представлены на Рис. 25.

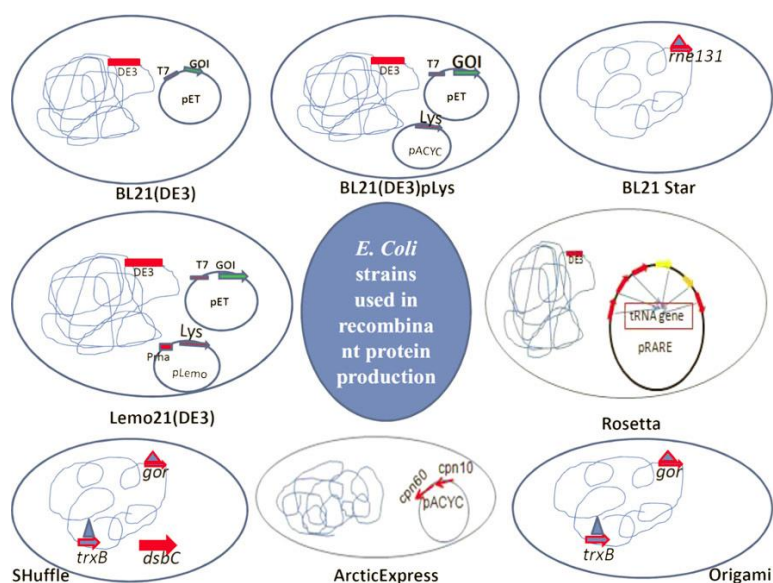


Рис. 25. Коммерческие штаммы-носители *E. coli*, наиболее часто используемые при получении рекомбинантных белков [215].

Вместе с тем неоднократно отмечались и основные недостатки систем экспрессии в *E. coli*:

- невозможность посттрансляционной модификации рекомбинантных белков;
- агрегация рекомбинантных белки в результате неправильного фолдинга с образованием внутриклеточных «тел включения»;
- потеря биологической активности вследствие неправильного фолдинга;

- снижение уровня экспрессии из-за недостаточно эффективной трансляции;
- внутриклеточная протеолитическая деградация белков;
- «кодоновое предпочтение», связанное с различиями в частоте встречаемости кодонов в различных организмах;
- наличие эндотоксинов в конечном препарате.

Значительная часть исследований по экспрессии рекомбинантных генов в *E.coli* была посвящена решению этих проблем [216 - 218].

3.1. Штаммы *E. coli* со сниженной протеолитической активностью и способные к посттрансляционной модификации рекомбинантных белков

Штамм *E. coli* BL21 (DE3) – один из самых распространенных штаммов-носителей для гетерологичной экспрессии рекомбинантных генов [219]. Он содержит фрагмент DE3 с последовательностью, кодирующей РНК-полимеразу фага T7, а также мутации в генах протеиназ Lon и OmpT.

Для усиления контроля экспрессии при работе с плазмидами постоянно проводится модификация штамма BL21 (DE3). Так были созданы штаммы BL21(DE3) pLysS и BL21(DE3) pLysE. Оба штамма содержат плазмиду с геном лизоцима, ингибирующим базальную активность РНК-полимеразы фага T7 и, таким образом, обеспечивающим строгий контроль экспрессии [220].

Еще одним примером успешной модификации штамма BL21 (DE3) является получение штамма с мутацией в гене *rne131*, которая позволила снизить активность РНКазы E и, соответственно, повысить стабильность клеточной мРНК [221]. Полученный штамм, получивший коммерческое название BL21 Star (Invitrogen), обладает более высоким уровнем экспрессии гетерологических генов [222].

Долгое время считалось, что прокариоты не могут осуществлять посттрансляционное N-гликозилирование, однако в 2002 г. Wacker M. *et al.* был получен первый генно-инженерный штамм *E.coli*, способный к гликозилированию чужеродных белков [223]. Процесс N-гликозилирования обеспечивался функционированием локуса *pgl* из *Campylobacter jejuni*, механизм действия которого был установлен Linton D. *et al.* в 2005 г. [224]. Следующим шагом стала попытка улучшить процесс гликозилирования и даже использовать ее для получения белкового антигена, конъюгированного с липополисахаридом [225 - 227].

Еще одна проблема для экспрессии генов эукариот в *E.coli* – это посттрансляционное N-ацетилирование белков. Как известно, до 98 % белков в клетках эукариот имеют ацетилированный N-концевой остаток [228]. У эукариот большинство белков ацетируются по α -аминогруппе N-концевой аминокислоты с помощью специфических комплексов N- α -

ацетилтрансферазы NatA [229]. Группе под руководством Mulvihill D.P. путем трансформации штамма *E. coli* BL21 (DE3) вектором с геном дрожжевой N- α -ацетилтрансферазы NatB был получен штамм, способный ацетилировать синтезируемые белки по N-концу [230]. Пока это только лабораторная методика и вопрос о ее масштабировании пока не рассматривался.

Опубликован целый кластер работ, связанных с внесением модификаций в хромосомную ДНК штаммов-носителей. Начиная с работ группы Walker по модификации BL21(DE3) эти исследования стали весьма востребованными и многочисленными [223, 231 - 233].

К настоящему времени разработано несколько новых подходов по изменению генома *E.coli* для усиления экспрессии (Таблица 5). Эти методы позволяют создавать оптимизированные экспрессионные штаммы *E. coli* способом, аналогичным методологии метаболической инженерии для синтеза низкомолекулярных соединений [234]. Это еще больше расширяет арсенал штаммов *E. coli* и биотехнологические возможности их применения для получения целевых белков и пептидов, как в лабораторной практике, так и для промышленного производства

Таблица 5. Наиболее часто используемые коммерческие штаммы-носители.

Штамм/ Вектор	Фирма	Характеристики	Условия
BL21	Novagen	– Деактивация протеаз lon и ompT – Подходит для векторов с промотором для РНК-полимеразы <i>E.coli</i>	До 2 % глюкозы в среде
BL21(DE3)	Novagen	– Содержит фрагмент DE3 с геном РНК-полимеразы бактериофага T7, экспрессия индуцируется ИПТГ – Деактивация протеаз lon и ompT	До 2 % глюкозы в среде
BL21(DE3)- pLysS/ BL21(DE3)- pLysE	Novagen	– Содержит фрагмент DE3 с геном РНК-полимеразы бактериофага T7, экспрессия индуцируется ИПТГ – Деактивация протеаз lon и ompT – Конститутивный синтез лизоцима T7 (в штамме с pLysE на более высоком уровне) для ингибирования РНК-полимеразы бактериофага T7 и, соответственно, базальной экспрессии целевого гена – pLys содержит p15A origin, совместимый с плазмидами, содержащими ColE1 или pMB1 (например, pUC- или pBR322-производные плазмиды)	Хлорамфеникол 34 мкг / мл До 2 % глюкозы в среде
BL21-A1	Invitrogen	– Содержит хромосомную копию гена полимеразы T7 РНК под жестким контролем промотора araBAD, индуцируемого арабинозой. При использовании векторов, содержащих lacI, требуется ИПТГ. – Деактивация протеаз lon и ompT	Тетрациклин 12,5 мкг/мл, индукция арабинозой, репрессия глюкозой

Штамм/ Вектор	Фирма	Характеристики	Условия
BL21-SI	Invitrogen	– Содержит фрагмент DE3 с геном РНК-полимеразы бактериофага Т7 под контролем proU-промотора, экспрессия индуцируется при 0.1-0.5 М NaCl - Деактивация протеаз lon и ompT	Безсолевая LB среда, 30°C, индукция NaCl (при T7 промоторе) или ИПТГ (при tac/lac промоторе в векторе)
NiCo21 (DE3)	New England Biolabs	– Производное штамма BL21 (DE3) – Облегчает очистку белков, содержащих His-tag за счет модификации примесных белковых белков (добавлен хитин-связывающих домен)	До 2 % глюкозы в среде
Lemo21 (DE3)	New England Biolabs	– Производное штамма BL21 (DE3) для синтеза токсичных и мембранных белков – Содержит плазмиду pLemo, несущую ген лизоцима lysY под контролем rhaP _{BAD} промотора	Индукция синтеза лизоцима при внесении рамнозы до 2 мМ Индукция ИПТГ
KRX	Promega	– Производное штамма K12 – Содержит хромосомную копию гена полимеразы Т7 РНК под жестким контролем под контролем rhaP _{BAD} промотора, индуцируемого рамнозой. При использовании векторов, содержащих lacI, требуется ИПТГ. – Мутация в гене РНКазы E, что снижает деградацию мРНК и, соответственно, увеличивает экспрессию белка – Заблокирована рекомбинация (recA-) – Деактивация протеаз ompP и ompT	Индукция рамнозой. Репрессия глюкозой
M15	Qiagen	– Производное штамма M15 DZ291 – Содержит плазмиду pREP4, несущую ген lacI ^Q репрессора lacI (конститутивный синтез) – Для работы с векторами, на основе промоторов для РНК-полимеразы <i>E.coli</i> (T5)	Устойчивость к канамицину 25 мкг/мл
JM109	New England Biolabs	– Для работы с векторами, на основе промоторов для РНК-полимеразы <i>E.coli</i> (T5) – Мутация в гене РНКазы E, что снижает деградацию мРНК и, соответственно, увеличивает экспрессию белка – Заблокирована рекомбинация (recA-) – Деактивация протеаз lon – lac промотор и lacI репрессор	
JM109 (DE3)	New England Biolabs	– Производное штамма JM109 – Содержит фрагмент DE3 с геном РНК-полимеразы бактериофага Т7, экспрессия индуцируется ИПТГ	
C2523 NEB	New England Biolabs	– Улучшенное производное штамма BL21 для работы с векторами на основе промоторов	

Штамм/ Вектор	Фирма	Характеристики	Условия
Express		Plac, Ptac, Ptrc – Мутация в гене RNКазы E, что снижает деградацию мРНК и, соответственно, увеличивает экспрессию белка – Заблокирована система рестрикции неметилированной ДНК	
C3037 NEB Express I ^q	New England Biolabs	– Производное штамма C2523 для ИПТГ-индуцируемой экспрессии с генов в плазидах без T7 промотора – Несет копию гена LacI ^Q для контроля базальной экспрессии	Хлорамфеникол 34 мкг / мл
C2566	New England Biolabs	– Производное штамма BL21 – Содержит хромосомную копию гена RNК-полимеразы фага T7, индуцируется ИПТГ	
C3010	New England Biolabs	– Производное штамма BL21 – Содержит хромосомную копию гена RNК-полимеразы фага T7, индуцируется ИПТГ – Конститутивный синтез лизоцима T7 с плазмиды pLysY для ингибирования RNК-полимеразы бактериофага T7 и, соответственно, базальной экспрессии целевого гена	
C3019	New England Biolabs	– Производное штамма BL21 – Содержит хромосомную копию гена RNК-полимеразы фага T7, индуцируется ИПТГ – Конститутивный синтез лизоцима T7 с плазмиды pLysY для ингибирования RNК-полимеразы бактериофага T7 и, соответственно, базальной экспрессии целевого гена – Несет копию гена LacI ^Q для контроля базальной экспрессии	Хлорамфеникол 34 мкг / мл
OverExpress C41 (DE3)/ OverExpress C41 (DE3) pLysS	Lucigen	– Производные штаммов BL21 (DE3) и BL21 (DE3) pLysS – Содержит мутации в геноме для снижения активности RNК-полимеразы бактериофага T7, способствующие экспрессии токсичных белков	
OverExpress C43 (DE3)/ OverExpress C43 (DE3) pLysS	Lucigen	– Производные штаммов OverExpress C41 (DE3) и OverExpress C41 (DE3)pLysS – Содержит мутации в геноме для снижения активности RNК-полимеразы бактериофага T7, способствующие экспрессии токсичных белков, а также жизнеспособности клеток при накоплении токсичных белков	

3.2. Оптимизация рекомбинантных генов по составу кодонов и повышение эффективности трансляции

Проблемы экспрессии гетерологичных белков в прокариотических клетках, связанных с разницей во встречаемости кодонов, начинали исследоваться еще в 80-х годах XX века, а сам

эффект получил название «кодонного предпочтения» [235]. Позднее на основе анализа литературы была предложена простая и эффективная мера использования синонимичного «кодонного предпочтения» – индекс адаптации кодонов – CAI (Codon Adaptation Index) [236]. При этом интерес фундаментальной науки быстро сменился решением прикладных задач повышения уровня гетерологической экспрессии генов в *E.coli* [216]. Следует отметить, что синтетические гены, последовательность которых была оптимизирована с учетом соответствия предпочтениям клеток штамма-хозяина или максимизации индекса CAI, во многих случаях успешно экспрессировались [236 - 238]. Для автоматизации процесса оптимизации кодонов были созданы ряд программ, среди которых весьма популярны Codon optimizer и OPTIMIZER [239 - 240].

Успехи синтетической химии олигонуклеотидов позволили говорить об экономической эффективности синтеза и экспрессии рекомбинантных генов с учетом оптимизации кодонов [241 - 242]. Накопленный опыт для гетерологической экспрессии химически синтезированных оптимизированных генов систематизирован и представлен в обзоре Xiong A-S *et al.* [243].

Решение проблемы «кодонного предпочтения» возможно двумя способами: использование в целевых рекомбинантных генах только «нужных» кодонов или создание новых штаммов, способных эффективно экспрессировать гены с редкими кодонами. Очевидно, что первый путь целесообразен для вновь синтезируемых химическими или химико-ферментативными способами сравнительно небольших нуклеотидных последовательностей. Для больших последовательностей, когда химический синтез является затратным, были созданы штаммы *E.coli*, имеющие дополнительные гены редких тРНК (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC и GGA): штаммы *E. coli* CodonPlus (RIL или RP, Stratagene) и штамм Rosetta (Novagene). Штамм Rosetta-gami был создан на основе BL21 (DE3). Штаммы фирмы Stratagene имеют некоторое отличие в использовании: CodonPlus-RIL используется при «кодонном предпочтении» богатого АТ-генома, в то время как штамм CodonPlus-RP – богатого GC-генома. В отличие от CodonPlus Stratagene, штамм Rosetta содержит все кодирующие гены редких тРНК в одном штамме, так что он одинаково эффективен как для АТ и для GC- богатых геномов.

Подробное изучение вопроса оптимизации кодонов выявило новые критические факторы для экспрессии генов эукариот в *Escherichia coli*: стабильность мРНК и ее вторичная структура [244]. Более того, было установлено, что помимо «кодонного предпочтения» эффективность экспрессии определяется и другими факторами, влияющими на скорость трансляции (Рис. 26) [245].

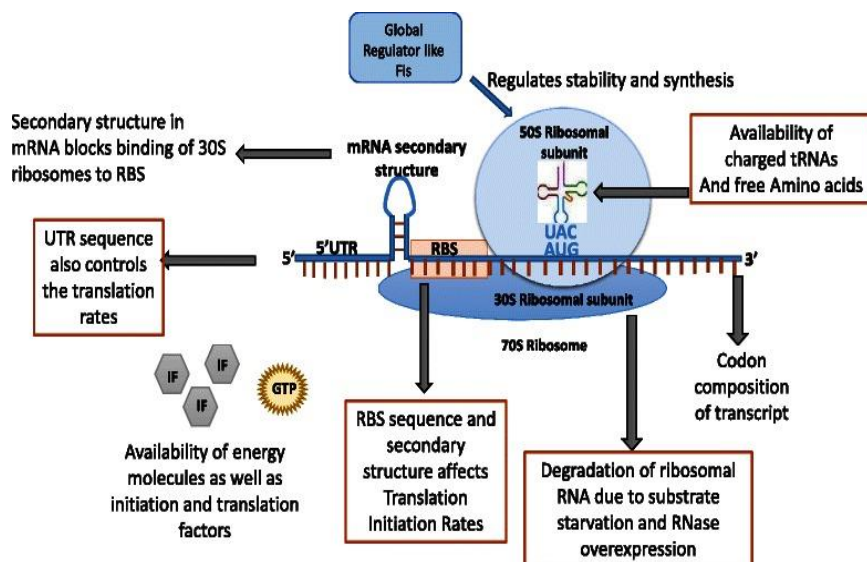


Рис. 26. Факторы, влияющие на эффективность трансляции: а) вторичная структура мРНК RBS, влияющая на скорости инициации трансляции (ТИР) и последовательности UTR; б) деградация рибосом из-за отсутствия субстрата и экспрессии РНКазы; в) наличие заряженной тРНК, которая зависит от количества АТФ и предпочтения кодонов. [245].

Среди многочисленных факторов, определяющих эффективность трансляции, важную роль играют первые несколько кодонов мРНК (инициация трансляции) и вторичная структура мРНК, при этом вторичная структура участка рибосомного связывания (RBS) очень важна для эффективной инициации трансляции. В процессе экспрессии рекомбинантных генов в *E.coli* может происходить ингибирование трансляции из-за наличия вторичных структур в RBS или в области 5'UTR. Вычислительные средства, такие как «ExEnSo» (Expression Enhancer Software), предлагают платформу, где нуклеотидные последовательности рекомбинантных генов могут быть заранее проанализированы и скорректированы, чтобы избежать ингибирования трансляции из-за вторичных структур мРНК [246]. В сочетании с успехами синтетической олигонуклеотидной технологии это позволяет существенно повышать эффективность экспрессии рекомбинантных генов [247 - 248].

В Таблице 6 сгруппированы существующие коммерческие штаммы, предназначенные для экспрессии генов с редко-встречающимися кодонами или повышения эффективности трансляции.

Таблица 6. Наиболее часто используемые коммерческие штаммы-носители, решающие проблемы «кодонного предпочтения» или стабильности мРНК

Штамм/ Вектор	Фирма	Характеристики	Условия
One Shot BL21 Star/ BL21 Star DE3/ BL21 Star DE3 pLysS	Invitrogen	– Производные от соответствующих штаммов линейки BL21 – Мутация в гене РНКазы E, что снижает деградацию мРНК и, соответственно, увеличивает экспрессию белка	До 2 % глюкозы в среде
KRX	Promega	см. Таблицу 5	
Rosetta/ Rosetta DE3/	Novagen	– Производные от соответствующих штаммов линейки BL21	До 2 % глюкозы в среде

Штамм/ Вектор	Фирма	Характеристики	Условия
Rosetta DE3 pLysS/ Rosetta DE3 pLacI		– Версия с pLacI содержит плазмиду, несущую дополнительный ген lacI ^Q – Плазида pRARE содержит 6 генов тРНК для редко-встречающихся кодонов (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA и CCC)	Хлорамфеникол 34 мкг/мл (pLysS и pLacI)
Rosetta 2/ Rosetta 2 DE3/ Rosetta 2 DE3 pLysS/ Rosetta 2 DE3 pLacI	Novagen	– Производные от соответствующих штаммов линейки BL21 – Версия с pLacI содержит плазмиду, несущую дополнительный ген lacI ^Q – Плазида pRARE 2 содержит 7 генов тРНК для редко-встречающихся кодонов (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC и CGG)	До 2 % глюкозы в среде Хлорамфеникол 34 мкг / мл
BL21- Codonplus RIL и RP / BL21- Codonplus (DE3) RIL и RP / BL21- Codonplus (DE3) RIPL	Agilent	– Производные от соответствующих штаммов линейки BL21 – Содержат дополнительные гены тРНК для AT-богатых кодонов (RIL версия, кодоны AGA, AGG, AUA, CUA) и GC-богатых кодонов (RP версия, кодоны AGA, AGG и CCC) – Версия RIPL универсальна, содержит все перечисленные варианты генов тРНК	Хлорамфеникол 34 мкг / мл

3.3. Растворимость и образование дисульфидных связей рекомбинантных белков

Наиболее сложной и распространенной проблемой экспрессии гетерологичных генов в *E.coli* является образование нерастворимых белковых агрегатов, так называемых тел включения (inclusion bodies, IBs). Образование тел включения – это результат интенсивного неконтролируемого биосинтеза чужеродного для *E.coli* белка, который не может или не успевает сформироваться в «правильно» структурированную молекулу и как следствие – агрегирует в нерастворимый хаотичный клубок. Это явление, многократно описанное и хорошо известное всем исследователям, занимающимся экспрессией рекомбинантных генов, стало одной из основных проблем использования штаммов *E.coli* [249 - 250].

Вопрос получения растворимого и функционально активного рекомбинантного белка не может иметь одного общего решения для любого гетерологичного гена [251]. Скорее следует говорить об основных стратегических направлениях увеличения экспрессии и растворимости сверхэкспрессированного белка: (1) изменение вектора, (2) изменение хозяина, (3) изменение параметров культивирования рекомбинантного штамма, (4) совместная экспрессия (ко-экспрессия) других генов [216].

Изменение вектора означает либо изменение промотора, под контроль которого должен быть клонирован целевой ген, или изменение белка-партнера, который влияет на растворимость рекомбинантного белка в *E.coli*. Как уже обсуждалось выше, векторы pET с His-tag являются

наиболее популярными благодаря наличию сильного промотора и возможности проводить выделение белка с помощью металл-хелатной хроматографии [52]. Полигистидиновая последовательность иногда существенно уменьшает растворимость гибридного белка и в этом случае может быть использован вектор рНАТ фирмы «Clontech». Этот вектор семейства рЕТ содержит новый 19-ти членный эпитоп, содержащий 6 остатков гистидина, чередующихся с заряженными аминокислотами, и также способный связываться с Ni-NTA сорбентом [215].

Если использование рНАТ вектора не помогает, то для решения проблемы растворимости гибридного белка можно воспользоваться векторами с GST-tag или рMAL, т.е. с глутатион-трансферазой или мальтозо-связывающим белком, соответственно. Как уже отмечалось в настоящем обзоре в разделе, посвященном конструкции экспрессионных векторов, GST-tag способствует повышению растворимости гибридного белка, однако обычно используется для научных целей. В то же время использование мальтозо-связывающего белка как белка-партнера также обеспечивает повышенную растворимость гибридного белка и может применяться при масштабной наработке [251 - 253]. Основным недостатком систем рMAL и рGEX является большой размер вспомогательного tag (Таблица 7). Это, во-первых, снижает конечный выход целевого белка, а, во-вторых, может мешать функциональной активности целевого белка, и, следовательно, требует отщепления и удаления tag-фрагмента. Вместо GST-tag или MBP-tag могут быть использованы системы с тиоредоксином или SUMO, в которых также повышена растворимость гибридного белка [96, 113]. Наилучшим выбором для получения растворимых белков являются tag на основе дисульфидизомеразы DsbA [254] и NusA [255], а для димеризации белков – Fc домен иммуноглобулина IgG [256].

Таблица 7. Вспомогательные последовательности, обычно используемые для повышения растворимости белков [216].

Tag	Описание	Размер
НАТ	Остатки гистидина, чередующиеся с заряженными аминокислотами	19 а.о.
GST	Глутатион S-трансфераза	211 а.о.
MBP	Мальтозо-связывающий белок	396 а.о.
Sumo	Малые убиквитин-подобные молекулы	100 а.о.
Trx	Тиоредоксин	109 а.о.
DsbC	Дисульфидизомеразы С	215 а.о.
NusA	N utilization substance protein A Фактор терминации/антитерминации транскрипции	495 а.о.
Fc	Fc домен иммуноглобулина	227 а.о.

Важным аспектом, связанным с растворимостью рекомбинантного белка, является образование дисульфидных связей. В *E. coli* дикого типа функционируют ферменты (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD), обеспечивающие образование дисульфидных связей в белках в периплазматическом пространстве. Продукт гена DsbA действует в качестве первичной оксидоредуктазы, тогда как периплазматический DsbC, как полагают, действует как изомераза дисульфидной связи, «помогающая» белкам сформировать правильные дисульфидные связи. Таким образом, если целевой рекомбинантный белок содержит дисульфидные связи, то один из вариантов его получения в активной форме – транспорт в периплазматическое пространство. Компанией New England BioLabs для реализации этого подхода был создан вектор pMAL-p5, в котором MBP-tag включает сигнальную последовательность для локализации гибридного белка в периплазме [257].

Однако этот путь явно не является оптимальным, т.к. транспорт целевого белка ограничен пропускной способностью транспорта внутренней мембраны и объемом периплазматического пространства. Альтернативное решение было предложено Beckwith J. *et al.*, которое привело к созданию штаммов *E. coli*, обеспечивающих образование дисульфидных связей в белках в цитоплазме [258, 259]. Эти штаммы, получившие название Origami и Rosetta-gami, а также их производные DE3 и DE3 pLysS предлагаются фирмой Novagen. Штаммы несут делеции в локусах глутатионредуктазы (*gor*) и тиоредоксинредуктазы (*trxB*), приведшие к изменению восстановительного потенциала цитоплазмы, что способствует образованию дисульфидных связей. Дальнейшее развитие этой идеи привело к созданию эффективных штаммов семейства Shuffle (New England BioLabs) с внутрицитоплазматической дисульфидизомеразой DsbC [260].

Для «правильной сборки» синтезируемого в *E. coli* рекомбинантного белка широко используются вспомогательные белки – шапероны, идея применения которых для правильной укладки полипептидной цепи высказывалась еще 20 лет назад [261, 262]. Некоторые шапероны предотвращают полипептиды от агрегации, в то время как другие помогают в сольюбилизации агрегированных белков [263]. Небольшие белки теплового шока IrbA и IrbB являются АТФ-независимыми и также снижают агрегацию рекомбинантных белков [264]. Описано улучшение растворимости рекомбинантных фрагментов антител при совместной экспрессии генов шаперонов Skp и FkpA [265]. Компанией Takara Bio Inc предложен набор «Chaperone Plasmid Set», включающий 5 векторов с разными комбинациями генов шаперонов DnaK, DnaJ, GrpE, GroES, GroEL, *tig* под контролем промоторов *araB* или *tetA* для совместной экспрессии с целевыми генами [266].

Было установлено, что добавление некоторых веществ, получивших название химические шапероны, в культуральную среду (некоторые аминокислоты, глицерин и пр.)

также снижает образование тел включения [267]. Следует подчеркнуть, что использование шаперонов для экспрессии рекомбинантных генов эукариот получило широкое распространение не только в лабораторных масштабах, но и при large-scale ферментации [268, 269].

Эффект существенного снижения агрегации рекомбинантных белков в бактериях при пониженной температуре культивирования был описан еще в 1989 г. в работе Schein С.Н. [270]. Позднее была предложена модель, объясняющая этот эффект [271, 272]. По мнению некоторых авторов, прямым следствием снижения температуры является частичное исключение протеаз теплового шока, вызванное условиями сверхэкспрессии [271]. Кроме того, активность и экспрессия некоторых шаперонов *E.coli* повышаются при снижении температуры культивирования до 30 °С [273, 274].

Однако резкое снижение температуры культивирования замедляет основные клеточные процессы: репликацию, транскрипцию и трансляцию [275]. Традиционные промоторы, используемые в векторах для экспрессии рекомбинантного белка, также сильно зависят от температуры [270]. В то же время низкие уровни индукции приводят к увеличению количества растворимого рекомбинантного белка [276, 277]. По-видимому, это является результатом снижения концентрации белка в клетках, что способствует правильной сборке рекомбинантных молекул. Тем не менее, рост бактерий снижается, что приводит к уменьшению количества биомассы и увеличению продолжительности ферментации.

Чтобы преодолеть негативные последствия низкотемпературного культивирования *E.coli*, компанией Takara Bio Inc была разработана система «pCold Set», основанная на промоторе *cspA* для экспрессии белков при низкой температуре [278, 279]. Индукция промотора *cspA* происходит при снижении температуры до 15 °С и подавляется при температуре выше 37 °С. Примером использования такой системы является получение TolAI-β-лактамазы, токсичной для *E. coli* и быстро деградирующей при 37 °С. Культивирование при температуре от 15 до 23 °С блокирует деградацию гибридного белка, и токсический фенотип, связанный с экспрессией при 37 °С, подавляется. Было высказано предположение, что эта система является ценным инструментом для получения белков, содержащих мембрано-ассоциированные домены.

Недавно была предложена экспрессионная система «ArcticExpress» (Agilent Technologies) на основе совместной экспрессии целевого белка с шаперонами из психрофильной бактерии *Oleispira antarctica*. Два шаперона (*Csp60* и *Csp10*) из этой арктической бактерии позволяют проводить выращивание без снижения скорости роста при 4 °С [280, 281]. Этот подход позволяет осуществлять высокоэффективную экспрессию рекомбинантного гена и правильную

укладку белка. Фактически эта технология, по мнению авторов, может обеспечить эффективное получение мембранных белков при пониженной температуре культивирования.

В Таблице 8 представлена подборка наиболее эффективных штаммов-носителей, использующихся для синтеза белков в растворимой форме.

Таблица 8. Использование различных штаммов *E.coli* и вспомогательных плазмидных векторов для повышения растворимости белка.

Штамм/ Вектор	Фирма	Особенности	Условия
Tuner/ Tuner DE3/ Tuner DE3 pLysS/ Tuner DE3 pLacI	Novagen	<ul style="list-style-type: none"> – Производные соответствующих штаммов линейки BL21 – Версия с pLacI содержит плазмиду, несущую дополнительный ген lacI^Q – Делеция lacZY. Мутация в гене lac пермеазы lacY, способствующая равномерному проникновению ИПТГ при индукции экспрессии. Это обеспечивает дозо-зависимую индукцию и приводит к повышению растворимости и правильному рефолдингу мультимерных молекул. Не способен утилизировать лактозу 	
Origami / Origami DE3/ Origami DE3 pLysS/ Origami DE3 pLacI	Novagen	<ul style="list-style-type: none"> – Производные штамма K12 – Штамм без DE3 предназначен для работы с векторами на основе промоторов для РНК-полимеразы <i>E.coli</i> (T5) – Штаммы с маркировкой DE3 содержат фрагмент DE3 с геном РНК-полимеразы фага T7, экспрессия индуцируется ИПТГ – Мутация в генах gor и trxB (глутатион- и тиоредоксинредуктаз) – В штаммах с маркировкой pLysS и pLacI конститутивно синтезируется лизоцим и репрессор lacI, соответственно, сильнее контролируется базальная экспрессия полимеразы. 	Канамицин 15 мкг/мл Тетрациклин 12.5 мкг/мл Хлорамфеникол 34 мкг/мл (pLysS и pLacI)
Origami 2/ Origami 2 DE3/ Origami 2 DE3 pLysS/ Origami 2 DE3 pLacI	Novagen	<ul style="list-style-type: none"> – Производные штаммов семейства Origami – Мутация в генах gor и trxB (глутатион- и тиоредоксинредуктаз) – За счет убранной устойчивости к канамицину, значительно расширены возможные комбинации с векторами – В штаммах с маркировкой pLysS и pLacI конститутивно синтезируется лизоцим и репрессор lacI. 	Канамицин 15 мкг/мл Тетрациклин 12.5 мкг/мл Хлорамфеникол 34 мкг/мл (pLysS и pLacI)
Origami B/ Origami B DE3/ Origami B DE3 pLysS/	Novagen	<ul style="list-style-type: none"> – Производные штаммов семейства Origami – Мутация в генах gor и trxB (глутатион- и тиоредоксинредуктаз) – Делеция lacZY. Мутация в гене lac пермеазы lacY, способствующая равномерному 	Тетрациклин 12.5 мкг/мл Хлорамфеникол 34 мкг/мл (pLysS и pLacI)

Штамм/ Вектор	Фирма	Особенности	Условия
Origami B DE3 pLacI		проникновению ИПТГ при индукции экспрессии. Это обеспечивает дозо-зависимую индукцию и приводит к повышению растворимости и правильному рефолдингу мультимерных молекул. Не способен утилизировать лактозу – В штаммах с маркировкой pLysS и pLacI конститутивно синтезируется лизоцим и репрессор lacI.	
Rosetta-gami/ Rosetta-gami DE3/ Rosetta-gami DE3 pLysS/ Rosetta-gami DE3 pLacI	Novagen	– Производные штаммов семейства Origami и Rosetta – Мутация в генах gor и trxB (глутатион- и тиоредоксинредуктаз) – Плазмида pRARE содержит 6 генов tRNA для редко-встречающихся кодонов (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA и CCC) – В штаммах с маркировкой pLysS и pLacI конститутивно синтезируется лизоцим и репрессор lacI	Тетрациклин 12.5 мкг/мл Хлорамфеникол 34 мкг/мл (pLysS и pLacI)
Rosetta-gami 2/ Rosetta-gami 2 DE3/ Rosetta-gami 2 DE3 pLysS/ Rosetta-gami 2 DE3 pLacI	Novagen	– Производные штаммов семейства Origami и Rosetta 2 – Мутация в генах gor и trxB (глутатион- и тиоредоксинредуктаз) – Плазмида pRARE 2 содержит 7 генов tRNA для редко-встречающихся кодонов (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC и CGG) – В штаммах с маркировкой pLysS и pLacI конститутивно синтезируется лизоцим и репрессор lacI.	Тетрациклин 12.5 мкг/мл Хлорамфеникол 34 мкг/мл (pLysS и pLacI)
Rosetta-gami B/ Rosetta-gami B DE3/ Rosetta-gami B DE3 pLysS/ Rosetta-gami B DE3 pLacI	Novagen	– Производные штаммов семейства Origami B и Rosetta – Мутация в генах gor и trxB (глутатион- и тиоредоксинредуктаз) – Делеция lacZY. Мутация в гене lac пермеазы lacY, способствующая равномерному проникновению ИПТГ при индукции экспрессии. Это обеспечивает дозо-зависимую индукцию и приводит к повышению растворимости и правильному рефолдингу мультимерных молекул. Не способен утилизировать лактозу – Плазмида pRARE содержит 6 генов tRNA для редко-встречающихся кодонов (AGA, AGG, AUA, CUA, GGA и CCC) – В штаммах с маркировкой pLysS и pLacI конститутивно синтезируется лизоцим и репрессор lacI.	Канамицин 15 мкг/мл Тетрациклин 12.5 мкг/мл Хлорамфеникол 34 мкг/мл (pLysS и pLacI)
C3028 (Shuffle)	New England Biolabs	– Подходит для векторов с промотором для РНК-полимеразы E.coli	Хлорамфеникол 34 мкг / мл

Штамм/ Вектор	Фирма	Особенности	Условия
		<ul style="list-style-type: none"> – Делеция генов <i>gor</i> и <i>trxV</i> (глутатион- и тиоредоксинредуктаз) – Конститутивный синтез дисульфидизомеразы <i>DsbC</i> – Мутация эндонуклеазы I для поддержания высокой копийности плазмид – Деактивация протеаз <i>lon</i> и <i>ompT</i> – Конститутивный синтез <i>lacI^q</i> для ингибирования РНК-полимеразы бактериофага T7 и, соответственно, строгого контроля экспрессии целевого гена 	
C3026 (SHuffle® T7)	New England Biolabs	<ul style="list-style-type: none"> – Содержит хромосомную копию гена РНК-полимеразы фага T7, экспрессия индуцируется ИПТГ – Делеция генов <i>gor</i> и <i>trxV</i> (глутатион- и тиоредоксинредуктаз) – Конститутивный синтез дисульфидизомеразы <i>DsbC</i> – Конститутивный синтез <i>lacI^q</i> для ингибирования РНК-полимеразы бактериофага T7 и, соответственно, строгого контроля экспрессии целевого гена 	Хлорамфеникол 34 мкг / мл
C3029 (SHuffle T7 Express)	New England Biolabs	<ul style="list-style-type: none"> – Содержит хромосомную копию гена РНК-полимеразы фага T7, экспрессия индуцируется ИПТГ – Делеция генов <i>gor</i> и <i>trxV</i> (глутатион- и тиоредоксинредуктаз) – Конститутивный синтез дисульфидизомеразы <i>DsbC</i> – Деактивация протеаз <i>lon</i> и <i>ompT</i> – Мутация эндонуклеазы I для поддержания высокой копийности плазмид – Конститутивный синтез <i>lacI^q</i> для ингибирования РНК-полимеразы бактериофага T7 и, соответственно, строгого контроля экспрессии целевого гена 	Хлорамфеникол 34 мкг / мл
C3029 (SHuffle® T7 Express)	New England Biolabs	<ul style="list-style-type: none"> – Содержит хромосомную копию гена РНК-полимеразы фага T7, экспрессия индуцируется ИПТГ – Мутация в генах <i>gor</i> и <i>trxV</i> (глутатион- и тиоредоксинредуктаз) – Деактивация протеаз <i>lon</i> и <i>ompT</i> – Конститутивный синтез дисульфидизомеразы <i>DsbC</i> – Мутация эндонуклеазы I для поддержания высокой копийности плазмид – Конститутивный синтез <i>lacI^q</i> для ингибирования РНК-полимеразы бактериофага T7 и, соответственно, строгого контроля экспрессии целевого гена 	Хлорамфеникол 34 мкг / мл

Штамм/ Вектор	Фирма	Особенности	Условия
C3030H (SHuffle® T7 Express lysY)	New England Biolabs	<ul style="list-style-type: none"> – Содержит хромосомную копию гена РНК-полимеразы фага T7, экспрессия индуцируется ИПТГ – Мутация в генах gor и trxB (глутатион- и тиоредоксинредуктаз) – Конститутивный синтез дисульфидизомеразы DsbC – Деактивация протеаз lon и ompT – Конститутивный синтез лизоцима и lacI^q для ингибирования РНК-полимеразы бактериофага T7 и, соответственно, строгого контроля экспрессии целевого гена 	Хлорамфеникол 34 мкг / мл
Arctic Express/ Arctic Express (DE3)	Agilent Technologies	<ul style="list-style-type: none"> – Производные штаммов BL21 Gold и BL21 Gold (DE3), аналогов штаммов линейки BL21 с улучшенной трансформационной эффективностью; – Конститутивный синтез шаперонов Cpn10 и Cpn60 из психрофильной бактерии <i>Oleispira antarctica</i> при 4 – 12 °С 	Гентамицин 20 мкг/мл

Разработка высокоэффективной и легкомасштабируемой технологии получения в каждом конкретном случае требует большого практического опыта по использованию всего существующего ассортимента штаммов-носителей и векторов, что, в конечном случае, избавляет от работы по принципу «перебора» и позволяет осуществлять каждый итерационный шаг с максимальной эффективностью в зависимости от поставленной задачи.

4. Заключение

В целом, анализируя информацию, представленную в настоящем обзоре, можно сказать, что постоянная модернизация прокариотических систем экспрессии привела к явному расширению их возможностей для экспрессии сложных гетерологичных генов.

Целый ряд ключевых модификаций, связанных с изменениями в геноме модифицированных штаммов-носителей и совместимых с ними вспомогательных экспрессионных векторов, обеспечил высокий уровень экспрессии рекомбинантных генов.

Создание штамма-носителя Rosetta в значительной степени решило проблему экспрессии гетерологичных генов с редко встречающимися кодонами. Для получения растворимых форм белков с дисульфидными связями, получение которых невозможно в восстанавливающей среде цитоплазмы клеток *E.coli*, используются штаммы с целым рядом модификаций, направленных на повышение растворимости и правильное свертывание чужеродного для *E.coli* белка. Экспрессионная система *E.coli* до сих пор остается наиболее эффективной и комфортной при экспрессии генов, кодирующих полипептиды или небольшие белки, при которой не требуются посттрансляционные модификации (гликозилирования или ацетилирования) для проявления функциональной активности.

Разработка технологии получения сверхплотных культур при ферментации прокариот привела к кратному увеличению выхода биомассы и, в конечном итоге, к увеличению выхода целевого продукта, делая ее сопоставимым с выходом белков при культивировании эукариотических систем.

Таким образом, если не брать в расчет получение сложных гетеродоменных и гликозилированных белков, а ориентироваться на наработку биологически активных пептидов (от 4 до 6 Да), небольших белков (цитокинов, ростовых факторов), ферментов или даже клеток, осуществляющих определенный ферментативный каскад получения низкомолекулярных веществ, то биотехнологическое получение белковых продуктов в прокариотической системе будет еще долго оставаться практической актуальной задачей.

Важно отметить, что область использования рекомбинантных белков и ферментов в медицине так же постоянно расширяется, в первую очередь в качестве маркеров и ферментов для диагностических тест систем, ростовых факторов при культивировании клеток *in vivo* в современных персонализированных технологиях лечения рака. Во всех этих случаях возможно использование гибридных белков с различными носителями и метками, как для увеличения растворимости, так и для комфортного и эффективного выделения полипептидного препарата. Для оценки экономической эффективности технологии весьма существенно, что снижение цен

на некоторые аффинные сорбенты привело к их использованию не только в лабораторной практике, но в промышленных масштабах и эта тенденция будет продолжаться.

Подводя итог проведенного обзора научных публикаций можно сформулировать цель предстоящей работы как разработку методологии биотехнологических процессов получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных биологически активных полипептидов, предназначенных для приготовления готовых лекарственных форм или доклинических исследований.

В соответствии с этим определяются и основные задачи исследования:

- 1) разработать методологические подходы по применению интеиновых экспрессионных систем в создании биотехнологий получения рекомбинантных пептидов медицинского назначения,
- 2) создать высокопродуктивные штаммы-продуценты гибридных белков, содержащих целевой полипептид и белок-носитель,
- 3) разработать подходы получения растворимых гибридных белков, способных к протеолитическому расщеплению, включая оптимизацию условий рефолдинга,
- 4) разработать биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов медицинского назначения,
- 5) разработать методы постадийного технологического контроля получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантных полипептидов и готовых лекарственных форм,
- 6) масштабировать технологический процесс и наработать опытные партии для проведения доклинических испытаний,
- 7) разработать методы анализа конечного продукта, включая тестирование биологической активности, и проекты фармакопейных статей для полученных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов и готовых лекарственных форм,
- 8) разработать опытно-промышленные регламенты на биотехнологическое получение активных фармацевтических субстанций и готовых лекарственных форм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Реактивы

В работе использовали хлорид натрия, хлорид кальция, гидроксид натрия, трисгидрохлорид аминотетан, соляную кислоту, уксусную кислоту, этанол, ацетонитрил, глицерин, мочевины, ацетат натрия, ацетат аммония, сульфат аммония, хлорид магния, цитрат натрия, карбонат натрия, 25 % водный раствор аммиака, сульфат меди, хлорид цинка, глюкозу, фосфат натрия однозамещенный и двухзамещенный, лимонную кислоту, N,N-диметилформамид бромфеноловый синий, оранжевый G, легкоплавкую агарозу, бромистый этидий, Тритон X-100, додецилсульфат натрия, EDTA, PMSF, ампициллин, трифторуксусную кислоту, дитиотреитол, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, ТЕМЕД, персульфат аммония, NaCNBH₃ (Panreac); АТФ, dNTP, бычий сывороточный альбумин, MESNA, восстановленный GSH и окисленный GSSG глутатионы, уксусный ангидрид (Sigma Aldrich); дезоксихолат натрия, 2-меркаптоэтанол (Merck); Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad), агар, дрожжевой экстракт, бакто-триптон, бакто-агар (Difco), набор реактивов "Kalibration kit": Low molecule weight (Sigma Aldrich), ПСК 14 кДа (Lipoxen Facilities), набор для выделения плазмид NucleoSpin-Plasmid (Machery-Nagel, Германия), набор для выделения ДНК из геля NucleoSpin-Extract II (Machery-Nagel, Германия), набор для выделения плазмид Plasmid miniprep (Евроген).

2. Ферменты

Использовали эндонуклеазы рестрикции BamHI, BglII, EcoRV, EcoRI, HindIII, LguI, SapI, NcoI, NdeI, KpnI, XbaI, NruI и 10x буферные растворы Tango, O (Orange) и R (Red) для рестрикции (Fermentas). Были использованы ферменты: T4 ДНК лигаза, полинуклеотидкиназа фага T4, термостабильная ДНК-полимераза из *Thermus aquaticus* и соответствующие 10x буферные растворы (Fermentas), полимеразы Encyclo и соответствующий 10x буфер (Евроген), лизоцим (Serva), эндопротеиназа Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8 (Sigma), трипсин, карбоксипептидаза В (Promega).

3. Бактериальные штаммы и плазмидные векторы

В работе использовали штаммы *E. coli*:

XLI-Blue [recA1, lac⁻, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1 /F' proA⁺B⁺, lacI^q, lacZΔM15, Tn10];

BL21(DE3) [F⁻ dcm ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)];

ER2566 [F' *fhuA2 (lon) ompT lacZ::T7 genel gal sulA11 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 R (mcr-73::mini Tn10)2 R(zgb-210::Tn 10)1 (Tet^S) endA1 (dcm)*];

Origami (DE3) [*Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac lacI pro] (DE3) gor522::Tn10 trxB (Str , Tet)*] (Novagen);

C3030 [MiniF *lysY (CamR) / fhuA2 lacZ::T7 genel [lon] ompT ahpC gal λatt::pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, lacIq) ΔtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--TetS)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --TetS) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10*] (New England Biolabs)

JM109 (DE3) [*endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB⁺ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15] hsdR17(r_K⁻m_K⁺) λ(DE3)*] (New England Biolabs)

Плазмидные векторы: pTWIN1 и pTYB11 (New England BioLabs), pGEM5zf(-), pET23a,b,d+, pET32b+ (Novagen).

4. Материалы

Использовали силиконизированную стекловату (Serva); нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 0.45 мкм (Millipore Merck); Ватман 3ММ (Whatman); фильтры с диаметром пор 0.45 и 0.22 мкм для стерилизации растворов (Millipore Merck), ячейки для ультрафильтрации Amicon 8200 (AMICON).

5. Лабораторное оборудование

В работе использовали: хроматографические системы АКТА Start (GE Healthcare) и BioLogic LP System (BioRad), хроматографические системы для аналитической ОФ ВЭЖХ LaChrom ELITE Merck Chitachi и Agilent 1200 LC с ESI-TOF масс-детектором Agilent 6224; центрифуги: Force 1618 (Labnet), 5430R (Eppendorf), Z 383K (Hermile), Denville 260D (Denville Scientific), Sepatech Cryofuge 20-3 (Heraeus) и Avanti J-30I (Beckman Coulter, ротор JLA-9.1000 9000 rpm); ультрафильтрационную ячейку Amicon объемом 200 мл; кельвинатор U535 Innova (New Brunswick Scientific, США); установка для ультрафильтрации Vivaflow 200 (Millipore); перистальтический насос MasterFlex L/S (Cole Parmer); УФ-трансиллюминатор (BioRad); амплификатор PTC-0200 DNA Engine Cycler (Bio-Rad, США); лиофильную сушку Speed Vac (Savant) и HETOSICC; термостатируемые камеры с шейкерами Certomat (ETH) и Certomat BS-1 (Sartorius); термостат «Гном» (ДНК-технология) источники постоянного тока: 2301 Macrodrive-1 (LKB), Electrophoresis Power Supply EPS500/400 (Pharmacia) и PowerPac HC (Bio-Rad); ультразвуковые дезинтеграторы Vibra cell VCX 130 (Sonic) и Labsonic P (Sartorius), pH-метр PB-11 (Sartorius); спектрофотометр SmartSpec Plus (Bio-Rad); ламинарный шкаф Gelaire (Flow Lab.); автоматические микропипетки (Gilson, Eppendorf); магнитные мешалки Variomag power

direct (Komet), 2mag Mix 1 XL (Magnetic emotion); электрофоретическую камеру Mini-PROTEAN Tetra Cell; весы аналитические (Mettler PM460).

6. Методы исследования

В разделе подробно изложены новые методы (предложенные или модифицированные нами). Остальные методы изложены сжато и сопровождаются соответствующими ссылками.

6.1. Стандартные методики

Стандартные генно-инженерные манипуляции: рестрикция ДНК рестриктазами, лигирование фрагментов ДНК, трансформация штаммов *E.coli*, выделение плазмидной ДНК, электрофорез фрагментов ДНК в агарозном и полиакриламидном геле – проводили согласно руководствам по молекулярному клонированию [282, 283].

Электрофорез клеточных лизатов, гибридных белков и продуктов протеолиза (автолиза) проводили в денатурирующих условиях по Laemmli [284]. Концентрацию белка измеряли по методу Лоури [285] и методу Бредфорда [286].

Содержание остаточных иммунореактивных белков штамма-продуцента определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя набор реагентов «Immunoenzymetric Assay for the Measurement of *E.coli* Host Cell Proteins» (Cygnus Technologies, Inc), в соответствии с рекомендациями производителя.

Анализ на содержание эндотоксинов был выполнен с помощью хромогенного LAL-теста (Лизат амебоцитов *Limulus*) с использованием набора реактивов QCL-1000 120 Test Kit (Lonza).

6.2. Аналитическая ОФ ВЭЖХ

ОФ ВЭЖХ анализ проводили на колонке (4,3x250) Prosphere C-18 300Å 5µ (Alltech) с использованием хроматографической системы LaChrom ELITE Merck Chitachi. Для элюции пептидных продуктов использовали линейный градиент от 8 до 64% ацетонитрила с 0,1% ТФУ со скоростью 0,75 мл/мин.

Хромато-масс-спектрометрический анализ производили с помощью системы Agilent 6224 ESI-TOF LC/MS. Для калибровки использовали ESI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent Technologies), молекулярные массы определяли в режиме детектирования положительно заряженных ионов.

6.3. Определение остаточной ДНК штамма-продуцента.

Определения остаточной плазмидной ДНК *E. coli* проводили на основе метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени [287]. В качестве маркерного гена использовали ген устойчивости к ампициллину *bla*.

6.4. Буферные растворы и культуральные среды

Среда LB: 10 г/л триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 10 г/л NaCl, pH 7.3

Среда SOB: 20 г/л триптон, 5 г/л дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 7.3

Буфер 1: 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0,2 % PMSF, pH 8,0

Буфер 2: 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0,1 % Тритон X-100, 0,2 % PMSF, pH 8,0

Буфер 3: 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 2 М мочевины, 0,2 % PMSF, pH 8,0

Буфер 4: 20 mM Трис-НСl, 8,0 М мочевины, pH 8,0

Буфер 5: 20 mM Трис-НСl, 6,0 М мочевины, pH 8,0

Буфер 6: 20 mM Трис-НСl, 6,0 М мочевины, pH 8,0, 500 mM имидазол

Буфер 7: 30 % глицерин, 50 mM Трис-НСl, 1,0 М мочевины, 0,5 mM EDTA, 5 mM ДТТ, pH 8,0

Буфер 8: 30 % глицерин, 50 mM Трис-НСl, 0,5 mM EDTA, 5 mM ДТТ, pH 8,0

Буфер 9: 50 % глицерин, 50 mM Трис-НСl, 0,5 mM EDTA, 5 mM ДТТ, pH 8,0

Буфер 10: 50 mM Трис-НСl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM ДТТ

Буфер 11: 50 mM Трис-НСl, 1 mM PMSF, pH 8,0

Буфер 12: 20 mM Трис-НСl, 20 mM имидазол, pH 8,0

Буфер 13: 20 mM Трис-НСl, 500 mM имидазол, pH 8,0

Буфер 14: 50 mM Трис-НСl, 10 mM EDTA, 0,1 % PMSF, pH 7.6

Буфер 15: 50 mM Трис-НСl, 5 mM EDTA, pH 8,0

Буфер 16: 50 mM Трис-НСl, 5 mM EDTA, 500 mM NaCl, pH 8,0

Буфер 17: 20 mM Трис-НСl, pH 7,0

Буфер 18: 50 mM Трис-НСl, pH 9.0, 5 mM EDTA

Буфер 19: 50 mM Трис-НСl, pH 11.0, 5 mM EDTA

Буфер 20: 50 mM Трис-НСl, pH 10.0, 5 mM EDTA

Буфер 21: 10 mM CH₃COOH

Буфер 22: 50 mM Трис-НСl, 200 mM NaCl, pH 7.0

Буфер 23: 50 mM Трис-НСl, pH 8.0, 1 mM PMSF

Буфер 24: 50 mM Трис-НСl, pH 9.0, 1 mM PMSF

Буфер 25: 50 mM Трис-НСl, pH 9.0, 1 mM PMSF, 1 М NaCl

Буфер 26: 50 mM Трис-НСl, pH 8,3, 3 mM ДТТ; pH 8,3

Буфер 27: 50 мМ Трис-НСl, 1 мМ EDTA, 1 мМ PMSF, pH 8,0
Буфер 28: 50 мМ Трис-НСl, 1 мМ EDTA, pH 8,0; 0,4 М NaCl; pH 8,0
Буфер 29: 30 мМ CH₃COOH, pH 3.0
Буфер 30: 30 мМ CH₃COOH, pH 3.0, 1 М NaCl
Буфер 31: 30 мМ CH₃COOH/CH₃COONa; pH 5,2
Буфер 32: 50 мМ Трис-НСl, pH 9,0
Буфер 33: 50 мМ Трис-НСl, pH 8,5, 2 М мочеви́на, 10% глицерин, 0,5 мМ EDTA, 1 мМ PMSF
Буфер 34: 50 мМ Трис-НСl, pH 7,5, 5% глицерин, 0,5 мМ EDTA
Буфер 35: 50 мМ ацетат натрия, pH 4,0
Буфер 36: 50 мМ ацетат аммония, pH 6,2
Буфер 37: 50 мМ Трис-НСl pH 8.5, 10 мМ EDTA, 1 мМ PMSF
Буфер 38: 50 мМ Трис-НСl pH 9.0, 5 мМ EDTA
Буфер 39: 50 мМ Трис-НСl pH 9.0, 5 мМ EDTA, 1 М NaCl
Буфер 40: 50 мМ Трис-НСl pH 10, 5 мМ EDTA, 8 М мочеви́на, 10 мМ β-меркаптоэтанол
Буфер 41: 50 мМ Трис-НСl pH 8.0, 5 мМ EDTA, 100 мМ NaCl
Буфер 42 20 мМ ацетат натрия, pH 4.8
Буфер 43: 20 мМ ацетат натрия, pH 4.8, 50 мМ NaCl
Буфер 44: 20 мМ ацетат натрия, pH 3.6, 50 мМ NaCl
Буфер 45: 500 мМ Трис-НСl, pH 8,0, 100 мМ MgCl₂, 30 мМ DTT;
Буфер 46: 20 мМ Na-фосфатный буфер pH 6,8
Буфер 47: 200 мМ Na-фосфатный буфер pH 6,0
Буфер 48: 100 мМ CH₃COOH, pH 3.0
Буфер 49: 50 мМ MES, pH 5.5
Буфер 50: 50 мМ MES, 1.5 М NaCl, pH 5.5
Буфер 51: 30 мМ CH₃COOH
Буфер 52: 50 мМ Трис-НСl, 10 мМ EDTA, 1 мМ PMSF, pH 7.5
Буфер 53: 50 мМ Трис-НСl pH 10, 10 мМ EDTA, 8 М мочеви́на, 1 мМ PMSF, 0.5 мМ ДТТ
Буфер 54: 50 мМ Трис-НСl, pH 9.0, 10 мМ EDTA, 1 мМ PMSF, 20% глицерин, 20 мкг/мл гидрат бензамидингидрохлорида
Буфер 55: 50 мМ MES, 50 мМ NaCl, pH 5.5
Буфер 56: 50 мМ MES, 1.0 М NaCl, pH 5.5
Буфер 57: 50 мМ KH₂PO₄, 5 мМ EDTA, 1 мМ PMSF, pH 7.6
Буфер 58: 50 мМ KH₂PO₄, 5 мМ EDTA, pH 8.5; 50 мМ KH₂PO₄, 2.5 мкг/мл ДНКазaI, 5 мМ EDTA
Буфер 59: pH 8.5; 50 мМ KH₂PO₄, 5 мМ EDTA, 1 М мочеви́на, pH 8.5;
Буфер 60: 50 мМ KH₂PO₄, 5 мМ EDTA, pH 8.5

Буфер 61: 50 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ EDTA, 8М мочеви́на, pH 8.5, 5 мМ β -меркаптоэтанол

Буфер 62: 25 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ EDTA, pH 8.5, 20 % глицерин

Буфер 63: 50 мМ ацетат натрия, pH 4.3

Буфер 64: 50 мМ ацетат натрия, pH 4.3, 1 М NaCl

Буфер 65: 50 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ EDTA, pH 7.5

Буфер 66: 50 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ EDTA, pH 7.5, 1 М NaCl

Буфер 67: 50 мМ Трис-HCl, 5 мМ EDTA, 8,0 М мочеви́на, pH 9,0, 10 % глицерин

Буфер 68: 20 мМ Na-фосфатный буфер 200 мМ NaCl, pH 7,0

Буфер 69: 50 мМ Трис-HCl pH 7.0, 5 мМ EDTA

Буфер 70: 50 мМ Трис-HCl pH 7.0, 5 мМ EDTA, 1 М NaCl

Буфер 71: 50 мМ Трис-HCl, 10 мМ EDTA, 100 мМ NaCl, pH 9.0, 1мМ PMSF

Буфер 72: 50 мМ Трис-HCl, 10 мМ EDTA, 100 мМ NaCl, 1мМ PMSF 8М мочеви́на, 10 мМ ДТТ, pH 9.0

Буфер 73: 50 мМ Трис-HCl, 10 мМ EDTA, 100 мМ NaCl, 1мМ PMSF, 0.3М мочеви́на, , 10 мМ ДТТ, pH 9.0

Буфер 74: 50 мМ Трис-HCl, 10 мМ EDTA, 100 мМ NaCl, pH 8.5, 1мМ PMSF

Буфер 75: 50 мМ Трис-HCl, 10 мМ EDTA, 100 мМ NaCl, pH 7.0, 1мМ PMSF, 10 мМ MESNA

Буфер 76: 50 мМ Трис-HCl, pH 9.0, 8М мочеви́на, Na_2SO_3 50 мг/мл, 25 мг/мл $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_6$

Буфер 77: 50 мМ Трис-HCl, pH 9.0, 0.3М мочеви́на

Буфер 78: 50 мМ Трис-HCl, pH 8.5

Буфер 79: 20 мМ Трис-HCl, pH 6.0

Буфер 80: 50 мМ Трис-глицин, pH 10.0, 2мМ цистеин

Буфер 81: 20 мМ Na-фосфатный буфер 200 мМ NaCl, pH 6.5

Буфер 82: 50 мМ Трис-HCl, 200 мМ NaCl, pH 8.0, 1 мМ PMSF

Буфер 83: 50 мМ Трис-HCl, 200 мМ NaCl, pH 8.0, 1 мМ PMSF, 0.1 % тритон X-100

Буфер 84: 50 мМ Трис-HCl, 200 мМ NaCl, pH 8.0, 1 мМ PMSF, 6 М мочеви́на, 10 мМ ДТТ

Буфер 85: 50 мМ Трис-HCl, 200 мМ NaCl, pH 8.0, 1 мМ PMSF, 10 мМ ДТТ

Буфер 86: 50 мМ Трис-HCl, 200 мМ NaCl, pH 10.0

Буфер 87: 50 мМ Трис-HCl, 200 мМ NaCl, 2 мМ MESNA, pH 6.5.

Буфер 88: 50 мМ Трис-HCl, 200 мМ NaCl, 0,25 мМ MESNA, pH 6.5.

Буфер 89: 50 мМ Трис-HCl, 10 мМ EDTA, 1 мМ PMSF, pH 7.5

Буфер 90: 50 мМ Трис/HCl, 100 мМ NaCl, pH 8,0

Буфер 91: 50 мМ Трис/HCl, 100 мМ NaCl, 2 М мочеви́на, pH 8,0

Буфер 92: 50 мМ Трис/HCl, 100 мМ NaCl, 100 мМ ДТТ, pH 8,0

Буфер 93: 50 мМ ацетат натрия

Буфер 94: 100 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 7.5

Буфер 95: 100 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 6.0

Буфер 96: 100 мМ натрий-ацетатный буфер, рН 4.5

6.5. Получение TEV-протеазы

Ген, кодирующий рекомбинантную TEV-протеиназу, был получен из ИБФМ РАН и клонирован в плазмидный вектор pET23b+ по сайтам узнавания рестриктаз EcoRI и HindIII. Полученной плазмидой pER-TEV был трансформирован штамм *E.coli* ER2566. Выращивание штамма-продуцента осуществляли на питательной среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Индукцию белкового биосинтеза проводили внесением раствора ИПТГ до конечной плотности 0.4 мМ при достижении OD₆₀₀ 0.8 – 0.9.

Разрушение 15 г клеточной биомассы проводили в буфере 1 при соотношении 1 : 10 (w/v) с помощью ультразвукового дезинтегратора Labsonic® P (Sartorius) (лед, 15 мин, цикл – 0.5 с, амплитуда – 60 %). Далее тела включения осаждали центрифугированием при 15000 g в течение 30 мин при температуре 4°C. Проводили 3-х кратную отмывку тел включения в буфере 2 в соотношении 1 : 10 (w/v): тела включения ресуспендировали и полученную суспензию перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре, далее нерастворимый дебрис осаждали центрифугированием при 15000 g в течение 30 мин при температуре 4°C. Аналогичным образом проводили отмывку в буфере 3. Далее отмытые тела включения солубилизировали в буфере 4 в соотношении 1 : 10 (w/v) в течение 12 ч при комнатной температуре до полного растворения. Полученный экстракт тел включения, содержащий TEV-протеазу, центрифугировали при 8000 g в течение 30 мин для осаждения нерастворимого дебриса.

Очистку TEV-протеазы осуществляли с помощью аффинной металл-хелатной хроматографии на сорбенте Ni²⁺-IDA Sepharose (Sigma). Для этого 75 мл экстракта тел включения с концентрацией белка 3.6 мг/мл наносили со скоростью 1 мл/мин на колонку ХК 26/20, содержащую 40 мл сорбента. Не связавшиеся с сорбентом белки отмывали буферным раствором 5. Элюцию целевого белка проводили буфером 6 со скоростью 2 мл/мин. 120 мл объединенного элюата с концентрацией белка 1.5 мг/мл диализовали при 4°C последовательно против 3 л буферов 7 и 8, выдерживая в каждом буфере по 10 ч. При диализе часть белка (до 15%) выпадала в осадок, который отделяли центрифугированием. После окончания диализа раствор фермента (102 мл с концентрацией белка 1.2 мг/мл) аликвотили и хранили при -70°C.

6.6. Выделение и очистка фрагмента тумстатина

Создание штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pTEV-TMS

Синтез искусственного гена [L69K–95]-фрагмента тумстатина осуществляли химико-ферментативным способом из перекрывающихся олигонуклеотидов Tum-1 – Tum-6:

Tum-1	5'-AAACAGCGTTTCACCACTATGCCG-3'
Tum-2	5'-TTTCTGTTCTGCAACGTTAACGATG-3'
Tum-3	5'-TTTGCAACTTTGCGTCTCGTAACGATTAC-3'
Tum-4	5'-GCAGAACAGAAACGGCATAGTGGT-3'
Tum-5	5'-CAAAGTTGCAAACATCGTTAACGTT-3'
Tum-6	5'-CGGACCCGGAGAGTAATCGTTACGAGACG-3'

Было проведено кинирование олигонуклеотидов Tum-2 – Tum-5 с помощью полинуклеотидкиназы фага T4. Фосфорилированные и нефосфорилированные олигонуклеотиды были объединены в эквимольном соотношении и денатурированы при 90°C, после чего для их корректного отжига смесь медленно охладили до температуры 37 °С. Затем в реакционную смесь добавляли 1 wiess ед. T4 ДНК-лигазы, соответствующий 10x буфер 10 для лигирования, АТФ до 1 мкМ и инкубировали в течение 16 часов при +4 °С.

Ген [L69K–95]-тумстатина был амплифицирован с помощью ПЦР с синтетическими праймерами Tum-Pr (5'-CGCCCATGGGCAAACAGCGTTTCAC-3') и Tum-Ter (5'-CCCAAGCTTTTACGGACCCGGAGAG-3'), используя в качестве матрицы полученную лигазную смесь. 50 мкл реакционной смеси содержали 0.5 мкл лигазной смеси, по 80 пмоль каждого праймера (ITIN 1 и IREV-1), 5мкл 10x буфера для Encyclo-ДНК-полимеразы, 1x смесь dNTP (каждый в концентрации 0,4 мМ), 1 ед. Encyclo-ДНК-полимеразы. Полученный ПЦР фрагмент был клонирован в плазмидный вектор pGEM-5Zf(-), предварительно обработанный рестриктазой EcoRV (Eco32I) (в 20 мкл рестриктной смеси содержалось 1 мкг плазмидного вектора, 1x буферного раствора O+ буфера и 10 ед. рестриктазы). Полученной реакционной смесью трансформировали клетки штамма *E. coli* XL1-Blue. Отбор рекомбинантов проводился по сине-белой реакции. Из неокрашенных клонов были выделены плазмиды, и с помощью ПЦР с праймерами Tum-Pr и Tum-Ter проверены на наличие гена [L69K-95]-тумстатина. Правильность полученной синтетической последовательности подтверждали секвенированием по Сэнгеру [271].

Олигонуклеотиды: TVG-1 (5'-GATCAGGGCGGGCGGCGAGAATCTTTATTTTCAGTCTG GCGC-3') и TVG-2 (5'-CATGGCGCCAGACTGAAAATAAAGATTCTCGCCGCCGCCCT-3'), кодирующие сайт узнавания протеиназы TEV были смешаны в эквимольном количестве (по 600 пмоль), денатурированы при 90 °С и подвергнуты отжигу при медленном понижении температуры до 30 °С. Полученный дуплекс был лигирован с вектором pET32b(+),

предварительно обработанным рестриктазами BglIII и NcoI. Далее полученный гибридный ген TrxTEVrs был переклонирован в плазмидный вектор pTWIN1 по сайтам узнавания рестриктаз XbaI и Bpu1102I. Правильность последовательности полученного вектора pTEV подтверждали секвенированием.

При обработке вектора pGEM-TMS эндонуклеазами рестрикции NcoI и HindIII был получен фрагмент, содержащий ген [L69K – 95] тумстатина и клонирован в вектор pTEV по тем же сайтам рестрикции.

Полученной плазмидой pTEV-TMS были трансформированы компетентные клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) и получен штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pTEV-TMS. Культивирование штамма проводили в среде LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина. Для получения инокулята культуру выращивали в течение 16 часов при 37°C на термостатированном шейкере при перемешивании 175 об/мин до OD₆₀₀=3.5. Ночную культуру использовали для засева (2.5 % v/v) качалочных колб со средой LB с 100 мкг/мл ампициллином. Культуру выращивали при 37°C до OD₆₀₀ =1.2, после чего вносили ИПТГ до конечной концентрации 0,4 мМ и выращивали 3 часа при 37 °С. Клеточную биомассу отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 4000 g и 4 °С.

Разработка лабораторной технологии выделения и очистки тумстатина

3 г биомассы штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pTEV-TMS ресуспендировали в 12 мл буфера 11 и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора. Осветлённый клеточный лизат наносили на колонку ХК 16/20 с 20 мл сорбента Ni²⁺-IDA Sepharose со скоростью 1 мл/мин. Примесные клеточные белки элюировали буферным раствором 12. Элюцию целевого белка проводили ступенчатым градиентом имидазола 20 и 500 мМ, создаваемым растворами 12 и 13. Объединяли фракции, содержащие целевой гибридный белок.

К раствору очищенного белка TrxTEVrs-TMS добавляли дитиотреитол до концентрации 1мМ и TEV протеазу в соотношении белок : фермент 1 : 100 и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 часов. Далее в реакционную смесь для ренатурации тумстатина вносили окислительно-восстановительную пару GSH (1мМ) и GSSG (0,1 мМ) и проводили диализ против 10 кратного объема буфера 17 при перемешивании при 10 °С. Очистку тумстатина от тиоредоксина и TEV протеазы производили с помощью хроматографии на колонке ХК 16/20 с 20 мл анионообменного сорбента Q Sepharose XL, уравновешенного буфером 17. Собирали фракцию проскока, содержащую целевой полипептид. Доочистку целевого пептида проводили с помощью ОФ ВЭЖХ на колонке Диасорб-130-С16Т 7 мкм, 16x250 мм в градиенте 10 – 60 % ацетонитрила с 0.1% ТФУ при скорости потока 3.5 мл/мин. Фракции, содержащие [L69K–95]-

фрагмент тумстатина с хроматографической чистотой более 98 %, объединяли и лиофильно высушивали.

Масштабирование стадии культивирования штамма-продуцента E. coli BL21(DE3)/pTEV-TMS

Осуществили перенос культивирования штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pTEV-TMS с качалочных колб до промышленного ферментера Electrolux FL60 (Швеция) с объёмом загрузки 50 литров. Среду LB, содержащую 4 г/л глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина, засеивали 1% инокулята. Культивирование проводили при 37°C и pH 7.0 (с автоматической корректировкой pH раствором аммиака) при аэрации воздухом со скоростью 20–40 л/мин. При $OD_{600} = 5.0 \pm 0.2$ через 3 ч после засева стерильно вносили раствор ИПТГ до конечной концентрации 0.4 mM и продолжали культивирование в течение 3 ч при 37 °C (на момент остановки $OD_{600} = 8.0 \pm 0.5$). Клеточную биомассу собирали центрифугированием на проточной центрифуге CERA 61 G (Германия) при скорости вращения ротора 14–16 тыс. об/мин и скорости подачи суспензии 3–4 л/мин. Съём клеточной биомассы составил 13.4 ± 0.5 г с литра клеточной культуры.

Масштабирование технологии выделения и очистки тумстатина

200 г полученной влажной биомассы гомогенизировали в буфере 14 при соотношении 1:10 (w/v) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Labsonic® P (Sartorius) (цикл – 0,5 с, амплитуда – 60 %) с проточной ячейкой с охлаждением. После дезинтеграции клеточный лизат центрифугировали 40 мин при 4°C и 7000 об/мин для отделения осадка. Осветлённый лизат наносили на колонку ХК 50/60 (GE Healthcare), содержащую 800 мл сорбента Q Sepharose XL (GE Healthcare) и уравновешенную раствором 15. Колонку промывали 5 CV буфера 15 от несорбировавшегося белка. Целевой белок элюировали со скоростью 50 мл/мин в градиенте от 70 до 300 mM NaCl, создаваемом буферами 15 и 16.

К объединённому элюату, содержащему очищенный гибридный белок, добавляли ДТТ до конечной концентрации 1 mM и раствор TEV протеазы в соотношении фермент : белок 1:50 и инкубировали в течение 20 ч при 23 °C.

После завершения стадии расщепления белковый раствор титровали до pH 3.0 и центрифугировали при 7500 об/мин для осаждения балластных белков. Полученный белковый раствор разбавляли в 4 раза дистиллированной водой, титровали раствором 1 M NaOH до pH 9.0 и наносили со скоростью 50 мл/мин на колонку ХК 50/60, содержащую 800 мл сорбента Q Sepharose XL, предварительно уравновешенную буфером 18. Колонку с сорбентом промывали после загрузки белка 1 CV буфера 18. Фракцию проскока, содержащую целевой тумастин, собирали и титровали до pH 11.0 и загружали со скоростью 100 мл/мин на колонку ХК 50/40,

содержащую 300 мл сорбента Q Sepharose XL. Колонну предварительно уравнивали буфером 19. Элюцию целевого пептида проводили буфером 20. Объединенный элюат инкубировали в течение 16 ч при 10 °С при перемешивании для ренатурации пептида. Последующую очистку тумастина осуществляли с помощью ОФ-ВЭЖХ проводили на колонне Kromasil 300-10-C18 (Knauer, Германия) в градиенте концентрации ацетонитрила от 10 до 80% ацетонитрила с 0.1% ТФУ со скоростью 30 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт с хроматографической чистотой более 98 %, объединяли. Для удаления ацетонитрила ввели стадию гель-фильтрационной хроматографии на колонке ВРГ 200/500 с 7 л сорбента Biogel P2, уравниваемую раствором 21. Полученный белковый раствор лиофильно высушивали.

6.7. Разработка технологии получения тимозина $\alpha 1$

6.7.1. Интеин-опосредованное получение тимозина $\alpha 1$

Синтез гена тимозина $\alpha 1$

Искусственный ген тимозина $\alpha 1$ синтезировали химико-ферментативным способом из перекрывающихся олигонуклеотидов ТУ-1 – ТУ-9 по методике, описанной для фрагмента [L69K–95] тумстатина в п.6.6 раздела Материалы и методы:

ТУ-1 5'-CGGGATCCGCTCTTCTAACTCCGATGCTGC-3'
ТУ-2 5'-GGTGGACACATCCTCTGAAATTACAACG-3'
ТУ-3 5'-AAAGATCTGAAAGAAAAGAAAGAAGTTGTG-3'
ТУ-4 5'-GAAGAGGCTGAGAACTAAGAATCCGG-3'
ТУ-5 5'-CAATCTTCTCGCCTAGGGC-3'
ТУ-6 5'-TCTCCTACACAGGTGGCGTCGTAGCCT-3'
ТУ-7 5'-GAAAGTCTAGAAAGCAACATTAAG-3'
ТУ-8 5'-GAGAAGGTGTTGAAGAAAGAAA-3'
ТУ-9 5'-CGACTCTTGATTCTTAAGGCC-3'

Аmplифицированный ген был клонирован в плазмиду pGEM5zf(-) и проведено секвенирование нуклеотидной последовательности созданной конструкции.

*Создание экспрессионных конструкций на основе интеина *SceVMA* и соответствующих штаммов-продуцентов*

После обработки вектора pGEM5zf(-)-Thym рестриктазами SapI и EcoRI был выделен фрагмент, содержащий ген тимозина $\alpha 1$, и переклонирован в вектор pTYB11 (New England Biolabs) по этим же сайтам.

С помощью ПЦР с олигонуклеотидами ThymAla и ThymTer была введена мутация Cys1Ala в ген, кодирующий *SceVMA*:

EcoRI

Ala

ThymAla 5'-GGTGGTGAATTCTCCCTGGAGGGTGCCTTTGCCAAGGGT-3'

NcoI

ThymTer 5'-CCGCTCGAGTTAGTTCTCAGCCTCTCCAC-3'

Модифицированный ген *SceVMA* был клонирован в вектор pET23d+ по сайтам узнавания рестриктаз *NcoI* и *EcoRI*.

Полученными плазмидами pER-Thym1 и pERTHym2 были трансформированы клетки штамма *E. coli* ER2566. Исследовали накопление гибридных белков *SceVMA-Ta1* при культивировании штамма-продуцента *E. coli* ER2566/pERTHym1 в присутствии 1 до 10 мМ $ZnCl_2$ при индукции белкового биосинтеза при 14 °C (14 – 16 ч) и 37 °C (6 ч). Для культивирования использовали питательную среду LB с 100 мкг/мл ампициллина, а индукцию проводили при $OD_{600}=0.6 – 0.7$.

Созданным вектором pERTHym2 были трансформированы клетки штамма *E. coli* ER2566 и исследовано накопление гибридного белка. Культивирование штамма-продуцента проводили по методике, описанной для конструкции без мутации.

Выделение и расщепление гибридных белков на основе интеина SceVMA

Разрушение клеточной биомассы обоих штаммов *E. coli* ER2566/pERTHym1 и *E. coli* ER2566/pERTHym2 проводили в буфере 14, содержащем 1 – 2 мМ $ZnCl_2$, в соотношении 1 : 10 (w/v). Непосредственно после разрушения клеточной биомассы и осаждения дебриса проводили выделение гибридного белка с помощью аффинной хроматографии на хитиновом сорбенте. Колонку с 5 мл хитиновым сорбентом предварительно уравнивали буфером 14, содержащим 1 – 2 мМ $ZnCl_2$. После нанесения супернатанта колонку промывали тем же буфером, уравнивали буфером 22, содержащим 0 – 50 мМ ДТТ или MESNA, и инкубировали в течение 48 ч при 25 °C. Продукты расщепления элюировали буфером 22 и анализировали с помощью ОФ ВЭЖХ и MALDI-масс-спектрометрии. Очистку дезацетилтимозина $\alpha 1$ проводили с помощью ОФ ВЭЖХ на колонке PerfectSil 300 C18 8x250 10 мкн (MZ Preparative, США) в градиенте от 10 до 80% ацетонитрила с 0,1% ТФУ. Полученный раствор лиофильно высушивали.

Создание экспрессионной конструкции на основе мини-интеина SspDnaB и соответствующих штаммов-продуцентов

Ген тимозина $\alpha 1$ был переклонирован в вектор pTWIN1 (New England Biolabs) по сайтам узнавания рестриктаз *SapI* и *VamHI*. Полученным вектором были трансформированы клетки штамма *E. coli* ER2566. Культивирование созданного штамма *E. coli* ER2566/pERTHym3 проводили в течение 14 ч при 16 °C.

Для предотвращения расщепления *in vivo* был проведен мутагенез в интеине *SspDnaB*: заменен предпоследний остаток гистидина на глутамин. Ген интеина амплифицировали с праймерами PrimDnaB и DnaBGln и клонировали в вектор pET23d+:

XbaI

PrimDnaB GGTGGTTCTAGAААТААТТТТГТТТААС

BamHI

DnaBGln CGCGGATCCAGATCGGAATTCTGTACAATGATGTCATTC

В полученный вектор pERIDQ1 был в дальнейшем клонирован ген тимозина $\alpha 1$.

Оптимизировали условия культивирования штамма *E.coli* ER2566/pERTHym4, оценивая электрофоретически содержание и степень расщепления гибридного белка. При подобранных условиях (6 ч при 37 °C) было проведено культивирование в 3 л и наработана биомасса для дальнейшего выделения дезацетилтимозина $\alpha 1$.

Выделение и расщепление гибридных белков на основе интеина SspDnaB

Выделение дезацетилтимозина $\alpha 1$ проводили из 3 г клеточной биомассы штамма *E.coli* ER2566/pERTHym4. Разрушение проводили на ультразвуковом дезинтеграторе в растворе 23. Клеточный супернатант, содержащий гибридный белок DnaBGln-Ta1, отделяли от нерастворимого дебриса центрифугированием в течение 30 мин при 10000 g. Выделение гибридного белка из супернатанта проводили с помощью анионообменной хроматографии на колонке XK 16/20 (GE Healthcare) с 25 мл сорбента Q Sepharose XL (GE Healthcare). Перед загрузкой супернатант разбавляли в 2 раза высокоочищенной водой milliQ и титровали до pH 9.0. Колонна перед загрузкой белкового раствора была уравновешена буфером 24. После нанесения колонку промывали 3 CV буфера 24 и проводили хроматографию в градиенте концентрации от 0 до 1 mM NaCl за 120 мин со скоростью 2 мл/мин, создаваемом растворами 24 и 25. Объединяли фракции, содержащие целевой гибридный белок. Полученный объединенный элюат титровали 1 M HCl до pH 6.0, добавляли MESNA до конечной концентрации 2 mM и инкубировали в течение 48 ч при 25°C для расщепления гибридного белка. Дальнейшую очистку целевого пептида проводили с помощью ультрафильтрации на установке Amicon 8200 на мембране YM10 с размером пор 10 кДа (Millipore) и последующей ОФ ВЭЖХ на колонке PerfectSil 300 C18 8x250 10 мкн (MZ Preparative, США). Полученный раствор лиофильно высушивали.

6.7.2. Получение тимозина $\alpha 1$ с помощью протеолитического расщепления гибридного белка

*Создание штамма-продуцента *E.coli* ER2566 / pTEV-Thym*

Фрагмент ДНК, несущий ген тимозина $\alpha 1$, был переклонирован в плазмиду pTEV по сайтам узнавания рестриктаз SapI и BamHI. Полученным экспрессионным вектором pTEV-Thym был трансформирован штамм *E. coli* ER2566.

Созданный таким образом штамм-продуцент дезацетилтимозина- α_1 *E.coli* ER2566 /pTEV-Thym культивировали в среде LB с 100 мкг/мл ампициллина при 37 °С до оптической плотности культуры OD₆₀₀ 0.6, затем вносили ИПТГ до конечной концентрации 0.4 мМ и выращивали 4 ч при 37 °С. Клеточную биомассу отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 5000 g и 4°С. Съем биомассы составлял 3 г влажных клеток с литра клеточной культуры.

Разработка технологии выделения и очистки дезацетилтимозина $\alpha 1$

Очистку гибридного белка TrxTEVrs- Thym из клеточного супернатанта проводили на колонке XK 16/20 с 20 мл сорбента Ni²⁺-IDA Sepharose по методике, описанной в разделе 6.6 для фрагмента тумстатина. После элюции гибридного белка определяли оптимальное соотношение фермент/гибридный белок. С этой целью параллельно подготавливали 6 реакционных смесей объемом 30 мл, содержащих гибридный белок с концентрацией 5 мг/мл, TEV-протеиназу в соотношениях 1/400, 1/300, 1/200, 1/100, 1/50, 1/25 (фермент/белок) и буфер 26. Исходный раствор TEV-протеиназы добавляли в реакционную смеси каплями при постоянном перемешивании. Реакционные смеси инкубировали в течение 16 ч в термостатированном шкафу при температуре 30 °С. После чего отбирали аликвоты и проводили ОФ ВЭЖХ анализ содержания целевого тимозина $\alpha 1$. Очистку дезацетилтимозина $\alpha 1$ от примесных белков проводили с помощью тангенциальной ультрафильтрации на установке Amicon 8200 на мембране YM10 с размером пор 10 кДа (Millipore) и последующей ОФ ВЭЖХ.

*Масштабирование стадии культивирования штамма-продуцента *E.coli* ER2566/pTEV-Thym*

Был осуществлен переход на полупромышленный ферментер с объёмом загрузки 40 литров. При этом были сохранены условия лабораторного культивирования: питательная среда LB, pH 7.0, температура культивирования – 37 °С, концентрации растворенного кислорода (pO₂) – 55±5% от насыщения питательной среды, давление 0.25±0.05 атм, скорость вращения мешалки – 250 об/мин, скорость подачи стерильного воздуха – 100 л/мин, показания датчика растворенного кислорода (pO₂) – 100%. Общая продолжительность культивирования после засева инокулятом составляла 12,0±0,5 ч. При достижении OD₆₀₀= 5.0-6.0 о.е. через 7 – 7,5 часов

от начала культивирования вносили стерильный водный раствор ИПТГ до конечной концентрации 0.4 мМ для индукции биосинтеза гибридного белка и продолжали культивирование при 37 °С. Через 4 – 4.5 часа процесс останавливали. Сбор клеточной биомассы осуществляли на проточной центрифуге СЕРА 61 G (Германия) при скорости вращения ротора 14–16 тыс. об/мин и скорости подачи суспензии 3–4 л/мин. Съем клеточной биомассы составил 17±1 г с 1 литра клеточной культуры.

Масштабирование технологии выделения и очистки дезацетилтимозина $\alpha 1$

150 г клеточной биомассы гомогенизировали в буфере 27 в соотношении 1:10 w/v и затем разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора. Осветленный лизат разбавляли буфером 27 до концентрации белка 1,5 мг/мл и проводили анионообменную хроматографию с помощью системы АКТА Pilot на колонке ХК 50/40, содержащей 700 мл сорбента Q Sepharose XL. После загрузки белкового раствора колонну промывали 2 CV буфера 27, а гибридный белок элюировали 2 CV буфера 28 со скоростью 25 мл/мин. При постановке расщепления сохраняли подобранные концентрации гибридного белка и TEV-протеиназы, их соотношение, рН и остальные параметры.

Очистку дезацетилтимозина $\alpha 1$ от остаточного белка проводили с помощью катионообменной хроматографии на колонне ВРG 100/500 (GE Healthcare, США), содержащей 1500 мл сорбента Macroprep High S (Bio-Rad, США) на хроматографической системе Akta Pilot (GE Healthcare, США). Предварительно реакционную смесь титровали раствором 5М уксусной кислоты до значения рН 3.5 в течение 12 ч при 4 °С. При этом происходило осаждение значительной части примесных белков. Осадок отделяли центрифугированием в течение 1,5 ч при 4500 об/мин и 5°С на центрифуге с проточным ротором Avanti J-30I (Beckman Coulter, США). Полученный супернатант разбавляли в 10 раз дистиллированной водой. Раствор наносили со скоростью 50 мл/мин на колонну, предварительно уравновешенную буфером 29. После нанесения колонну промывали 2 CV буфера 29 и проводили элюцию 2 CV буфера 30 со скоростью 100 мл/мин. Элюат, разбавляли высокоочищенной водой в 10 раз, титровали раствором 5 М NaOH до значения рН 5.2 и наносили на ту же колонну, предварительно уравновешенную 2 CV буфера 31. После нанесения колонну промывали 2 CV этого же буфера и регенерировали буфером 30. Элюат, полученный на стадиях загрузки белкового раствора и промывки колонны, титровали до значения рН 3.0 раствором 5 М уксусной кислоты и переносили на ту же колонну, уравновешенную буфером 29. По окончании нанесения колонну промывали 2 CV буфера 29 и проводили элюцию целевого пептида 2 CV буфера 30.

Оптимизация условий реакции ацетилирования дезацетилтимозина $\alpha 1$

Оптимизацию условий ацетилирования дезацетилтимозина проводили по следующим параметрам: длительность инкубации с ацетилирующим агентом и разные концентрации лимонной и малоновой кислоты для остановки реакции. Реакционные смеси (всего 8 штук) содержали дезацетилтимозин $\alpha 1$ в концентрации 1 мг/мл (элюат после ОФ ВЭЖХ) при pH 3.5 и уксусный ангидрид в объёмном соотношении в диапазоне от 1 : 600 до 1 : 3000. Ангидрид вносили по каплям при перемешивали и инкубировали смеси при 4 или 23 °С в течение 60 мин. Затем, анализировали с помощью аналитической ОФ ВЭЖХ содержание продуктов реакции в смесях.

Масштабирование реакции ацетилирования дезацетилтимозина и очистка продуктов реакции ОФ ВЭЖХ

При масштабировании возникла необходимость во введении стадии терминации реакции ацетилирования. Для этого реакционную смесь, содержащую раствор дезацетилтимозина $\alpha 1$ 1 мг/мл и уксусный ангидрид в соотношении 1 : 600 v/v и полученную при 23 °С, разделяли на 10 порций и в момент остановки (60 мин) вносили лимонную или малоновую кислоту до конечных концентраций 1, 5, 10, 50 и 100 мМ. Далее анализировали состав продуктов реакции с помощью аналитической ОФ ВЭЖХ.

Было проведено масштабирование в 90 раз процесса ацетилирования дезацетилтимозина $\alpha 1$ при подобранных параметрах реакции: к 900 мл раствора пептида с концентраций 1 мг/мл при pH 3.5 при постоянном перемешивании добавляли по каплям уксусный ангидрид в объёмном соотношении 1:100 и инкубировали при постоянном перемешивании в течение 60 мин при 23 °С. Для остановки реакции вносили раствор лимонной кислоты до конечной концентрации 10 мМ. Очистку тимозина $\alpha 1$ от дезацетилированной и побочных форм проводили с помощью препаративной ОФ ВЭЖХ на колонке Kromasil 300-10-C18, 50x250 мм (GMBH, Германия). Элюцию производили в градиенте концентрации от 15 до 25 % раствора 80% ацетонитрила с 0.1% ТФУ при скорости потока 50 мл/мин. Объединяли фракции, содержащие целевой пептид с хроматографической чистотой более 98 %, и лиофильно высушивали.

6.8. Получение тимозина $\beta 4$

*Создание штамма-продуцента *E. coli* ER2566 /pTEV-TB4*

Синтез искусственного гена тимозина $\beta 4$ проводили химико-ферментативным способом из перекрывающихся олигонуклеотидов по методике, описанной для фрагмента [L69K–95] тумстатина в п.6.6 раздела Материалы и методы:

ТН 1	5'-GGTGGTGGCTCTTCTCAGAGCGATAAAC-3'
ТН 2	5'-CGGATATGGCGGAAATTGAAAAATTTG-3'
ТН 3	5'-ATAAAAGCAAAC TGAAAAAACCGAAAC-3'
ТН 4	5'-CCAGGAAAAAAAACCCGCTGCCGAG-3'
ТН 5	5'-CAAAGAAACCATTGAACAFFAAAAACAGG-3'
ТН 6	5'-CGGGTGAAAGCTAAGGATCCACCACC-3'
ТН 7	5'-GCTCTGAGAAGAGCACCACC-3'
ТН 8	5'-TTTCAATTTCCGCCATATCCGGTTTATC-3'
ТН 9	5'-GTTTCGGTTTTTTTCAGTTTGCTTTTATCAAAT-3'
ТН10	5'-СТСGGCAGCGGGAAAAAACCTGG-3'
ТН 11	5'-TTTTCTGTTC AATGGTTTCTTTG-3'
ТН 12	5'-GGTGGTGGATCCTTAGCTTTCACCCGCCTGT-3'

Аmplифицированный ген ТВ4 был клонирован в плазмиду pGEM5zf(-), из которой фрагмент ДНК, несущий целевой ген был переклонирован в плазмиду pTEV. Полученным экспрессионным вектором pTEV-ТВ4 был трансформирован штамм *E. coli* ER2566 и получен в результате был штамм-продуцент дезацетилтимозина β4 – *E. coli* ER2566 /pTEV-ТВ4.

Разработка лабораторной технологии выделения и очистки дезацетилтимозина β4

Поскольку изначально планировалась наработка значительного количества дезацетилтимозина β4, то при разработке методики изначально использовали легкомасштабируемые технологические приемы. Во-первых, сразу после разрушения ввели стадию осаждения балластных белков. Для этого супернатант, полученный при разрушении 5 г клеточной биомассы, разделяли на равные порции и использовали для проведения высаливания сульфатом аммония или хлоридом натрия (при концентрациях 2, 3 и 4 М), рН-зависимого (рН 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0) и температурного осаждения (инкубация при 25 – 70 °С, интервал 5 °С). С помощью электрофоретического анализа определяли распределение гибридного и примесных белков между супернатантом и осадком после центрифугирования проб. Во-вторых, выделение гибридного белка TrxTEV_{ts}-ТВ4 из клеточного супернатанта проводили с помощью анионообменной хроматографии на колонке ХК 16/20 с сорбентом Q Sepharose XL., уравновешенной буфером 27. После загрузки белкового раствора колонну промывали 2 CV буфера 27, а гибридный белок элюировали 2 CV буфера 28 со скоростью 25 мл/мин. Далее оценивали эффективность расщепления гибридного белка при разном соотношении фермент : белок в диапазоне 1 : 400 до 1 : 25. Реакционные смеси инкубировали в течение 16 ч в термостатированном шкафу при температуре 30 °С, после чего анализировали электрофоретически.

Дальнейшую очистку дезацетилтимозина β4 от примесных белков проводили с помощью тангенциальной ультрафильтрации на установке Amicon 8200 на мембране YM10 с размером пор 10 кДа (Millipore) и последующей ОФ ВЭЖХ. Полученный белковый раствор (элюат после

ОФ ВЭЖХ) использовали для отработки стадии ацетилирования по схеме, описанной для тимозина $\alpha 1$.

Масштабирование стадии культивирования штамма-продуцента E.coli ER2566/pTEV-TB4

Был осуществлен переход культивирования штамма-продуцента *E.coli* ER2566/pTEV-TB4 от качалочных колб до полупромышленного ферментера Electrolux (Швеция) с объёмом загрузки 250 литров. Культивирование проводили при следующих параметрах: питательная среда LB, pH 7.0, температура культивирования – 37 °С, концентрации растворенного кислорода (pO_2) – 55±5% от насыщения питательной среды, давление 0,25±0,05 атм, скорость вращения мешалки – 250 об/мин, скорость подачи стерильного воздуха – 100 л/мин, показания датчика растворенного кислорода (pO_2) – 100%. Общая продолжительность культивирования после засева инокулятом составляла 12,0±0,5 ч. При достижении $OD_{600}=5-5.5$ о.е. через 7 – 7,5 часов вносили стерильный водный раствор ИПТГ до конечной концентрации 0.4 мМ для индукции биосинтеза гибридного белка и продолжали культивирование при 37 °С. Через 4 – 4.5 часа процесс останавливали. Сбор клеточной биомассы осуществляли на проточной центрифуге СЕРА 61 G (Германия) при скорости вращения ротора 14–16 тыс. об/мин и скорости подачи суспензии 3–4 л/мин. Съём клеточной биомассы составил 14±1 г с 1 литра клеточной культуры.

Масштабирование технологии выделения и очистки тимозина $\beta 4$

500 г полученной биомассы гомогенизировали в буфере 27 в соотношении 1:10 (w/v) с помощью лабораторного гомогенизатора APV–1000 (Германия). Разрушенную клеточную суспензию центрифугировали на центрифуге с проточным ротором Avanti J-30I (Beckman Coulter, США) при 4500 об/мин, 5 °С в течение 1.5 часов для разделения клеточного супернатанта, содержащего целевой гибридный белок, и клеточного дебриса. Осветлённый клеточный лизат в объёме 5 л, полученный на стадии разрушения клеточной биомассы, выдерживали в термостатируемом шкафу при 50 °С в течение 15 мин. После чего отделяли осадок агрегированных балластных белков центрифугированием при 7000 об/мин в течение 40 мин при 5 °С. Полученный супернатант титровали до pH 9.0 раствором 5 М NaOH и проводили анионообменную хроматографическую очистку на сорбенте Q Sepharose XL. При постановке расщепления сохраняли подобранные концентрации гибридного белка и TEV-протеиназы, их соотношение, pH и остальные параметры. Дальнейшую очистку дезацетилтимозина $\beta 4$ проводили по методике, используемой при масштабном выделении тимозина- $\alpha 1$: осаждение балластных белков при pH 3.0 и центрифугирование, катионообменная хроматография на колонке ХК 16/20 с 20 мл сорбента Масгрер High S при pH 3.5, рехроматография полученного элюата на той же колонке при pH 5.2, рехроматография фракции проскока при pH 3.5 на той же колонке и ОФ ВЭЖХ. Стадия ацетилирования потребовала модификации по стадии

расщепления гибридного белка, выделения, очистки и ацетилирования тимозина $\beta 4$ аналогичны стадиям получения тимозина $\alpha 1$.

6.9. Получение рекомбинантного глюкагона

Создание штамма-продуцента E. coli ER2566/pERGI

Искусственный ген глюкагона синтезировали химико-ферментативным способом из перекрывающихся олигонуклеотидов Glu-1 – Glu-6 с последующей амплификацией при помощи ПЦР с праймерами PrGlu-int и PrGlu-ter по методике, описанной для фрагмента [L69K–95] тумстатина в п.6.6 раздела Материалы и методы:

Glu-1	5'-CATTCTCAGGGCACGTTTACCAGCGATTATAGC-3'
Glu-2	5'-AAATACCTGGACTCTCGTCGCGCGCAGGAT-3'
Glu-3	5'-TTCGTGCAGTGGCTGATGAACACCTAA-3'
Glu-4	5'-TTAGGTGTTTCATCAGCCACTGCACGAAATCCTGCGCGCG-3'
Glu-5	5'-ACGAGAGTCCAGGTATTTGCTATAATCGCTGG-3'
Glu-6	5'-TAAACGTGCCCTGAGAATGGTTGTGTACAATGATG-3'
PrGlu-int	5'-GGTGGTTGCTCTTCCAACCATTTCTCAGGGCACG-3'
PrGlu-ter	5'-CGGGATCCCGTTAGGTGTTTCATCAGCCACTGCACGAA-3'

Амплифицированный ген клонировали в вектор pGEM5z- по сайту рестрикции EcoRV. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue. Отбор трансформантов осуществляли по сине-белой реакции на агаризованной среде в присутствии X-Gal. Ген глюкагона был переклонирован в экспрессионный вектор pTWIN1 (New England Biolabs, США) по сайтам рестрикции SapI и BamHI. Полученным экспрессионным вектором pERGI трансформировали штамм *E. coli* ER2566.

При подборе условий культивирования созданного штамма *E. coli* ER2566/pERGI проводили выращивание в среде LB с 100 мкг/мл ампициллина при разных условиях после внесения ИПТГ (при $OD_{600} = 0.8$): 14-16 ч при 14 °C в отсутствии и присутствии $ZnCl_2$ в концентрации от 1 до 5 мМ и 4-6 ч при 37 °C. При аналогичных условиях провели культивирование штаммов-продуцентов, созданных при трансформации *E. coli* BL21(DE3) и Origami(DE3). Во всех случаях электрофоретически анализировали накопление гибридного белка в ходе культивирования, содержание белка в растворимой и нерастворимой клеточных фракциях, степень автокаталитического расщепления *in vivo*. В результате этого сравнительного исследования остановились на штамме *E. coli* ER2566/pERGI и условиях выращивания 4 ч при 37 °C. Съём клеточной биомассы составил 2.1 г с литра культуры.

Разработка лабораторной технологии выделения и очистки глюкагона

Полученную влажную биомассу гомогенизировали в буфере 32 и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора. Осадок после центрифугирования (10000 g, 30 мин, 10 °C) отделяли, ресуспендировали в деионизованной воде, снова центрифугировали и

суспендировали в буфере 32. Супернатант отбрасывали, а осадок тел включения, содержащих гибридный белок, хранили в замороженном виде до использования при -80°C .

Отмытые тела включения растворяли в буфере 4 в течение 30 минут при $+4^{\circ}\text{C}$, затем центрифугировали 30 минут при 11000 об/мин. Для ренатурации гибридного белка супернатант, содержащий экстракт тел включения, разбавляли в 2 раза охлажденным буфером 33 и инкубировали в течение 5 ч при 8°C . После чего разбавляли буфером 34 до концентрации белка 1 мг/мл, доводили pH до 7,3–7,0 и инкубировали 16 ч при 25°C . Затем белковый раствор титровали раствором 6 М соляной кислоты до pH 4,0, и отделяли выпавший белковый осадок центрифугированием в течение 30 мин при 11000 об/мин.

Для очистки глюкагона от примесных белков использовали тангенциальную ультрафильтрацию на мембранных картриджах VivaFlow 50 10000 MWCO RC на приборе MasterFlex L/S (Cole Parmer, США). Фильтрат, содержащий глюкагон, наносили на колонку ХК 16/20, содержащую 10 мл сорбента SP Sepharose Fast Flow и предварительно уравновешенную раствором 35. Затем промывали колонку 2 CV буфера 36. Элюировали глюкагон 1 CV 0,5%-ного раствора аммиака. Окончательную очистку глюкагона проводили с помощью ОФ ВЭЖХ на колонне Диасорб-130-С16Т 7 мкм, 16x250 мм (Элсико) в линейном градиенте 30 – 60% ацетонитрила с 0.1% ТФУ при скорости потока 4 мл/мин в течение 60 мин.

Масштабирование стадии культивирования штамма-продуцента

Клеточную биомассу штамма-продуцента *E. coli* ER2566/pERGI нарабатывали в 250 л ферментёре Electrolux (Швеция) объёмом загрузки 200 л. 200 л питательной среды LB, содержащей 4 г/л глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина засекали 1% инокулята. Ферментацию проводили при 37°C и pH 7,0 (с автоматической подтитровкой раствором аммиака) при аэрации воздухом 20–40 л/мин. Через 3 часа после начала культивирования при достижении оптической плотности культуры 5.0 ± 0.2 вносили ИПТГ до конечной концентрации 0,4 мМ и продолжали ферментацию 4 ч при 37°C (на момент остановки $\text{OD}_{600} = 10.0 \pm 1.0$). Клетки отделяли центрифугированием на проточной центрифуге СЕРА 61 G (Германия) при 14–16 тыс. об/мин и скорости подачи суспензии 3–4 л/мин. Съём клеточной биомассы составил 10.0 ± 1.0 г с литра культуры.

Полученную влажную биомассу гомогенизировали в буфере 32 и разрушали с помощью дезинтегратора Gaulin homogenizer 81 MC 4-10 TBSX (APV, Германия). Осадок после центрифугирования на проточной центрифуге (14000 об/мин, скорость подачи 1 л/мин) отделяли, ресуспендировали в буфере 32 и снова центрифугировали. Супернатант отбрасывали, а осадок тел включения, содержащих гибридный белок, хранили в замороженном виде при -50°C .

Масштабирование лабораторной технологии очистки глюкагона

При масштабировании разработанной лабораторной методики проводили оптимизацию на каждой стадии. Для начала была исследована кинетика автокаталитического расщепления гибридного белка. В ходе расщепления отбирали аликвоты для электрофоретического и ОФ ВЭЖХ анализа. Непосредственно после окончания расщепления (не более 6 ч) реакционную смесь титровали раствором 5М уксусной кислоты до значения pH 3,0. При этом происходило осаждение значительной части примесных белков. Осадок отделяли центрифугированием в течение 1,5 ч при 4500 об/мин и 5°C на центрифуге с проточным ротором Avanti J-30I (Beckman Coulter, США). Катионообменную хроматографическую очистку проводили по уже подобранной программе на колонне XK 50/40 (GE Healthcare, США), содержащей 300 мл сорбента Macroprep High S (Bio-Rad, США) на хроматографической системе Akta Pilot (GE Healthcare, США). Препаративную ОФ ВЭЖХ очистку глюкагона проводили на хроматографической колонне YMC-DAU (100-700 мм) объемом 3,5 л с сорбентом Диасорб-130-S16T 7 мкм (Элсико) с помощью системы для жидкостной хроматографии Knauer. Элюция градиентом концентрации ацетонитрила 10-80% с 0.1% ТФУ при скорости потока 200 мл/мин. Фракции, содержащие глюкагон с хроматографической чистотой более 98 %, объединяли и наносили на колонну с 7 л сорбента BioGel P-6DG, уравновешенную буфером 21. Полученный элюат лиофильно высушивали.

6.10. Получение дезирудина и лепирудина

Создание штаммов-продуцентов дезирудина и его аналогов

Искусственные гены дезирудина и лепирудина синтезировали химико-ферментативным способом из перекрывающихся олигонуклеотидов H1 – H12 и H Lep1 по методике, описанной для фрагмента [L69K–95] тумстатина в п.6.6 раздела Материалы и методы:

H1	5'-GTGGTGTACACCGATTGTACCGAATCTGGT-3'
H2	5'-CAGGACCTGTGTCTGTGTGAAGGTTCTAAC-3'
H3	5'-GTTTGTGGTCAGGGTAACAAATGTATTCTG-3'
H4	5'-GGTTCTGATGGTGAAAAAACAGTGTGTT-3'
H5	5'-ACCGGTGAAGGTACCCGAAACCGCAGTCT-3'
H6	5'-CATAACGATGGTGATTTTGAAGAAATCCG-3'
H7	5'-TТАCTGCAGGТАТТСТТССGGAATTTCTTCAAА-3'
H8	5'-ATCACCATCGTTATGAGACTGCGGTTTCGG-3'
H9	5'-GGTACSTTCACCGGTAACACACTGGTTTTTTT-3'
H10	5'-CACCATCAGAACCAGAATAGATTTGTT-3'
H11	5'-ACCSTGACCACAAACGTTAGAACSTTCACA-3'
H12	5'-CAGACACAGGTTCTGACCAGATTCGGTACA-3'
H Lep1	5'-GGTGGTTGCTCTTCTAACCTGACCTACACC-3'

Полученные гены были клонированы в вектор pGEM5z-, обработанный рестриктазой EcoRV. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* XL-1-Blue. Отбор

трансформантов осуществляли по сине-белой реакции на агаризованной среде LB в присутствии X-Gal. Далее гены дезирудина и лепирудина были переклонированы в экспрессионный вектор pTWIN1. На основе созданного вектора pER-HIRLep был сконструирован ген, кодирующий белок HIRLep1/3 (сшитые N-концевой фрагмент [Leu1-Thr2]-гирудина-1 и C-концевая часть [53-66]-фрагмент гирудина-3). С этой целью в вектор pER-HIRLep по сайтам KpnI и BamHI был клонирован синтетический ДНК фрагмент, полученный химико-ферментативным способом из олигонуклеотидов:

H13	5'-GCCGAAACCGCAGTCTCATAACCAGGGTGATTTTG-3'
H14	5'-AACCGATTCCGGAAGATGCGTACGATGAATAATAA-3'
H15	5'-GATCTTATTATTCATCGTACGCATCT-3'
H16	5'-TCCGGAATCGGTTCAAATCACCTG-3'
H17	5'-GTTATGAGACTGCGGTTTCGGCGTAC-3'

Полученными экспрессионными векторами pER-HIR, pER-HIRLep и pER-HIRLep1/3 трансформировали штамм *E. coli* ER2566. Культивирование штамма *E. coli* ER2566/pER-HIR проводили в течение 3 ч при 23 °С после внесения ИПТГ для индуктора белкового биосинтеза, а культивирование штаммов *E. coli* ER2566/pER-HIRLep и *E. coli* ER2566/pER-HIRLep1/3 – в течение 4 ч при 37 °С. Для всех штаммов использовали питательную среду LB с 100 мкг/мл ампициллина. Внесение ИПТГ осуществляли при достижении $OD_{600}=0.8-0.9$. Клеточные биомассы отделяли центрифугированием культур в течении 20 мин при 4°С и 4000 об/мин.

Разработка лабораторной технологии выделения дезирудина и его аналогов

Гибридные белки DnaB-HIR и DnaB-HIRLep1/3 синтезировались в растворимой форме. Их выделение из клеточного супернатанта после разрушения биомассы на ультразвуковом дезинтеграторе (в буфере 37) проводили с помощью анионообменной хроматографии на колонке XK 16/20 (GE Healthcare) с 25 мл сорбента Q Sepharose XL (GE Healthcare). Перед загрузкой супернатант в обоих случаях разбавляли в 2 раза высокоочищенной водой milliQ и титровали до pH 9.0. При выделении гибридного белка DnaB-HIRLep1/3 в клеточный супернатант добавляли перед разбавлением 1 М дитиотреитол до концентрации 10 мМ и инкубировали 3 ч при 23 °С. Колонна перед загрузкой белкового раствора была уравновешена буфером 38 (при выделении белка DnaB-HIRLep1/3 в раствор для уравновешивания и промывки колонны вносили дитиотреитол до концентрации 10 мМ). После нанесения колонку промывали 3 CV буфера 38 и проводили хроматографию в градиенте концентрации от 0 до 50 мМ NaCl за 120 мин со скоростью 2 мл/мин, создаваемом растворами 38 и 39. Объединяли фракции, содержащие более 20% целевого гибридного белка. Полученный объединенный элюат титровали 1 М HCl до pH 6.0 и инкубировали в течение 24 ч при 25°С для расщепления гибридного белка.

Гибридный белок DnaB-HIRLep синтезировался в нерастворимой форме в виде тел включения. После центрифугирования разрушенной клеточной суспензии проводили 2х-кратную отмывку полученных тел включения в буфере 39 (в соотношении 1:10 w/v). Отмытые тела включения солюбилизировали в растворе 40 и отделяли нерастворимый дебрис центрифугированием в течение 20 мин при 12000 об/мин. Полученный раствор тел включения разбавляли в 20 раз в растворе 41 и инкубировали при перемешивании в течение 24 ч при 10°C. Затем белковый раствор титровали 1 М HCl до pH 6.0 и инкубировали 24 ч при 25°C для расщепления гибридного белка DnaB-HIRLep.

Очистку дезирудина и его аналогов осуществляли с помощью анионообменной хроматографии на колонке XK 16/20 (GE Healthcare) с 25 мл сорбента Q Sepharose HP (GE Healthcare). Белковый раствор, содержащий продукты расщепления гибридного белка, титровали 1 М HCl до pH 4.8 для осаждения балластных белков. Белковый осадок отделяли фильтрованием раствора через складчатые (8 мкн) и мембранные (0,45 мкн) фильтры. Фильтрат наносили со скоростью 1 мл/мин на колонну, уравновешенную буферным раствором 42. После нанесения колонку отмывали тем же буфером, далее уравнивали 5 CV буфера 43 и элюировали целевой полипептид линейным градиентом pH от 4.8 до 3.6 за 125 мин со скоростью 1 мл/мин, создаваемым растворами 43 и 44. Окончательную очистку дезирудина и его аналогов осуществляли с помощью ОФ ВЭЖХ на колонке Диасорб-130-C16T 7 мкм, 16x250 мм (Элсико) в градиенте 80%-го ацетонитрила (от 10 до 60%) в 0.1 % TFA за 60 мин со скоростью 3.5 мл/мин. Фракции, содержащие целевой полипептид с хроматографической чистотой более 98%, объединяли и лиофильно высушивали на центробежном концентраторе CentriVar Acid-Resistant System (Labconco Corp).

Масштабирование схемы выделения и очистки дезирудина и лепирудина

Осуществлен перенос культивирования штаммов-продуцентов *E. coli* ER2566/pER-HIR и ER2566/pER-HIRLep с качалочных колб на полупромышленный ферментер Electrolux (Швеция) объемом загрузки 75 л с соблюдением подобранных условий. Отделение клеточной биомассы осуществляли с помощью проточного сепаратора СЕРА 61 G (Германия) при 14–16 тыс. об/мин и скорости подачи суспензии 3–4 л/мин. Съём клеточной биомассы для обоих штаммов составил около 13.0±1.0 г с литра культуры.

Разработанные лабораторные методики были отмасштабированы в 80 раз без значительных изменений. Загрузка клеточной биомассы в один технологический цикл составляла 400 г. Для выделения гибридного белка DnaB-Hir использовали колонну XK 50/60 (GE Healthcare) с 1 л сорбента Q Sepharose XL. При таком масштабировании расщепления не снизилась его эффективность. Для очистки обоих аналогов гирудина-1 использовали на первой

стадии колонну XK 50/60 (GE Healthcare) с 0.5 л анионообменного сорбента Q Sepharose HP, а на второй – ОФ ВЭЖХ Kromasil 300 10 C18 250X50 мм. Перед лиофилизацией ввели стадию гель-фильтрационной хроматографии на колонне BPG 200/500 с 7 л сорбента Biogel P2, уравновешенную раствором 21.

6.11. Получение пуротоксина-1

Создание экспрессионных векторов pTrx-PT1, pCBD-PT1, pGyrA-PT1 и pDnaB-PT1

Синтетический ген пуротоксина-1 был получен химико-ферментативным способом из перекрывающихся олигонуклеотидов PT-1 и PT-7 по методике, описанной для фрагмента [L69K–95] тумстатина в п.6.6 раздела Материалы и методы:

PT-1	5'-ATGGGTTACTGCGCTGAGAAG-3'
PT-2	5'-GGTATCCGTTGCGATGACATCCACTGTTGCACCG-3'
PT-3	5'-GTCTGAAGTGCAAATGCAACGCTTCTGGTTACAACCTG-3'
PT-4	5'-CGTTTGCCGTAAGAAATAG-3'
PT-5	5'-СТАТТТСТТАСГГСАААСГСАГТТГТААССАГААГС-3'
PT-6	5'-ГТТГСАТТТГСАСТТСАГАССГГТГСААСАГТГГАТГТ-3'
PT-7	5'-САТГСААСГГАТАССТТСТСАГСГАГТААСССАТ-3'

Далее полученный ген амплифицировали с помощью олигонуклеотидов:

для клонирования в векторные плазмиды pTVG и pET-CBD

PR-1.1	5'-GGTGGT <u>TGCTCTTCCA</u> ACGGTACTGCGCTGAGAAG-3'
PR-2	5'-GGTGGT <u>GGATCC</u> СТАТТТСТТАСГГС-3'

и для клонирования в экспрессионный вектор pTWIN1 и pGyrA.

PR-2.1	5'-GGTGGT <u>TGCTCTTCTC</u> AGGGTACTGCGCTGAGAAG-3'
PR-2	5'-GGTGGT <u>GGATCC</u> СТАТТТСТТАСГГС-3'

Ген амплифицировали н матрице плазмиды pET32b(+)-PT₁ с парой праймеров, содержащих сайты узнавания ферментами рестрикции SapI и BamHI. При создании векторов pTrx-PT₁, pCBD-PT₁ использовали праймеры PR-1.1 и PR-2, при конструировании плазмид pGyrA-PT₁ и pDnaB-PT₁ – праймеры PR-2.1 и PR-2. Полученные гены пуротоксина и соответствующие вектора были обработаны эндонуклеазами рестрикции SapI и BamHI и полученные фрагменты лигированы между собой.

Культивирование штаммов-продуцентов E.coli C3030/pTRX-PT1, E.coli C3030/pCBD-PT1, E.coli C3030/pGyrA-PT1 и E.coli C3030/pDnaB-PT1

Полученными плазмидными векторами pTRX-PT1, pCBD-PT1, pGyrA-PT1 и pDnaB-PT1 трансформировали компетентные клетки штамма *E.coli* C3030. Культивирование полученных штаммов проводили по стандартной методике на среде SOB с ампициллином (100 мкг/мл). При достижении OD₆₀₀=0,9-1,0 после засева среды инокулятом вносили ИПТГ и продолжали

культивирование штаммов *E.coli* C3030/pTRX-PT1, C3030/pCBD-PT1 и C3030/pGyrA-PT1 в течение 4 ч при 37 °С, а штамма *E.coli* C3030/pDnaB-PT1 – в течение 4 часов при 30°С. Клеточную биомассу отделяли центрифугированием (5500 об/мин, 40 мин, при 4°С). Съем клеточной биомассы для всех штаммов составлял около 7 г с литра клеточной культуры.

Разработка лабораторной технологии выделения пуротоксина-1

Очистка на хитиновом сорбенте и расщепление гибридных белков CBD-PT1, GyrA-PT1 и DnaB-PT1

Разрушение клеточной биомассы штаммов-продуцентов гибридных белков CBD-TEVrs-PT1, GyrA-PT1 и DnaB-PT1 проводили в соотношении 1:10 w/v в буфере 37 с помощью ультразвукового дезинтегратора. Полученные после центрифугирования осветленные клеточные лизаты разводили в 3 раза тем же буферным раствором. Для выделения гибридных белков использовали хитиновый сорбент (New England Biolabs). Загрузку осуществляли из расчета 5 мл раствора лизата на 1 мл сорбента. После промывки 5 CV колонны буфером 37, индуцировали расщепление гибридного белка. В случае гибридных белков GyrA-PT1 и DnaB-PT1 хроматографическую колонку промывали 5 CV буфера 46, в случае гибридного белка CBD-TEVrs-PT1 колонку уравнивали 5 CV буфера 37, содержащего 50 мкг/мл TEV-протеиназы и 1 мМ ДТТ для индукции расщепления. Колонки инкубировали в течение 16 часов при 25 °С и элюировали продукт тем же раствором.

Очистка с помощью ионообменной хроматографии и расщепление гибридного белка Trx-PT1

Клеточную биомассу штамма-продуцента *E.coli* C3030/pTRX-PT1 разрушали при тех же параметрах в буфере 37. 10 мл осветленного клеточного лизата после центрифугирования, разводили в 10 раз буфером 37. 100 мл полученного раствора наносили на хроматографическую колонку ХК 16/20, содержащую 5 мл сорбента Q Sepharose HP (GE Healthcare), предварительно уравниваемую буфером 37. Элюцию проводили в линейном градиенте от 0 до 1 М NaCl, создаваемом буферами 38 и 39, за 30 мин со скоростью 2 мл/мин. Фракции, содержащие целевой гибридный белок, объединяли. К 1 мл раствора объединенного элюата с концентрацией белка 1.5 мг/мл добавляли раствор TEV-протеиназы из расчета 1:30 и дитиотреитол до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали в течение 16 часов при 37 °С.

Расщепление гибридного белка DnaB-PT1 и очистка пуротоксина-1

Выделение пуротоксина-1 проводили из 20 г клеточной биомассы, как описано выше. Но сразу после отделения осветленного клеточного лизата индуцировали расщепление гибридного белка разбавлением 2:1 буфером 47. Спустя 16 инкубации при 4 °С белковый раствор титровали до pH 3.0 и инкубировали 3 ч при 4 °С. Выпавший белковый осадок отделяли

центрифугированием, а супернатант разбавляли в 2 раза дистиллированной водой и загружали на колонку ХК 16/20, содержащую 20 мл сорбента MacroPrep High S (Bio Rad, США), уравновешенную раствором 48. Элюцию целевого пуротоксина-1 проводили в градиенте от 0 до 1.5 М NaCl, создаваемом растворами 49 и 50. Дальнейшую очистку проводили с помощью ОФ ВЭЖХ на колонке Диасорб-130-С16Т 7 мкм, 16x250 мм (Элсико). Хроматографию проводили в градиенте 80 % ацетонитрила (от 10 до 60%) в 0.1 % TFA за 60 мин со скоростью 3.5 мл/мин. Фракции, содержащие целевой полипептид с хроматографической чистотой более 98%, объединяли и лиофильно высушивали.

Масштабирование культивирования штамма-продуцента гибридного белка DnaB-PT1

Осуществлен перенос культивирования штамма-продуцента гибридного белка DnaB-PT1 с качалочных колб на полупромышленный ферментер Electrolux (Швеция) объемом загрузки 75 л с соблюдением подобранных условий. Отделение клеточной биомассы осуществляли с помощью проточного сепаратора СЕРА 61 G (Германия) при 14–16 тыс. об/мин и скорости подачи суспензии 3–4 л/мин. Съём клеточной биомассы составил 15.0 ± 1.0 г с литра культуры.

Масштабирование технологии выделения пуротоксина

Разрушение 780 г клеточной биомассы проводили на проточном дезинтеграторе (Manton-Gaulin Homogenisator, Швейцария) в буфере 37, а отделение осветленного лизата – на проточном сепараторе СЕРА 61 G (Германия). Расщепление проводили в объеме 12 л. После окончания стадии расщепления и осаждения балластных белков при рН 3.0 центрифугировали белковый раствор. Супернатант загружали со скоростью 30 мл/мин с помощью хроматографической системы Akta Pilot (Швеция), на колонну ВРG 100/500 содержащую 1.5 л сорбента MacroPrep High S. Элюцию проводили по той же программе, что и для лабораторного выделения: градиент растворов 41 и 42 и скорость 150 мл/мин. Окончательную очистку пуротоксина-1 осуществляли с помощью ОФ ВЭЖХ Kromasil 300 10 C18 250X50 мм с помощью хроматографической системы Azuga (Knauer, Германия) со скоростью 30 мл/мин в линейном градиенте 80 %-ного ацетонитрила (10 – 30%) в 0.1% ТФУ в течение 60 мин со скоростью 50 мл/мин. Объединенный элюат, содержащий пуротоксин-1 с хроматографической чистотой не менее 98 %, загружали на колонну ВРG 200/500 с 7 л сорбента Biogel P2, уравновешенную раствором 51. Полученный белковый раствор лиофильно высушивали.

6.12. Получение АРНСЗ (пептальгина)

Создание штамма-продуцента *E.coli* C3030/pDnaB13

Синтетический ген пептальгина был получен химико-ферментативным способом из перекрывающихся олигонуклеотидов AP-1 и AP-11 по методике, описанной для фрагмента [L69K–95] тумстатина в п.6.6 раздела Материалы и методы:

AP-1	5'-GGTTCTATCTGCCTGGAACCGAAAGTT-3'
AP-2	5'-GTTGGTCCGTGCACCGCTTACTTCCC GC-3'
AP-3	5'-GTTTCTACTTCAACTCTGAAACCGGTAAATG-3'
AP-4	5'-CACCCSTTTCATCTACGGTGGTTGCGAAG-3'
AP-5	5'-GTAACGGTAACAACCTTCGAAACCC TG-3'
AP-6	5'-CGTGCTTGCCGTGGTATCTGCCGTGCT-3'
AP-7	5'-AGCACGGCAGATACCACGGCAAGCACGCAGGGTTTCGAAG-3'
AP-8	5'-TTGTTACCGTTACCTTCGCAACCACC-3'
AP-9	5'-GTAGATGAAAGGGGTGCATTTACCGGTTTC-3'
AP-10	5'-AGAGTTGAAGTAGAAACGCGGGAAGTAAGCG-3'
AP-11	5'-GTGCACGGACCAACAACCTTTCGGTTCAGGCAGATAGAACC-3'

Далее ген был амплифицирован с праймерами, содержащими сайты узнавания ферментами рестрикции SapI и BamHI:

AP-INT	5'-GGTGGTTGCTCTTCCAACGGTTCTATCTGCCTGG-3'
AP-REV	5'-GGTGGTGGATCCTCAAGCACGGCAGATACCAC-3'

Очищенный ПЦР фрагмент был клонирован в экспрессионный вектор pTWIN1. Полученной плазмидой pER-APНСЗ трансформировали компетентные клетки *E.coli* C3030. Культивирование полученного штамма-продуцента *E. coli* C3030/pER-APНСЗ проводили по стандартной методике на среде SOB с ампициллином (100 мкг/мл). При достижении OD₆₀₀=0,9-1,0 после засева среды инокулятом вносили ИПТГ и продолжали культивирование в течение 4,5 ч при 37 °С. Клеточную биомассу отделяли центрифугированием (5500 об/мин, 40 мин, при 4°С). Съем клеточной биомассы составил 4.0 г с литра клеточной культуры.

Разработка лабораторной технологии выделения и очистки пептальгина-1

После разрушения 5 г клеточной биомассы в растворе 52 с помощью ультразвукового дезинтегратора и центрифугирования лизата были получены тела включения, содержащие гибридный белок, в количестве 1.3 г. Проводили их 3х кратную отмывку в растворе 52, как описано в разделе 6.5. Для солюбилизации тел включения использовали буфер 53 (в соотношении 1:10 w/v). После отделения нерастворимого осадка супернатант разбавляли в 10 раз буфером 54. Для подбора условий расщепления гибридного белка полученный раствор сразу после разбавления разделяли на 5 равных порций, в каждой из которых доводили рН до 6.0, 6.5, 7.0, 7.2, 7.4, и инкубировали в течение 72 ч при 25 °С. После установления оптимума расщепления при рН 7.2 был поставлен удачный эксперимент, при котором после разбавления

экстракта тел включения проводили инкубацию при перемешивании в течение 24 ч при 25 °С, и только по окончании индуцировали расщепление.

Проводили лабораторное выделение из 10 г клеточной биомассы. После окончания инкубации (на этапе расщепления) при рН 7.2 при 23 °С белковый раствор титровали до рН 3.5 ледяной уксусной кислотой, образовавшийся осадок отделяли центрифугированием, и наносили супернатант со скоростью 5 мл/мин на хроматографическую колонку XK16/20, содержащую 20 мл катионообменного сорбента Macro-Prep High S (BioRad, США). Колонна предварительно была уравновешена буфером 29. Элюцию целевого пептальгина проводили со скоростью 2 мл/мин в градиенте от 0 до 1 М NaCl при рН 5.5, создаваемом растворами 55 и 56. Фракции, содержащие АРНСЗ, объединяли и проводили окончательную очистку с помощью ОФ ВЭЖХ на колонне Диасорб 120 С16Т (250×16 мм; Элсико) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (5–60%) в течение 80 мин со скоростью 3 мл/мин. Фракции, содержащие полипептид АРНСЗ с хроматографической чистотой более 98 %, объединяли и лиофильно высушивали.

Масштабирование стадии культивирования штамма-продуцента E.coli C3030/pDnaB13

Осуществлен переход от культивирования в качалочных колбах до ферментации в полупромышленном 200 л ферментере Electrolux (Швеция) с объемом загрузки 150 л с соблюдением подобранных условий. Отделение клеточной биомассы осуществляли с помощью проточного сепаратора СЕРА 61 G (Германия) при 14–16 тыс. об/мин и скорости подачи суспензии 3–4 л/мин. Съем клеточной биомассы составил 14.7±1.0 г с литра культуры. Разрушение биомассы проводили на проточном дезинтеграторе (Manton-Gaulin Homogenisator, Швейцария) в буфере 44. Полученные тела включения отмывали трижды в том же растворе 44.

Масштабирование технологии выделения и очистки АРНСЗ

Препаративное выделение АРНСЗ осуществляли из 100 г отмывых тел включения. Солюбилизацию тел включения осуществляли в 4 л буферного раствора 53. Ренатурацию проводили в буфере 54 в соотношении 1:10 (v/v), а расщепление гибридного белка индуцировали при рН 7.2.

Для очистки АРНСЗ от продуктов автокаталитического расщепления гибридного белка использовали колонку ВРG 100/500 (GE Healthcare), содержащую 1.5 л катионообменного сорбента Macro-Prep High S. Раствор белка после завершения стадии расщепления разбавляли в 2 раза охлажденной дистиллированной водой. Перед и после нанесения белкового раствора колонку промывали раствором 29. Нанесение проводили при скорости 300 мл/мин. Далее колонку уравновешивали буфером 55 и элюировали белок буфером 56 со скоростью 300 мл/мин.

ОФ-ВЭЖХ проводили на колонне Kromasil 300-10-C18 (Knauer, Германия). Скорость нанесения 30 мл/мин. Элюцию проводили в градиенте концентрации ацетонитрила от 10 до 80% с 0,1% ТФУ со скоростью 30 мл/мин. Фракции, которые содержали целевой продукт с хроматографической чистотой более 98%, объединяли.

Для удаления ацетонитрила ввели стадию гель-фильтрационной хроматографии на колонке ВРГ 200/500 с 7 л сорбента Biogel P2, уравновешенную раствором 51. Полученный белковый раствор лиофильно высушивали.

6.13. Получение [44 – 77] фрагмента PEDF (пигастина)

Создание экспрессионного вектора, содержащего ген [44 – 77] фрагмента PEDF и штаммов-продуцентов

Был осуществлен синтез искусственного гена [44 – 77] фрагмента PEDF химико-ферментативным способом из перекрывающихся олигонуклеотидов P-1 – P-9 и его клонирование в плазмидный вектор pGEM-5Zf(-) по методике, описанной для фрагмента [L69K–95] тумстатина в п.6.6 раздела Материалы и методы:

P-1 5'-GGTGGTGGCTCTTCCAACGATCCGTTCTTTAAAG-3'
P-2 5'-TTCCGGTTAACAААСТGGCGGCAGCCGTTTCTAАСТTTG-3'
P-3 5'-GCTACGATCTGTACCGTGTTCGTTCTTCCATGTCT-3'
P-4 5'-CCGACCACTAACC CGGTCCGTAAGGATCCACCACC-3'
P-5 5'-CGGATCGTTGGAAGAGCACCACC-3'
P-6 5'-GCCAGTTTGTТААССGGAАСТTTAAAGAA-3'
P-7 5'-CAGATCGTAGCCAAAGTTAGAAACGGCTGCC-3'
P-8 5'-TGGTCCGAGACATGGAAGAACGAACACGGTA-3'
P-9 5'-GGTGGTGGATCCTTACGGACCCGGGTTAG-3'

Далее при обработке полученной плазмиды pGEM-PEDF эндонуклеазами рестрикции SapI и BamHI выделяли ген PEDF и клонировали его в вектор pTWIN1, обработанный теми же рестриктазами. В дальнейшем при отказе от использования данной вектора ген PEDF были переклонирован в созданный нами вектор pERIG по тем же сайтам рестриктаз.

В качестве штамма-носителя для обеих плазмид использовали штамм *E. coli* BL21(DE3). Культивирование обоих штаммов проводили по одной схеме: в среде LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина, в течение 4 ч при 37 °С после внесения ИПТГ для индукции биосинтеза

Разработка лабораторной технологии получения [44 – 77] фрагмента PEDF

Схема I

Выделение и расщепление гибридного белка DnaB-PGS

Было проведено пробное выделение [44 – 77] фрагмента PEDF. Разрушение 6 г клеточной биомассы штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pERID-PEDF проводили в растворе 57 в соотношении 1:10 (w/v). Отмывку полученных тел включения (1 г) осуществляли

последовательно в растворах 58 – 60. Для солюбилизации использовали буфер 61 в соотношении в соотношении 1:20 (w/v). После полного растворения тел включения осаждали нерастворимый дебрис центрифугированием, а 1/7 часть полученного супернатанта разбавляли в 20 раз буферным раствором 62. Спустя 2 ч медленно начали титрование раствором 1% соляной кислоты. Поскольку при этом наблюдалось осаждение целевого гибридного белка, то от этой схемы отказались. Оставшуюся часть экстракта тел включения разделили на равные порции и снизили рН до значений 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0. Затем каждую порцию разбавили в 20 раз раствором 62, но заранее подтитрованным до соответствующего рН, и инкубировали в течение 20 ч при 23 °С. Эффективность расщепления анализировали электрофоретически.

Очистка [44 – 77] фрагмента PEDF

Очистку целевого пептида проводили с помощью анионообменной хроматографии на колонке колонку XK16/20 с 25 мл сорбента Q Sepharose XL. Колонку заранее уравнивали буфером 60. Реакционную смесь после завершения стадии расщепления титровали до рН 8.5 и загружали на колонку со скоростью 2 мл/мин, собирая фракцию проскока, содержащую целевой полипептид. Далее полученный белковый раствор подтитровывали до рН 4.3 и наносили на колонку XK16/20 с 25 мл катионообменного сорбента SP Sepharose XL, предварительно уравновешенную буфером 63. Элюцию целевого пептида проводили в градиенте от 0 до 1 М NaCl, создаваемом буферами 63 и 64. Последующую очистку PEDF осуществляли с помощью ОФ ВЭЖХ на хроматографической колонке Диасорб 130 С16Т (250×16 мм, Элсико). Элюцию белка осуществляли в градиенте раствора 80 %-ного ацетонитрила (5 – 53 %) с 0.1% ТФУ в течение 60 мин при скорости 3 мл/мин. Фракции, содержащие целевой белок с чистотой 98%, объединяли и лиофильно высушивали.

Схема II

Были полностью повторены стадии разрушения клеточной биомассы, отмывки тел включения и ренатурации гибридного белка из схемы I. Автокаталитическое расщепление гибридного белка индуцировали снижением рН до 6.5 и проводили в течение 16 ч при 23 °С. Последующую очистку [44 – 77] фрагмента PEDF модифицировали. После завершения стадии расщепления белковый раствор титровали до значения рН 4.3 и центрифугировали для отделения белкового осадка. Далее полученный белковый раствор подтитровывали до рН 4.3 и наносили на колонку XK16/20 с 25 мл катионообменного сорбента MacroPrep High S, предварительно уравновешенную буфером 63. Элюцию целевого пептида проводили ступенчатым градиентом, создаваемом буферами 65 и 66: в градиенте рН от 4.5 до 7.5 и от 0 до 100 мМ NaCl элюировались примесные белки, а целевой пептид элюировали ступенью 500 мМ NaCl. Последующую очистку PEDF осуществляли в соответствии со схемой I.

Масштабирование стадии культивирования штамма-продуцента E. coli BL21(DE3)/pERIG-PEDF

Осуществлен переход от культивирования в качалочных колбах до ферментации в полупромышленном ферментере Electrolux (Швеция) с объемом загрузки 50 л с соблюдением подобранных условий. Культивирование проводили при 37°C и pH 7.0 (подтитровка аммиаком) при аэрации 20–40 л воздуха в минуту. Добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0.4 мМ через 3 часа после начала культивирования при $OD_{600} 3 \pm 0,2$, затем выращивали 4 ч при 37°C (на момент остановки $OD_{600} = 13 \pm 1$). Клетки отделяли центрифугированием на проточной центрифуге СЕРА 61 G (Германия) (14–16 тыс. об/мин, скорость подачи 3–4 л/мин). Отделение клеточной биомассы осуществляли с помощью проточного сепаратора СЕРА 61 G (Германия) при 14–16 тыс. об/мин и скорости подачи суспензии 3–4 л/мин. Съем клеточной биомассы составил 16.6 ± 1.0 г с литра культуры.

Масштабирование технологии выделения и очистки [44 – 77] фрагмента PEDF

Разрушение 200 г биомассы проводили на проточном ультразвуковом дезинтеграторе в буфере 57. Полученные тела включения отмывали последовательно в растворах 58 – 60 и солюбилизировали в буфере 61. Спустя 4 ч инкубации при 23 °С отделяли супернатант, содержащий гибридный белок, и разбавляли его в 20 раз в буферном растворе 60. После 1 ч перемешивания снижают pH с помощью раствора 1% соляной кислоты до значения 6.5. Расщепление проводят в объеме 19 л в течение 66 часов при 25°C. После чего снижают значение pH до 4.0 для осаждения балластных белков и центрифугируют раствор с помощью центрифуги с проточным ротором. Очистку с помощью катионообменной хроматографии проводили на колонне XK 50/60 с 800 мл сорбента MacroPrep High S, уравновешенной раствором 63. Элюцию целевого пептида осуществляли ступенчатым градиентом, создаваемым буферами 65 и 66: при 100 мМ NaCl элюировались примесные белки, а целевой пептид элюировали 500 мМ NaCl. Последующую очистку PEDF осуществляли с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонне Kromasil 300-10-C18 (Knauer, Германия) в градиенте концентрации ацетонитрила от 10 до 80% с 0.1% ТФУ со скоростью 30 мл/мин. Фракции, которые содержали целевой продукт с хроматографической чистотой более 98%, объединяли. Для удаления ацетонитрила ввели стадию гель-фильтрационной хроматографии на колонке BPG 200/500 с 7 л сорбента Biogel P2, уравновешенную раствором 51. Полученный белковый раствор лиофильно высушивали.

6.14. Получение оксинтомодулина

Создание экспрессионного вектора, содержащего ген оксинтомодулина, и штамма-продуцента

Искусственный ген оксинтомодулина синтезировали из перекрывающихся олигонуклеотидов Ох-1 – Ох-9, используя для амплификации праймеры Ох-int и Ох-ter по методике, описанной для фрагмента [L69К–95] тумстатина в п.6.6 раздела Материалы и методы:

Ох-1	5'-CATTCTCAGGGCACGTTTACCAGCGATTATAGC-3'
Ох-2	5'-AAATACCTGGACTCTCGTCGCGCGCAGGAT-3'
Ох-3	5'-TTAGGTGTTTCATCAGCCACTGCACGAAATCCTGCGCGCG-3'
Ох-4	5'-ACGAGAGTCCAGGTATTTGCTATAATCGCTGG-3'
Ох-5	5'-TAAACGTGCCCTGAGAATGGTTGTGTACAATGATG-3'
Ох-6	5'-TTCGTGCAGTGGCTGATGAACACCAAAC-3'
Ох-7	5'-GCAACAAAAACAACATTGCGTAA-3'
Ох-8	5'-GTTGTTTTTGTGTCGTTTTGGTGTTCATC-3'
Ох-9	5'-AGCCCACTGCACGAAATCCTGCGCGCG-3'
Ох-int	5'-GGTGGTTGCTCTTCCAACCATTCTCAGGGCACG-3'
Ох-ter	5'-GGTGGTGGATCCCGTAACGCAATGTTGTTTTT-3'

Полученный ПЦР фрагмент клонировали в экспрессионную плазмиду pTWIN1 по сайтам эндонуклеаз рестрикции SapI и BamHI. Полученным вектором pER-Ох_п трансформировали клетки штамма *E. coli* ER2566. Штамм-продуцент *E. coli* ER2566/pER-Ох_п культивировали в среде LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина при 37°C до оптической плотности культуры OD₆₀₀ = 0.6, затем вносили ИПТГ до конечной концентрации 0.2 мМ и выращивали 5 ч при 37 °С. Клеточную биомассу отделяли центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин при 4°C. Съем биомассы составил 2.7 г с литра клеточной культуры.

Разработка лабораторной методики выделения и очистки оксинтомодулина

Клеточную биомассу гомогенизировали в буфере 11 и затем разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора. Тела включения, содержащие гибридный белок, после центрифугирования в течение 45 мин при 14000 g, промывали в буферах 1 и 2 и растворяли в буфере 4. Полученный белковый раствор разбавляли в 20 раз в буфере 67 и после чего наносили на колонку с хитиновым сорбентом. Последующую выделение и очистку оксинтомодулина проводили на хитиновом сорбенте по методике, описанной в разделе 6.11 для пуротоксина-1. Единственным отличием было использование буфера 68 для индукции расщепления. Поскольку эффективность расщепления была недостаточной, то от использования хитинового сорбента отказались и проводили расщепление в растворе. Для чего оценивали электрофоретически эффективность расщепления в диапазоне значений pH от 6.0 до 7.5 (с шагом 0.6).

При выделении расщепление проводили при рН 7.0. После завершения 24 ч инкубации при 25 °С инкубации белковый раствор наносили на колонку ХК 16/20 с 20 мл сорбента SP Sepharose HP и элюировали практически чистый оксинтомодулин линейным градиентом концентрации от 0 до 1 М NaCl, создаваемом буферами 69 и 70.

Далее белок очищали с помощью ОФ ВЭЖХ на колонке Диасорб-130-С16Т 7 мкм, 16x250 мм (Элсико) в градиенте 30 – 60% ацетонитрила с 0.1% ТФУ при скорости потока 4 мл/мин в течение 60 мин. Фракции, содержащие оксинтомодулин с чистотой более 98 %, объединяли и лиофильно высушивали.

Масштабирование стадии культивирования штамма-продуцента E. coli ER2566/pER-Oxm

Осуществлен переход от культивирования в качалочных колбах до ферментации в полупромышленном ферментере Electrolux (Швеция) с объемом загрузки 200 л с соблюдением подобранных условий. Культивирование проводили при 37 °С и рН 7.0 (подтитровка аммиаком) при аэрации 20–40 л воздуха в минуту. Добавляли ИПТГ (до конечной концентрации 0,4 мМ) через 3 часа после начала культивирования при оптической плотности культуры $4 \pm 0,2$, затем выращивали 5 ч при 37°С (на момент остановки $OD_{600} = 11 \pm 1$). Клетки отделяли центрифугированием на проточной центрифуге СЕРА 61 G (Германия) (14–16 тыс. об/мин, скорость подачи 3–4 л/мин). Отделение клеточной биомассы осуществляли с помощью проточного сепаратора СЕРА 61 G (Германия) при 14–16 тыс. об/мин и скорости подачи суспензии 3–4 л/мин. Съем клеточной биомассы составил 17.2 ± 1.0 г с литра культуры.

Масштабирование технологии выделения и очистки оксинтомодулина

Разрушение 300 г биомассы проводили на проточном ультразвуковом дезинтеграторе в буфере 11. Полученные тела включения отмывали последовательно в растворах 1 и 2 и солюбилизировали в буфере 4. Для ренатурации гибридного белка полученный белковый раствор разбавляли в 20 раз в буферном растворе 68 и инкубировали 16 ч перемешивания при 4 °С. Далее раствор разбавляли в 2 раза буфером 68 с рН 5.0, нагретого предварительно до 47 °С и снижали рН с помощью раствора 1% соляной кислоты до значения 7.0. Расщепление проводили в объеме 14 л в течение 16 часов при 25°С. После чего снижали значение рН до 4.0 для осаждения балластных белков и центрифугировали раствор с помощью центрифуги с проточным ротором.

Очистку оксинтомодулина от продуктов расщепления гибридного белка, проводили с помощью катионообменной хроматографии на колонне ХК 50/60 с 800 мл сорбента SP Sepharose HP, уравновешенной раствором 69. Элюцию целевого пептида осуществляли в линейном градиенте концентрации от 0 до 1 М NaCl, создаваемом буферами 69 и 70. Последующую очистку оксинтомодулин осуществляли с помощью ОФ ВЭЖХ на колонне

PerfectSil 300 ODS C18. Скорость нанесения 30 мл/мин. Элюцию проводили в градиенте концентрации ацетонитрила от 10 до 80% с 0,1% ТФУ со скоростью 30 мл/мин. Фракции, которые содержали целевой продукт с хроматографической чистотой более 98%, объединяли. Для удаления ацетонитрила ввели стадию гель-фильтрационной хроматографии на колонке BPG 200/500 с 7 л сорбента Biogel P2, уравновешенную раствором 51. Полученный белковый раствор лиофильно высушивали.

6.15. Получение окситоцина

Создание штамма-продуцента E. coli ER2566/ pER-7Oхут

Синтезированные химико-ферментативным способом последовательности frag1 и frag2 были клонированы в промежуточный вектор pGEM-T Easy по сайту EcoRV:

frag1

5'-TCGCGAATGACATCATTGTACACAACCTGCTACATCCAGAAGCTGCCCGCTGGGCAAATGAAGAGCCATGGC
TCTTCATGTTATATTCAGAATTGTCCGTTAGGTAATGCTATATCCAGAAGCTGTCCGTTAGGCAAATAAGGATC
C-3'

frag 2

5'-GCTCTTCTAAATGCTACATCCAGAAGCTGCCCGCTGGGCAAATGTTATATTCAGAATTGTCCGTTAGGTA
TGCTATATCCAGAAGCTGTCCGTTAGGCAAATGCTACATCCAGAAGCTGCCCGCTGGGCAAATGTAGAAGAGC-3'

Далее эти фрагменты были последовательно переклонированы в вектор pTWIN1: первый frag1 фрагмент по сайтам NruI и BamHI, а второй фрагмент frag2 в полученную после первого клонирования плазмиду pTWIN-frag1 по двум сайтам SapI, расположенным внутри первого фрагмента. Полученной плазмидой pER-Oхут были трансформированы клетки *E. coli* ER2566, Выращивание штамма-продуцента *E. coli* ER2566/pER-7Oхут проводили в питательной среде YT содержащей 100 мкг/мл ампициллина, а индукцию биосинтеза проводили при OD₆₀₀ 0.8, в присутствии 0.4 mM ИПТГ в течение 4 ч при 37 °С. Клеточную биомассу отделяли центрифугированием при 5000 g, в течение 20 мин при 4 °С. Съем биомассы составил 3 г с литра клеточной культуры.

Разработка лабораторной методики выделения окситоцина

Клеточную биомассу гомогенизировали в буфере 71, разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора (20с разрушение/20с охлаждение, 20 циклов) и центрифугировали при 15000 g в течение 20 мин для осаждения тел включения, содержащих целевой белок. Проводили отмывку тел включения в том же буфере. Было разработано 3 схемы последующего получения окситоцина.

Схема I. Расщепление гибридного белка на хитиновом сорбенте

Осадок тел включения (1 г) солюбилизировали в 10 мл буфера 72 и отделяли нерастворимый дебрис центрифугированием при 15000 g в течение 20 мин. 10 мл полученного

белкового раствора с концентрацией около 15 мг/мл вносили по каплям при перемешивании при 6 °С в 200 мл буфера 71 и инкубировали в течение 4 ч. Затем наносили на колонку с хитиновым сорбентом, уравновешенным буфером 73. Колонку промывали последовательно 5 CV буфера 73 и буфера 74 для удаления несвязанных белков, а после 3 CV буфера 75 для индукции расщепления и инкубировали 12 ч при 30 °С.

Схема II. Расщепление гибридного белка в растворе

Проводили экстракцию 1 г тел включения, как описано выше. 10 мл полученного раствора добавляли по каплям при перемешивании при 6 °С в 200 мл буфера 71 и инкубировали в течение 4 ч. Затем снижали рН до значения 7.0 для индукции расщепления и инкубировали 12 ч при 30 °С.

Схема III.

200 мг тел включения солубилизировали в 5 мл буфера 76 при комнатной температуре в течение 4 ч и центрифугировали при 15000 g в течение 20 мин. 5 мл полученного супернатанта вносили по каплям в 100 мл буфера 32 при перемешивании при 6 °С. Затем раствор наносили на колонку с 10 мл хитинового сорбента, уравновешенного буфером 77 (10 мл). Колонку промывали последовательно 5 CV буфера 77 и буфера 78 для удаления несвязанных белков, а после 3 CV буфера 79 для индукции расщепления и инкубировали 36 ч при 30 °С. Несвязанный с сорбентом продукт автокаталитического расщепления – гептамер окситоциноиллизина элюировали 15 мл буфера 32.

К 5 мл объединенного элюата с концентрацией гептамера окситоциноиллизина 0.8 мг/мл добавляли трипсин в соотношении 1:30 (трипсин/пептид). Реакционную смесь инкубировали 5 ч при 37 °С. Затем реакционную смесь лиофильно высушивали и лиофилизат растворяли в 40 мл буфера 80, содержащего 2 mM цистеина. Смесь инкубировали в течение 5 ч при 60 °С при перемешивании. Эффективность ренатурации оценивали с помощью аналитической ОФ ВЭЖХ и масс-спектрометрически. Далее проводили протеолиз с помощью карбоксипептидазой В до образования окситоциновой кислоты и путем химических превращений через метиловый эфир окситоциновой кислоты получали амид окситоциновой кислоты, представляющий собой целевой продукт окситоцин. Окончательная очистка окситоцина проводилась с помощью ОФ ВЭЖХ на колонке Perfect Sil 300 C18 в градиенте от 10 до 60 % ацетонитрила с 0.1 % ТФУ. Полученный белковый раствор лиофильно высушивали.

6.16. Получение [1-49] фрагмента эндостатина

Создание штамма-продуцента E. coli ER2566/pER-Endo

Синтез искусственного гена [1-49] фрагмента эндостатина осуществляли химико-ферментативным способом из перекрывающихся олигонуклеотидов Endo-1 – Endo-10 по

методике, описанной для фрагмента [L69K–95] тумстатина в п.6.6 раздела Материалы и методы:

Endo-1	5'-CATTCTCACCGTGATTTTCAGCCGGTTCTGCATC-3'
Endo-2	5'-TGGTTGCGCTGAACTCTCCGCTGTCTGGCG-3'
Endo-3	5'-GTATGCGTGGCATTTCGTGGCGCGGATTTTC-3'
Endo-4	5'-AGTGCTTTCAGCAAGCGCGTGCCGTTG-3'
Endo-5	5'-GCCTGGCGGGCACCTTTCGTGCGTTT-3'
Endo-6	5'-CGGCTGAAAATCACGGTGAGAATG-3'
Endo-7	5'-GTTTCAGCGCAACCAGATGCAGAAC-3'
Endo-8	5'-CGAATGCCACGCATACCGCCAGACAGCGGAGA-3'
Endo-9	5'-CGCGCTTGCTGAAAGCACTGAAAATCCGCGCCA-3'
Endo-10	5'-AAACGCACGAAAGGTGCCCGCCAGGCCAACGGCA-3'

С помощью ПЦР с праймерами Endo-Pr (5'-GGTGGTGTCTCTTCCAACCATTTCTCACCGTGATTTTC-3') и Endo-Ter (5'-GGTGGTGGATCCTTAAAACGCACGAAAGGTGCC-3') ген [1-49] эндостатина был амплифицирован, а затем клонирован в плазмидный вектор pGEM-5Zf(-) по сайту рестрикции *EcoRV*. В дальнейшем клонировали ген в вектор pTWIN1 и получили экспрессионную плазмиду pER-Endo.

Плазмидой pER-Endo были трансформированы клетки штамма *E. coli* ER2566. Полученный штамм-продуцент *E. coli* ER2566/pTWIN-Endo культивировали в питательной среде LB в течение 4 ч при 37 °С после внесения ИПТГ до конечной концентрации 0.4 мМ при достижении $OD_{600} = 0.8 - 0.9$.

Расщепление гибридного белка SspDnaB-Endo и выделение эндостатина.

Схема выделения и очистки [1-49]-фрагмента эндостатина практически полностью повторила лабораторную методику, разработанную для пигастина, представленную в разделе 6.13. Единственным отличием является проведение расщепления путем разбавления в буфере 81 при pH 6.5 в течение 12 ч при 25 °С.

6.17. Получение эпидермального фактора роста человека

Создание штамма-продуцента E. coli ER2566/pER-hEGF

Ген, кодирующий hEGF, был получен химико-ферментативным способом и клонирован в вектор pTWIN1 по сайтам узнавания рестриктаз *SapI* и *BamHI*. Полученным вектором pER-hEGF были трансформированы клетки штамма *E. coli* ER2566. Штамм продуцент гибридного белка *DnaB-hEGF E. coli* ER2566/pER-hEGF культивировали в питательной среде LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, при 37 °С, вносили ИПТГ до концентрации 0.2 мМ при $OD_{600} = 0.8$ и продолжали выращивание в течение 4 ч при 37 °С. Клетки отделяли

центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин при 4 °С). Съем клеточной биомассы составил 3 г с литра клеточной культуры.

Разработка лабораторной схемы выделения и очистки hEGF

Клеточную биомассу гомогенизировали в буфере 82, разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора и центрифугировали для отделения тел включения, содержащих целевой гибридный белок, при 15000 g в течение 20 мин. Осадок тел включения трижды промывали в буфере 83 и солубилизировали в буфере 84 в соотношении 1 : 20 (w/v). Полученный белковый раствор имел концентрацию около 10 мг/мл. Было разработано несколько схем выделения и очистки hEGF.

Схема I

10 мл раствора солубилизированных тел включения добавляли по каплям при перемешивании при 6°C к 190 мл буфера 85 и инкубировали в течение 3 ч. Затем раствор наносили на колонку с 15 мл хитинового сорбента, уравновешенного буфером 86. Несвязанные белки отмывали последовательно 5 CV буфера 86. Автокаталитическое расщепление индуцировали уравновешиванием колонки 3 CV буфера 87 с pH до 6.5. Сорбент инкубировали 24 ч при 23 °С. Восстановленный hEGF элюировали двумя CV буфера 87. Получили 30 мл раствора с концентрацией белка 0.5 мг/мл.

Проводили перебуферивание элюата (порциями по 3 мл) на гель-фильтрационной колонке PD10 (GE Healthcare), уравновешенной буфером 88. Фракцию, содержащую целевой пептид, инкубировали в течение 48 ч при 14 °С. Эффективность ренатурации hEGF анализировали с помощью ВЭЖХ и MALDI-масс-спектрометрии.

Схема Ia

Второй вариант схемы I практически полностью повторила предыдущую за исключением того, что для индукции расщепления колонку с хитиновым сорбентом с адсорбированным гибридным белком уравновешивали буфером 88. После завершения стадии расщепления элюировали целевой пептид буфером 88. Поскольку элюат содержал как нативный hEGF, так и форму с неправильно-замкнутыми мостами, то проводили ренатурацию по схеме I, предварительно восстановив дисульфидные мосты hEGF в присутствии 10 mM MESNA в течение 1 ч при 37 °С.

Схема II

В отличие от предыдущих вариантов в этом случае после разбавления раствора солубилизированных тел включения проводили длительную 48 ч инкубацию при перемешивании при 4 °С. После чего уже снижали pH до 8.5 и наносили на колонку с 15 мл

хитинового сорбента, уравновешенного буфером 86. Несвязанные белки отмывали последовательно 5 CV буфера 86. Автокаталитическое расщепление индуцировали уравновешиванием колонки 3 CV буфера 88 с рН до 6.5. Сорбент инкубировали 24 ч при 23 °С. Полностью ренатурированный hEGF элюировали двумя CV буфера 87. Получали 30 мл элюата с концентрацией 0.7 мг/мл. Окончательную очистку проводили с помощью ОФ ВЭЖХ Perfect Sil 300 C18 в градиенте от 10 до 60 % ацетонитрила с 0.1 % ТФУ. Полученный белковый раствор лиофильно высушивали.

6.18. Разработка биотехнологии получения рекомбинантных тимозина $\alpha 1$ и тимозина $\beta 4$ с ацелированием *in vivo*

Создание полицистронных векторов pER-Tb4GyrA-AcAla и pER-Tb4GyrA-AcSer и штаммов-продуцентов

Гены тимозина $\alpha 1$ и $\beta 4$ были амплифицированы на матрице вектора pER-TEVrsThym и pER-TEVrsTB4 с использованием синтетических праймеров. Полученные ПЦР фрагменты и вектор pTWIN1 были обработаны эндонуклеазами рестрикции NdeI и SapI и лигированы между собой.

Из синтетических праймеров RBS-1 и RBS-2 был собран фрагмент ДНК, содержащий изменённую последовательность Шайна-Дальгарно, фланкированную сайтами узнавания рестриктаз PstI и BamHI для последующего клонирования в векторы pER-Ta1GyrA и pER-TB4GyrA. В созданные таким образом плазмиды pER-Ta1GyrA-RBS и pER-TB4GyrA-RBS были клонированы по сайтам NcoI и XhoI гены сериновой и аланиновой ацетилтрансфераз, полученные ПЦР на матрице геномной ДНК *E.coli* с парами праймеров SerAcTr-seF/ SerAcTr-seR и AlaAcTr-se-F/AlaAcTr-se-R, соответственно.

Созданными плазмидами pER-Ta1GyrA-AcAla, pER-Ta1GyrA-AcSer, pER-Tb4GyrA-AcAla и pER-Tb4GyrA-AcSer были трансформированы клетки штаммов *E. coli* ER2566 и C3030. Провели культивирование созданных штаммов-продуцентов в двух разных питательных средах LB (штамм ER2566) и SOB (C3030), содержащих 100 мкг/мл ампициллин. Индукцию белкового биосинтеза проводили внесением ИПТГ до концентрации 0.4 мМ при OD₆₀₀ = 1. Дальнейшее культивирование проводили при следующих условиях: 20 ч при 17 °С, 8 ч при 30 °С и 4 ч при 37 °С. В ходе культивирования отбирались аликвоты клеточной культуры объемом 5 мл для электрофоретического анализа содержания гибридного белка и ацетилтрансферазы, а также оценки эффективности ацелирования *in vivo*.

Отобранные аликвоты центрифугировали при 4000 g в течение 30 мин при 10 °С для осаждения клеточной биомассы. Культуральную жидкость декантировали, биомассу гомогенизировали в буфере 89 в соотношении 1 : 10 (w/v) и разрушали с помощью

ультразвукового дезинтегратора. Осветлённый клеточный лизат отделяли от нерастворимого дебриса центрифугированием при 12000 g в течение 20 мин при 10 °С.

Полученный белковый раствор наносили на колонку с 1 мл хитинового сорбента, уравновешенный буфером 90. Затем колонку поочередно промывали 2 CV буфера 90, 2 CV буфера 91 и 4 CV буфера 92 и оставляли инкубироваться в течение 8 ч при 25 °С. После чего целевой белок элюировали 2 CV буфера 90. К элюату добавляли раствор 5М NaOH до значения рН 10 и инкубировали в течение 24 часов при 25 °С. С помощью хромато-масс-спектрометрического метода анализа определяли наличие в полученном элюате дезацетилированных и ацетилированных форм тимозинов $\alpha 1$ и $\beta 4$.

Культивирование штаммов-продуцентов E.coli C3030/pER-Ta1GyrA-AcSer и C3030/pER-Tb4GyrA-AcSer

Было проведено экспериментальное культивирование штаммов-продуцентов для определения оптимального времени культивирования по методике, описанной выше. После внесения индуктора выращивание продолжали при 37 °С в течение 28 ч. При этом оценивали степень ацетилирования целевых пептидов *in vivo* по методике, описанной выше. В дальнейшем было проведено культивирование штаммов при подобранных условиях (20 ч при 37 °С) в объемах, достаточных для экспериментальной наработки тимозинов $\alpha 1$ и $\beta 4$.

Выделение тимозинов $\alpha 1$ и $\beta 4$

Выделение и расщепление гибридных белков, содержащих тимозины $\alpha 1$ и $\beta 4$, проводили по схеме, как описано выше. После завершения инкубации при рН 10.0 белковый раствор титровали до значения рН 3.0 и наносили на ОФ ВЭЖХ колонку Диасорб 130 С16Т 16x250 мм (Элсико). Разделение проводили в линейном градиенте ацетонитрила (0–30% за 50 мин) с 0.1% ТФУ со скоростью 3 мл/мин. Фракции, содержащие целевой пептид с хроматографической чистотой более 98%, объединяли и лиофильно высушивали. Проводили протеолитический анализ последовательности тимозинов $\alpha 1$ и $\beta 4$ с помощью Asp-N протеиназой из *Pseudomonas fragi*.

6.19. Сиалирование дезацетилтимозина $\beta 4$ и оксинтомодулина

Разработка методики сиалирования дезацетилтимозина $\beta 4$

Пробные реакции ставили при разных условиях: по 1 мг рекомбинантного дезацетилтимозина бета 4 растворяли в 1 мл буферного раствора 93, содержащего ацетонитрил в концентрациях от 0 до 30 % и имеющего рН 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, добавляли 8 мг цианборгидрида натрия и от 2.8 до 28 мг (с шагом в 2,8 мг) бутиральдегидного производного полисиаловой

кислоты (до мольного соотношения белок : ПСК от 1 : 2 до 1 : 10). Реакционную смесь инкубировали при 25 °С при тщательном перемешивании в течение 5 ч. Образование конъюгата полисиаловой кислоты с Тβ4 анализировали с использованием методов ОФ ВЭЖХ и SDS-электрофореза в 15%-ном ПААГ.

Масштабирование реакции сиалирования дезацетилтимозина β4

В 10 мл буферного раствора 93 с рН 4.5, содержащего 30% ацетонитрила, растворяли рекомбинантный дезацетилтимозин бета 4 до конечной концентрации 1 мг/мл, добавляли 80 мг цианборгидрида натрия и 140 мг бутиральдегидного производного полисиаловой кислоты (до мольного соотношения 1:5). Реакционную смесь тщательно перемешивали и инкубировали в течение 3 ч при 25°С. Контроль образования моносиалированного Тβ4 осуществляли с использованием метода ОФ ВЭЖХ.

Очистка моносиалированного Тβ4

Реакционную смесь объемом 10 мл разбавляли дистиллированной водой в 10 раз и наносили на колонну Диасорб 130 С16Т, 8 мкм, 15 × 250 мм (Элсико). Разделение проводили в градиенте смеси 80%-ного ацетонитрила (8–23% за 60 мин) с 1% NH₄OAc со скоростью 3,5 мл/мин. Фракции, содержащие моносиалированный Тβ4 с чистотой более 98 %, объединяли и лиофильно высушивали.

Разработка методики сиалирования оксинтомодулина

Была проведена серия экспериментов по подбору условий для сиалирования оксинтомодулина, выделение и очистка которого описаны в пункте 6.14. Субстанцию очищенного оксинтомодулина растворяли в растворах 94 – 96 в соотношении 1 мг в 520 мкл буфера (до конечной концентрации 1.92 мг/мл). Реакционные смеси содержали оксинтомодулин в концентрации 1 мг/мл, ПСК в 10х мольном избытке и 5 мг/мл натрий цианборгидрида NaCNBH₃. Реакцию проводили при 37 °С в течение 4 ч. Анализировали выход моносиалированного производного с помощью ОФ ВЭЖХ анализа.

При оптимизации постановки реакции изменили мольное соотношение ПСК : пептид с 10:1 на 2:1. Постановку реакции разделили на 2 стадии. Изначально реакционная смесь содержала ПСК и пептид в эквимольном соотношении в буфере 96 или 95 и 2,5 мг/мл NaCNBH₃. Через 2 ч инкубации при 37 °С добавляли вторую порцию ПСК и NaCNBH₃ до конечной концентрации 5 мг/мл. Кроме того, оценили влияние внесения в реакционную смесь ацетонитрила до конечной концентрации 30 % на выход моносиалированного производного.

Масштабирование реакции моносиалирования оксинтомодулина

К элюату после ОФ ВЭЖХ при перемешивании вносили навеску ПСК в мольном соотношении 1 : 1. Через 10 мин инкубации при 37 °С вносили навеску NaCNBH₃ до конечной концентрации 2.5 мг/мл. Через 2 ч инкубации при 37 °С добавляли новую порцию ПСК мольном соотношении 1 : 1 и через 10 мин навеску NaCNBH₃ до конечной суммарной концентрации 5 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали 4 ч при 37 °С. Затем реакционную смесь разбавляли в 2 раза раствором 0.1% ТФУ и наносили на колонку Диасорб 130 С16Т (Элсико). Хроматографическое разделение проводили в градиенте ацетонитрила 10 – 80% с 0.1 % ТФУ со скоростью 3 мл/мин. Очищенный таким образом моно ПСК-Охт наносили на колонку ХК 16/60 Superdex 30 prep grade, уравновешенную буфером 21, и проводили гель-фильтрацию. Полученный элюат лиофильно высушивали.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основным направлением биотехнологического получения рекомбинантных пептидов с массой 3-10 кДа является биосинтез гибридного белка, состоящего из целевого пептида и различных вспомогательных пептидных последовательностей, расщепление гибридного белка по специфическим сайтам и выделение целевого продукта. Важным ограничением для биотехнологических способов получения пептидов медицинского назначения является требование строгого соблюдения неизменности структуры получаемого продукта. Любые модификации целевого пептида, облегчающие его получение (добавление лидерного пептида, tag-последовательностей или замена какой-либо аминокислоты в конечном продукте) являются абсолютно недопустимыми. Любое изменение первичной структуры целевого пептида требует серьезных дополнительных исследований влияния этих изменений на биологическую активность конечного продукта. Это обстоятельство существенно сокращает выбор подходящих биотехнологических методов. Анализ возможных вариантов белковой инженерии, приведенный в обзоре литературы, показал, что наиболее употребляемой в этом направлении можно считать системы на основе гибридных генов, кодирующих слитые белки, в которых между целевым продуктом и белком-носителем встроены сайты для расщепления специфическими протеазами и интеиновые системы, содержащими элементы белкового сплайсинга. Эти два технологических решения являются неальтернативными, а скорее взаимодополняющими. Например, гибридный белок целевого пептида и тиоредоксина будет эффективно расщепляться высокоспецифичной TEV протеазой по сайту Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Ser (ENLYFQ^S), где сериновый аминокислотный остаток является N-концевым у целевого пептида. Для интеиновой системы N-концевой серин (а также Cys и Asp) целевого пептида является весьма нежелательным, т.к. такой гибридный белок начинает саморасщепление сразу в процессе бактериального биосинтеза белка, что приводит к значительным неоправданным потерям и снижению конечного выхода. Кроме того, несмотря на принципиальную универсальность интеинового подхода, эффективность расщепления гибридного белка с образованием целевого пептида в этой системе очень сильно зависит от первичной структуры экстеинового фрагмента. К сожалению, знание первичной структуры гибридного белка не позволяет без экспериментальной проверки делать однозначное заключение о возможной эффективности интеинового подхода для получения конкретного пептида. В настоящей работе для создания технологии получения биологически активных полипептидов медицинского назначения были использованы оба вышеперечисленных подхода.

1. Разработка методологических подходов получения рекомбинантных полипептидов посредством интеиновых технологий

1.1. Разработка экспрессионной системы на основе интеинов для получения полипептидов с N-концевым серином на примере тимозина- α_1 человека

Одним из основных недостатков интеиновых систем является высокая вероятность преждевременного автокаталитического расщепления (сплайсинга), если первая аминокислота целевого белка серин или цистеин. Поэтому первым этапом работы в этом направлении была попытка изменения протокола использования интеиновой системы IMPACT-CN, в которой роль белка-носителя выполняет интеин VMA из *Saccharomyces cerevisiae*. Целевым пептидом с N-концевым серином стал тимозин- α_1 человека. Тимозин- α_1 (T α_1), представляющий собой сравнительно короткий 28-членный полипептид (Рис. 27), осуществляет модуляцию иммунной системы и стимулирует дифференциацию и активацию Т-клеток. Идея по изменению протокола заключалась в разработке цинк-зависимого способа остановки сплайсинга интеина SceVMA на стадии автокаталитического расщепления. Такой подход описан в работе Ghosh et al. 2001, где было показано влияние ионов цинка на процесс сплайсинга, приводящее к остановке стадии лигирования, но не влияющее на транс-расщепление [288]. Поскольку процесс белкового сплайсинга представляет собой каскад согласованных внутримолекулярных реакций, в ходе которых все перегруппировки происходят в пространстве с определенными скоростями, то изменение скорости одной из стадий может привести к разбалансировке всего процесса сплайсинга при сохранении способности к автокаталитическому расщеплению.

Ac-SDAAVDTSSSEITTKDLKEKKEVVEEAEN-OH

Рис. 27. Аминокислотная последовательность тимозина- α_1

Синтетический ген тимозина- α_1 был клонирован в экспрессионный вектор pTYB11 (New England Biolabs). При трансформации созданным вектором pERTHym1 клеток штамма *E.coli* ER2566 был получен штамм-продуцент *E.coli* ER2566/pERTHym1.

Исследование продуктов биосинтеза белка в ходе культивирования показало, что до 70% гибридного белка расщепляется *in vivo* (Рис. 28).

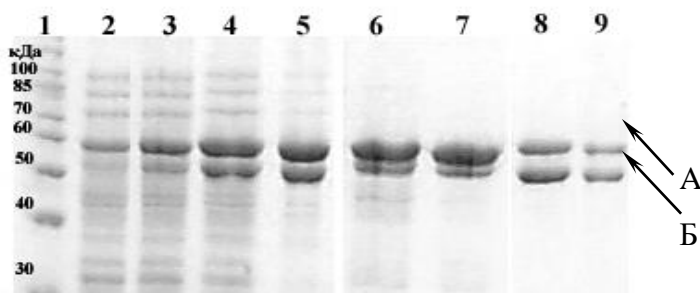


Рис. 28. Электрофоретический анализ биосинтеза гибридного белка в штамме *E. coli* ER2566/pERTHym1. 15%-ДСН-ПААГ.

А – гибридный белок *SceVMA-Tα1*; **Б** – интеин *SceVMA*,

1 – маркеры молекулярных масс.

2 – 4 - тотальные лизаты клеток при различных концентрациях в буфере $ZnCl_2$.

2 – в присутствии 10 мМ $ZnCl_2$. **3** – в

присутствии 1 - 3 мМ $ZnCl_2$. **4** – в отсутствие $ZnCl_2$. **5 – 6** – объединенный супернатант после дезинтеграции клеток в присутствии 1 – 3 мМ $ZnCl_2$ при различных условиях. **7 – 9** – продукты расщепления на колонке с хитиновым сорбентом при различных условиях.

Мы использовали способность ионов цинка ингибировать процесс сплайсинга и исследовали соотношения продуктов сплайсинга и расщепления в диапазоне концентраций от 1 до 10 мМ $ZnCl_2$ (Рис. 29).

Было исследовано ингибирующее влияние ионов цинка (в диапазоне концентраций от 1 до 10 мМ $ZnCl_2$) на процесс лигирования по соотношению продуктов расщепления и сплайсинга (Рис. 29). Оказалось, что оптимальной является концентрация 2 мМ, при которой образовывалось не более 35% продуктов расщепления гибридного белка. Дальнейшее увеличение концентрации хлорида цинка приводило к резкому снижению выхода биомассы и количества гибридного белка относительно общего белка клетки, а уменьшение концентрации – к значительному увеличению продуктов сплайсинга. Было проведено выделение дезацетилтимозина-α1 с помощью аффинной хроматографии на хитиновом сорбенте и ОФ ВЭЖХ. Выход составил около 3 мг полипептида с литра клеточной культуры. Этот результат является вполне удовлетворительным при лабораторной наработке целевого полипептида для научных целей, но не может быть использован при промышленном получении фармацевтических препаратов.

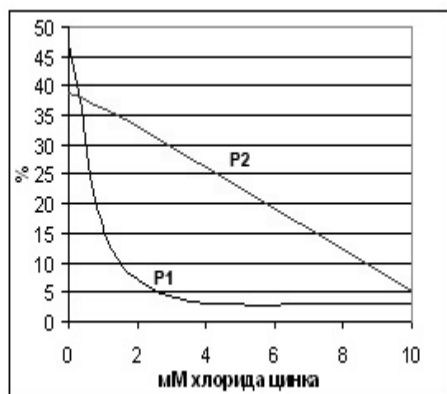


Рис. 29. Влияние концентрации $ZnCl_2$ на уровень биосинтеза гибридного белка и образование продуктов сплайсинга в процессе ферментации.

P1 – процентное отношение отщепленного интеина к исходному гибриднему белку.

P2 – процентное содержание гибридного белка относительно суммарного клеточного белка.

Следующим шагом было получение «мутантного» интеина *SceVma* с заменой Cys1 на Ala1. Мы предположили, что такая замена позволит полностью предотвратить или существенно снизить сплайсинг белка при сохранении способности к С-терминальному расщеплению. При

культивировании штамма-продуцента *E. coli* ER2566/pERTHym2 гибридный белок накапливался в растворимой форме без расщепления с высоким выходом. Однако и данная схема с использованием интеина Ala1 SceVma не оправдала наших ожиданий. Степень расщепления выделенного гибридного белка оказалась крайне низкой, и различные методические манипуляции (добавление тиол-содержащих соединений, повышение температуры) помогли увеличить выход реакции расщепления не более чем до 20 %.

Появление новой на тот момент экспрессионной системы IMPACT-TWIN (NEB) на основе мини-интеинов *SspDnaB*, *MthRIR1* и *MxeGyrA* имело целый ряд преимуществ по сравнению с IMPACT-CN. Во-первых, это значительно меньший размер интеинов (~30 кДа), во-вторых, мутация Cys1Ala в случае мини-интеина DnaB не влияла на отщепление С-концевого домена. При этом автокаталитическое отщепление С-концевого домена стало рН-зависимым. Плазмидой pERTHym3, полученной при клонировании гена тимозина- $\alpha 1$ в вектор pTWIN1, были трансформированы клетки штамма *E. coli* ER2566 и получен штамм *E. coli* ER2566/pERTHym3, продуцент гибридного белка DnaB-Ta1. При ферментации этого штамма гибридный белок синтезировался в растворимой форме, но претерпевал автокаталитическое расщепление. Оптимизация условий культивирования не дала положительного результата.

Потенциальными мишенями для предотвращения преждевременного расщепления гибридного белка являются аминокислотные остатки, участвующие в циклизации последней аминокислоты интеина, аспарагина. И, в первую очередь предпоследняя аминокислота интеина – гистидин. Нами был проведен сайт-направленный мутагенез с его заменой на глутамин. При культивировании созданного штамма-продуцента *E. coli* ER2566/pERTHym4 гибридный белок также синтезировался в растворимой форме, при этом не наблюдалось продуктов автокаталитического расщепления. Поскольку степень расщепления гибридного белка на хитиновом сорбенте не превышала 50 % после 48 ч инкубации, то разработали методику его расщепления в растворе. Гибридный белок, выделенный с помощью анионообменной хроматографии, расщепляли при рН 6.0 в присутствии 2мМ MESNA. Степень расщепления составляла в этом случае не менее 98 %. Очистку дезацетилтимозина $\alpha 1$ от примесных клеточных и остаточного белка проводили с помощью тангенциальной ультрафильтрации на мембране с размером пор 10 кДа и последующей ОФ ВЭЖХ. Полученный раствор лиофильно высушивали.

Сравнение эффективности биотехнологического получения тимозина- $\alpha 1$ показывает, что из использованных нами интеинов в генно-инженерных конструкциях наиболее перспективным является модифицированный мини-интеин *SspDnaB* с мутацией в предпоследнем положении His на Gln (Таблица 9).

Таблица 9. Сравнение продуктивности штаммов-продуцентов тимозина- α 1

Показатели	<i>E.coli</i> ER2566/ pERThym1	<i>E.coli</i> ER2566/ pERThym2	<i>E.coli</i> ER2566/ pERThym4
Отношение гибридного белка к суммарному количеству клеточных белков, %	30	30	45
Отношение продукта сплайсинга к гибриднему белку при культивировании продуцента, %	5	-	-
Эффективность автокаталитического расщепления, %	70	20	75
Выход тимозина- α 1 (% от теоретического)	30	5	40
Выход тимозина- α 1 (мг с л культуры)	3	0.5	11

Таким образом, созданная генно-инженерная конструкция, содержащая модифицированный мини-интеин *SspDnaB* с мутацией в предпоследнем положении His на Gln оказалась наиболее эффективной для получения дезацетилтимозина- α 1 за счет контроля тиол- и рН-зависимой циклизации аспарагинового остатка. Таким образом, была реализована концепция белкового сплайсинга в биотехнологическом получении пептидов с N-концевым сериновым остатком. Соответствующие результаты работы представлены в работе Есипов Р.С. и др. [190].

1.2. Разработка интеин-опосредованного подхода получения рекомбинантных полипептидов с большим содержанием цистеинов на примере рекомбинантного окситоцина

Окситоцин – 9ти членный пептид с массой 1008 Да, с одной дисульфидной связью и амидированным С-концевым остатком глицина (Рис. 30). Окситоцин является нейрогормоном пептидной природы, продуцируется нейросекреторными клетками гипоталамуса и обладает широким спектром биологического действия [289, 290].

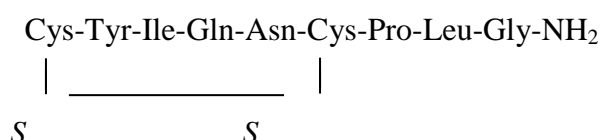


Рис. 30. Структура окситоцина человека.

Впервые окситоцин был химически синтезирован в начале 50-х годов XX-века [290] и в настоящее время основным способом его получения является химический синтез.

связывающего домена (CBD), интеина *SspDnaB* и семи тандемно повторяющихся последовательностей окситоциноил-лизина (Рис. 32).

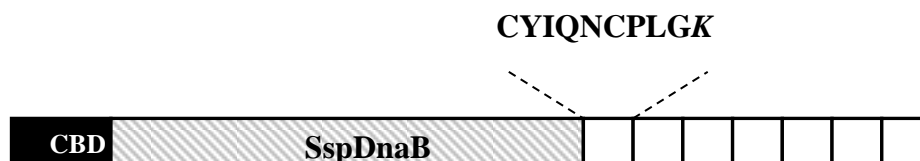


Рис. 32. Схематическое изображение гибридного белка Dna-7OXY.

Выделение и очистка окситоцина

В ходе культивирования штамма-продуцента гибридный белок Dna-7OXY, синтезирующийся в количестве не менее 40 % от суммарного клеточного белка, агрегировал в тела включения. Были предложены 3 схемы дальнейшего расщепления гибридного белка и выделения окситоцина.

Согласно схеме I проводили ренатурацию гибридного белка 20-ти кратным разбавлением и последующее расщепление гибридного белка на хитиновом сорбенте при pH 7.0 в присутствии 10 mM MESNA. Однако такой стандартный протокол не привел к положительным результатам из-за крайне низкого уровня автолиза (Рис. 33, дорожка 2).

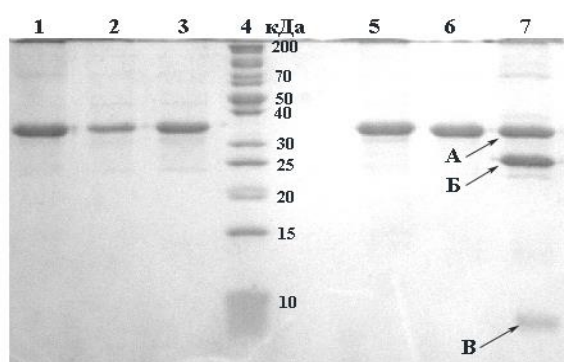


Рис. 33. Автокаталитическое расщепление ГБ DnaB-7OXY. Электрофореграмма в 15% ПААГ. А — гибридный белок DnaB-7OXY, Б — DnaB. В — гептамер окситоциноил-лизина; 1 — экстракт тел включения гибридного белка, 2 — продукты автокаталитического расщепления гибридного белка на хитиновом сорбенте 16 ч, 3 — продукты автокаталитического расщепления гибридного белка в растворе 16ч, 4 — стандарты молекулярных масс. 5 — экстракт тел включения гибридного белка полученный по совмещенной схеме, 6 — продукты автокаталитического расщепления сульфитированного гибридного белка 0 ч, 7 — продукты автокаталитического расщепления сульфитированного гибридного белка 16ч.

Попытки провести ренатурацию и расщепление гибридного белка в растворе по схеме II также не увенчались успехом из-за высокой степени агрегации белка (более 80 %) и низкой степени расщепления (не более 10 %) (Рис. 33, дорожка 3). По-видимому, множественное локализованное расположение цистеиновых остатков в гептамере не позволило подобрать условия, при которых гибридный белок оставался бы в растворе и происходила бы ренатурация интеина в составе гибридного белка. Увеличение концентрации детергентов и

восстанавливающих реагентов в растворе приводили с одной стороны к увеличению растворимости гибридного белка, а с другой к его неспособности к автокаталитическому расщеплению (Рис. 33, дорожка 5). При уменьшении концентрации детергента возрастала агрегация гибридного белка при слабой автокаталитической активности.

Проблема была решена с использованием реакции сульфитолиза, при которой происходит обратимая модификация SH-группы цистеина [292]. Такой подход позволяет солюбилизовать и стабилизировать гибридный белок, богатый цистеиновыми остатками. Поэтому стадия солюбилизации тел включения и стадия сульфитолиза гибридного белка DnaB-7OXY были объединены в одну. При pH 9.0 в присутствии сульфита натрия и тетрагидрата натрия в 8 М мочеvine происходило полное растворение гибридного белка и восстановление дисульфидных связей. Автокаталитическое расщепление было проведено на хитиновом сорбенте при 6.5 (Рис. 34). А увеличение времени инкубации на колонке до 36 часов позволило достичь 75-80 % расщепления гибридного белка (Рис. 34).

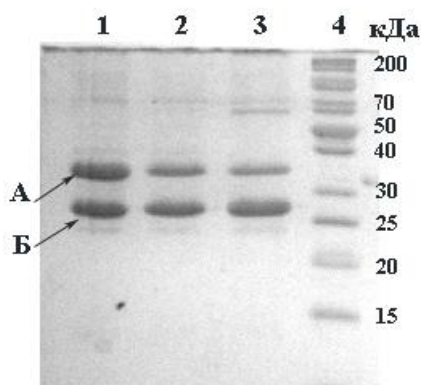


Рис. 34. Автокаталитическое расщепление ГБ DnaB-7OXY. Электрофореграмма в ПААГ в денатурирующих условиях; А — гибридный белок DnaB-7OXY, Б — DnaB. 1 — 12 ч, 2 — 24 ч, 3 — 36 ч, 4 — стандарты молекулярных масс.

Далее гептамер подвергали ферментативному гидролизу трипсином и полученные сульфитированные мономеры окситоциноил-лизина ренатурировали в присутствии 2 мМ цистеина (Рис. 35).

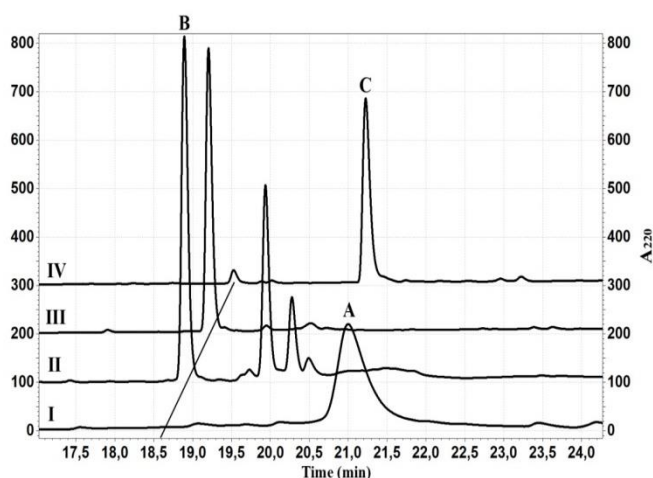


Рис. 35. ОФ ВЭЖХ анализ продуктов, получаемых на стадии ферментативного гидролиза гептамера и стадии ренатурации окситоциноиллизина. I - стадия трипсинолиза в 0 момент времени; II – через 2 часа; III – через 12 часов; IV – стадия ренатурации окситоциноиллизина через 12ч при 10⁰С. А – сульфитированный гептамер окситоциноиллизина, В – сульфитированный окситоциноиллизин, С – окситоциноиллизин.

Отщепление лизина проводили карбоксипептидазой В. Амидирование С-концевого глицина осуществлялось химически через стадию метилового эфира, как описано ранее [291]. Общая химико-ферментативная схема получения окситоцина представлена на Рис. 36.

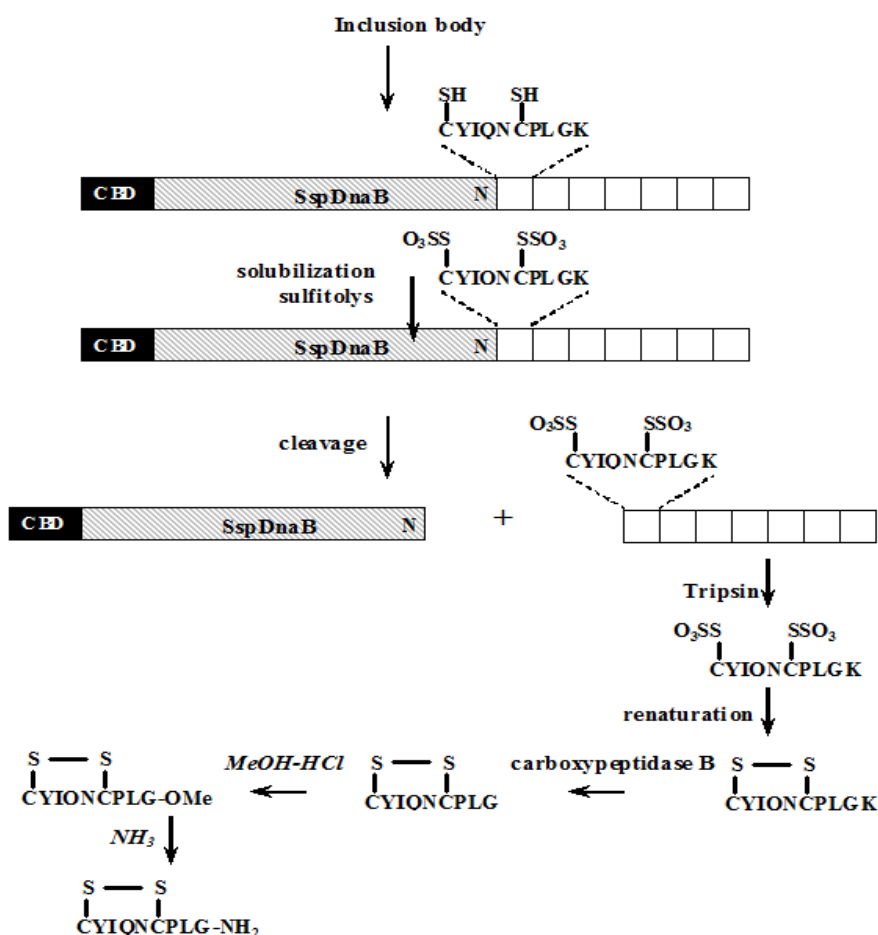


Рис. 36. Общая схема получения рекомбинантного окситоцина.

Окончательная очистка конечного продукта проводилась ОФ ВЭЖХ. Анализируя созданную биотехнологию получения окситоцина, следует признать, что ее экономическая эффективность явно недостаточна, чтобы конкурировать с химическим синтезом. Основным достижением этой разработки является демонстрация использования сульфитирования агрегированного гибридного белка на примере DnaB-7-OXY. На сегодняшний день это, по-видимому, единственный эффективный и плодотворный способ получения целевых продуктов, содержащих большое количество цистеинов, локализованных в довольно коротких пептидных цепях [291].

1.3. Разработка концепции сопряженного фолдинга интеинового домена и целевого пептида в составе гибридного белка на примере эпидермального фактора роста человека

Эпидермальный фактор роста человека (hEGF), или урогастрон, участвует физиологических процессов, связанных с эмбриональным ростом, регенерацией тканей,

регуляцией функционирования эндокринной системы, заживлением ран, секрецией желудочного сока [293]. hEGF является полипептидом, содержащим 53 аминокислотных остатка, соединенных тремя внутримолекулярными дисульфидными связями. Его структура опубликована группой Cohen в 1972 [294] (Рис. 37).

NSDSECPLSHDGYCLHEGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR
AATTCTGACTCTGAATGCCCATTTGTCTCACGACGGTTACTGCTTGCACGACGGTGTTT
GCATGTACATCGAAGCTCTGGACAAATACGCTTGCAACTGCGTTGTTGGTTACATCGG
TGAACGTTGCCAATACCGAGATCTGAAATGGTGGGAACTGCGT

Рис. 37. Аминокислотная последовательность hEGF и нуклеотидная последовательность синтетического гена, кодирующего hEGF.

Уникальные биологические функции hEGF сразу сделали его привлекательным объектом для исследований в таких областях медицины, как микрохирургия глаза, ожоговая терапия, лечение язв желудка, а также в качестве косметического средства. Однако низкое содержание hEGF в природных источниках делают его практически недоступным для широкого применения в медицине. Поэтому были предприняты многочисленные попытки биотехнологического получения рекомбинантного hEGF. Так, были разработаны методы получения hEGF в периплазме *E. coli*, [295 - 297], с использованием секреции в культуральную среду *Brevibacillus choshinensis* при совместной продукции с тиоредоксином [298], секреции hEGF в культуральную среду из дрожжей *Hansenula polymorpha* – в гибридной конструкции с лидером препро-альфа фактора [299]. В этих способах hEGF получали секрецией в культуральную среду или периплазматическое пространство клетки.

Мы разработали принципиально иной подход с использованием интеин-опосредованной технологии, который позволил не только реализовать возможность ренатурации hEGF, имеющего три дисульфидные связи в составе гибридного белка с интеином, но и, в целом, оценить эффективность такого подхода для получения цистеин-содержащих пептидов.

Для реализации нашего подхода при конструировании гибридного белка в качестве белка-носителя был использован модифицированный мини-интеин *SspDnaB* с N-концевым хитин-связывающим доменом. Данная конструкция аналогична созданной нами ранее для получения рекомбинантного тимозина- $\alpha 1$.

При конструировании экспрессионной плазмиды искусственный ген hEGF, нуклеотидная последовательность которого приведена на рис 37, амплифицировали и клонировали в экспрессионную плазмиду pTWIN1 по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции SapI и BamHI.

В результате были созданы плазида pER-hEGF и штамм-продуцент *E. coli* ER2566/pER-hEGF, при культивировании которого синтезируется гибридный белок DnaB-hEGF,

содержащий на N-конце модифицированный интеин DnaB и хитин-связывающий домен, а на C-конце - hEGF. При культивировании созданного штамма-продуцента большая часть белка агрегировала в виде тел включения (Рис. 38).

Обычно при экспрессии чужеродных генов в интеиновых системах стараются получать белок в растворимой форме, поскольку в этом случае процесс расщепления и рефолдинга происходит достаточно быстро и не требует больших усилий. В случае с гибридным белком DnaB-hEGF наличие 3 дисульфидных связей в молекуле hEGF, и двух неспаренных Cys в интеиновой части приводит к образованию стабильных агрегатов гибридного белка в виде тел включений. Поэтому необходимо подобрать условия, при которых цистеин-содержащий целевой полипептид правильно сворачивается в составе гибридного белка и при этом не оказывает влияния на реакцию саморасщепления. Процесс правильного сворачивания полипептида достаточно сложен и зависит от многих факторов: соотношения денатурирующего и тиольного реагентов, концентрации белка в растворе, температуры, времени и т.п.

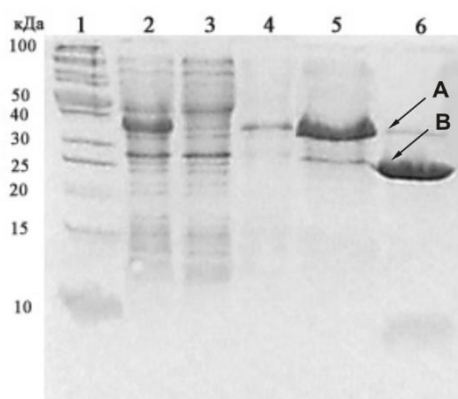


Рис. 38. Электрофоретический анализ накопления гибридного белка DnaB-hEGF при культивировании штамма-продуцента *E. coli* ER2566/pER-hEGF и его расщепление. 1 – стандарты молекулярных масс 10-100 кДа. 2 – Клеточный лизат. 3 - Супернатант после отделения телец включения. 4 – Фракция проскока при сорбции гибридного белка на хитиновом сорбенте. 5 - Гибридный белок, сорбированный на хитиновом сорбенте, до индукции расщепления. 6 - Продукты расщепления гибридного белка. А - гибридный белок DnaB-hEGF. В - интеин *SspDnaB*.

Нами были разработаны две схемы получения целевого продукта, приведенные на Рис. 39. Начальной стадией обеих схем было разрушение клеточной биомассы, отмывка тел включения от небелковых примесей и их солюбилизация в буфере с 6 М мочевиной в присутствии 50 мМ MESNA (Рис. 39. I). Принципиальное отличие между этими двумя схемами заключается в различной очередности процедур ренатурации гибридного белка и его автокаталитического расщепления. Так по первой схеме восстановленный гибридный белок сначала сорбируют на аффинную колонку, индуцируют автокаталитическое расщепление, а затем проводят элюцию целевого hEGF и его ренатурацию в растворе с образованием дисульфидных связей. По второй схеме автокаталитическому расщеплению гибридного белка на хитиновом сорбенте предшествует ренатурация hEGF с образованием нативных дисульфидных связей в составе гибридного белка в растворе.

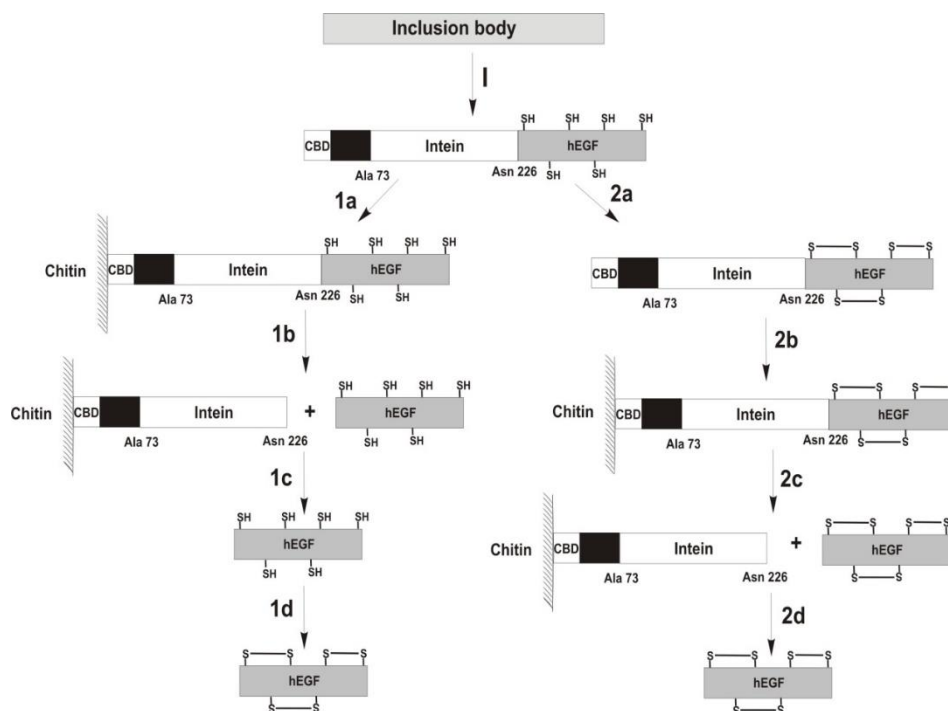


Рис. 39. Схемы выделения и очистки hEGF. I – стадия солюбилизации гибридного белка. 1a – стадия аффинной сорбции на хитиновом сорбенте. 1b – стадия расщепления на хитиновом сорбенте. 1c – стадия элюции hEGF с восстановленными дисульфидными мостами. 1d – стадия ренатурации hEGF и образования нативных дисульфидных связей; 2a – стадия ренатурации гибридного белка с образованием правильных дисульфидных связей hEGF в растворе. 2b – стадия сорбции на хитиновый сорбент. 2c – стадия расщепления гибридного белка на хитиновом сорбенте. 2d – стадия элюции целевого hEGF.

По схеме 1 рефолдинг гибридного белка осуществляли за счет снижения концентрации солюбилизирующего хаотропного агента на фоне высокого содержания тиольного реагента (MESNA), что не позволяло замыкаться дисульфидным связям в hEGF. Затем следовало нанесение на хитиновый сорбент (Рис. 39, 1a), автокаталитическое рН-индуцируемое расщепление так же на фоне высокой концентрации тиольного реагента (Рис. 39, 1b), элюция восстановленного hEGF (Рис. 39, 1c) и его ренатурация с образованием правильных дисульфидных связей (Рис. 39, 1d).

Попытка получения ренатурированного нативного hEGF в составе гибридного белка на хитиновом сорбенте, после автокаталитического расщепления приводила к образованию двух основных продуктов – правильно свернутой структуры нативного hEGF и стабильного промежуточного интермедиата с «неправильными» S-S связями (Рис. 40. I). После элюирования этих продуктов с колонки и при добавлении в смесь тиольного реагента неправильно замкнутая форма hEGF медленно переходила в нативную (Рис. 40, II). В то же время после восстановления дисульфидных связей в элюате (Рис. 40, III) и последующей ренатурации на фоне 0.25 мМ MESNA наблюдалось образование нативного полипептида (Рис. 40, IV-V).

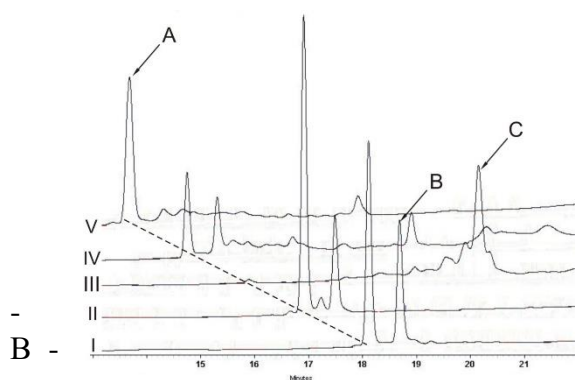


Рис. 40. Хроматографический анализ продуктов ренатурации hEGF. I - интермедиаты hEGF полученные при элюировании с колонки после инкубации гибридного белка в буфере J, II – интермедиаты hEGF после инкубирования в присутствии 1 mM MESNA в течении 24 ч, III – восстановленный рекомбинантный hEGF после колонки PD10, IV- рефолдинг hEGF в течении 4 ч. V рефолдинг hEGF в течении 48 ч. А – нативный hEGF, промежуточный интермедиат hEGF, С - восстановленный hEGF.

По схеме 2 после солюбилизации гибридного белка из тел включения ренатурацию эпидермального фактора роста с образованием нативных S-S- связей под воздействием кислорода воздуха осуществляли в течение 48 ч при температуре 4 °С. Сложность в осуществлении ренатурации эпидермального фактора роста, входящего в гибридный белок заключается в том, что присутствие в буфере тиольных реагентов необходимых для окисления дисульфидных связей в молекуле hEGF способно также инициировать спонтанную автокаталитическую реакцию расщепления гибридного белка. Кроме того, в гибридной молекуле помимо шести цистеинов эпидермального фактора роста, образующих три дисульфидных связи, присутствуют один неспаренный цистеин в хитин-связывающем домене и один цистеин в мини-интеине Ssp DnaB, способные также мешать образованию нативной формы hEGF.

Для предотвращения автокаталитического расщепления гибридного белка рефолдинг проводили при pH 10 и 4 °С (Рис. 39, 2a). Увеличение температуры во всем исследованном диапазоне pH приводило к автокаталитическому расщеплению гибридного белка. Затем ренатурированный белок сорбировали на колонку с хитиновым сорбентом (Рис. 39, 2b) и индуцировали сменой pH автокаталитическое расщепление при пониженной концентрации тиольного реагента (Рис. 39, 2c). В результате в элюате после завершения расщепления содержался нативный hEGF (Рис. 39, 2d).

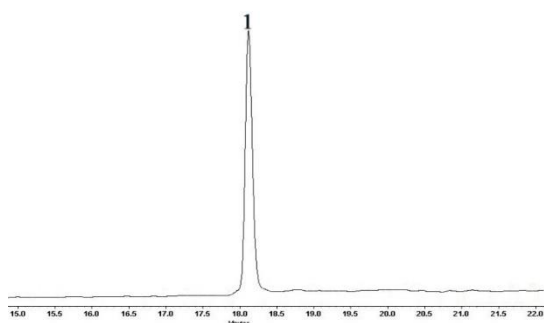


Рис. 41. ОФ ВЭЖХ анализ элюата после хитинового сорбента, полученного по схеме II. 1- рекомбинантный hEGF.

Окончательная очистка hEGF проводилась с помощью ОФ ВЭЖХ. Конечный продукт с хроматографической чистотой более 98 % (Рис. 41) был идентифицирован с помощью MALDI-масс-спектрометрии. Найденное значение массы hEGF составляло 6223 Да, что соответствовало теоретически рассчитанной величине. Выход hEGF, полученного по первой схеме, составил 10-12 мг с л клеточной культуры, а выход hEGF по второй схеме – 20-25мг с л клеточной культуры.

На основании полученных по двум схемам результатам нами было сделано предположение, что рефолдинг интеиновой части гибридного белка и hEGF происходят независимо, а из-за стерических затруднений при сорбции на хитиновом сорбенте при ренатурации возникает стабильный интермедиат с неправильно замкнутыми дисульфидными связями. Таким образом, схема II представляется предпочтительной для получения рекомбинантного hEGF. На основании описанных результатов была опубликована работа Esipov R.S. *et al.* [300] и получен патент РФ № 2323976 [301].

2. Разработка биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов с использованием TEV протеазы

Основным существенным ограничением получения рекомбинантных пептидов с помощью TEV протеазы в промышленных масштабах является прежде всего доступность самой TEV протеазы. Для научных исследований и лабораторных работ фермент вполне доступен, т.к. является коммерческим биохимическим препаратом. Однако стоимость TEV протеазы достаточно высока, что играет существенную роль в повышении себестоимости конечного продукта при масштабировании процесса. Поэтому одной из задач в разработке биотехнологии с использованием TEV протеазы является разработка доступной технологии получения самой TEV протеазы.

2.1. Получение рекомбинантной TEV протеазы

Ген, кодирующий рекомбинантную TEV протеазу, был получен из ИБФМ РАН и клонирован в плазмидный вектор рЕТ23b+ по сайтам узнавания рестриктаз EcoRI и HindIII. Как уже отмечалось выше в обзоре литературы, такой рекомбинантный ген будет содержать последовательность, кодирующую лидерный пептид фага T7 [21]. Для облегчения выделения TEV-протеазы экспрессионная конструкция содержала нуклеотидную последовательность, кодирующую His-tag из шести гистидинов – на С-конце TEV-протеазы (Рис. 42).

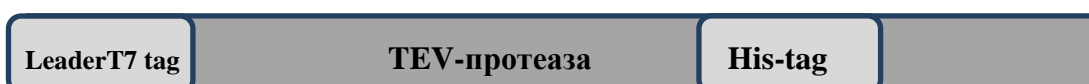


Рис. 42. Схема строения рекомбинантной TEV-протеиназы.

Полученной экспрессионной плазмидой pER-TEV были трансформированы клетки штамма *E. coli* ER2566. При культивировании штамма-продуцента *E. coli* ER2566/pER-TEV происходило накопление рекомбинантной TEV протеиназы, содержащей на N-конце лидерный T7-tag, обеспечивающий высокий уровень экспрессии, а на C-конце – 6xHis-tag. В литературе неоднократно отмечалось, что при экспрессии рекомбинантной TEV протеиназы в *E. coli* растворимость получаемого белка чрезвычайно низкая. И большинство работ было направлено на создание мутантных вариантов фермента с повышенной растворимостью [141, 302].

При культивировании созданного нами штамма-продуцента также происходило агрегирование фермента с образованием тел включения. Поэтому обязательно требовалось проведение солюбилизации тел включения и ренатурации. Была предложена схема очистки фермента с помощью металл-аффинной хроматографии непосредственно из экстракта тел включения в присутствии 8 М мочевины и ступенчатого диализа элюата для постепенного снижения концентрации мочевины и имидазола. Эта методика, подробно изложенная в разделе Материалы и методы, позволила восстановить ферментативную активность. При выделении из 15 г биомассы было получено 100-110 мг активного фермента, который в растворе, содержащем 50% глицерин, хранился при -70°C без заметной потери ферментативной активности в течение длительного времени (годы).

2.2. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного модифицированного фрагмента тумстатина человека – основного компонента лекарственного средства «Тумастин»

Тумстатин – фрагмент цепи $\alpha 3$ коллагена IV типа с молекулярной массой 28кДа, проявляющий антиангиогенные свойства, опосредованные через связывание с интегрином $\alpha v \beta 3$ на поверхности эндотелиальных клеток [303 - 304]. Антиангиогенная активность была локализована в [69-95]-фрагменте тумстатина, структура которого представлена на Рис. 43. В литературе этот пептид получил условное название пептид T8 и благодаря антиангиогенной активности именно этот фрагмент тумстатина представляет особый интерес для практического здравоохранения [305].

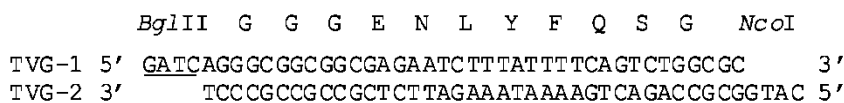
KQRFTTMPFLFCNVNDVCNFA SRNDYS

Рис. 43. Структура тумстатина – [69-95]-фрагмента тумстатина

Создание штамма-продуцента фрагмента тумстатина

Ранее на основе векторов pET32b(+) (Novagen) и pTWIN1 (New England Biolabs) была сконструирована новая плазида pTEV для клонирования генов целевых полипептидов под сайт узнавания TEV-протеиназы. По сайтам узнавания BglII и NcoI в вектор pET32b(+) была

встроена нуклеотидная последовательность, кодирующая сайт узнавания протеиназы вируса гравировки табака (TEV протеазы) ENLYFQ/S, фланкированный двумя гибкими глицин-содержащими линкерами. Указанную последовательность синтезировали из перекрывающихся олигонуклеотидов TVG-1 и TVG-2:



Далее полученный гибридный ген TrxTEVrs был переклонирован в вектор pTWIN1 по сайтам узнавания рестриктаз XbaI и Bpu1102I. Созданный вектор pTEV предназначен для клонирования полипептидов в составе гибридного гена, кодирующего в одной рамке считывания последовательность тиоредоксина А с 6хHis-tag, сайт узнавания для TEV-протеиназы и последовательность целевого белка.

Ген, кодирующий [L69K–95]-фрагмент тумстатина был получен химико-ферментативным способом из перекрывающихся праймеров Tum-1 – Tum-6 и клонирован в плазмиду pGEM5zf(-) (Рис4).

А

Lys-Gln-Arg-Phe-Thr-Thr-Met-Pro-Phe-Leu-Phe-Cys-Asn-Val-Asn-Asp-Val-Cys-Asn-Phe-Ala-Ser-Arg-Asn-Asp-Tyr-Ser-Pro-Gly-Pro
 AAA CAG CGT TTC ACC ACT ATG CCG TTT CTG TTC TGC AAC GGT AAC GAT GTT TGC AAC TTT GCG TCT CGT AAC GAT TAC TCT CCG GGT CCG

Б

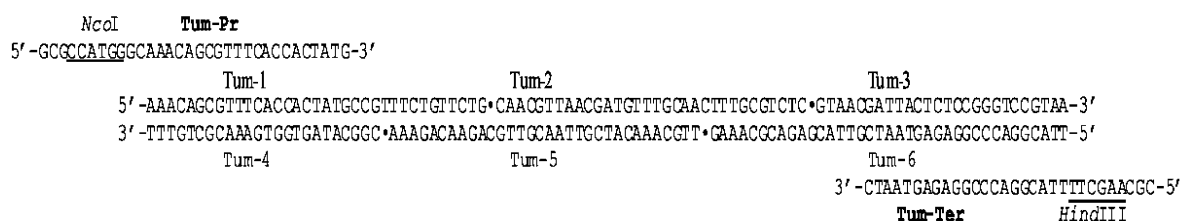


Рис. 44. Искусственный ген рекомбинантного [L69K–95]-фрагмента тумстатина.

А – аминокислотная последовательность [L69K–95]-фрагмента тумстатина и оптимизированная нуклеотидная последовательность его кодирующего гена. Последовательность целевого пептида показана жирным шрифтом.

Б – схема синтеза искусственного гена [L69K–95]-фрагмента тумстатина.

Помимо последовательности, кодирующей [L69K–95]-фрагмент тумстатина, ген содержал дополнительные кодоны, соответствующие последовательности Pro-Gly-Pro на С-конце пептида, необходимой для увеличения стабильности пептида *in vivo* [306]. Этот модифицированный фрагмент тумстатина [L69K–95] с дополнительным пептидом на С-конце мы взяли за основу для биотехнологического получения рекомбинантного аналога биологически активного тумстатина, получившего название тумастин.

Синтетический ген тумастина был переклонирован в созданный вектор рTEV по сайтам рестрикции NcoI и HindIII. Таким образом, была получена рекомбинантная экспрессионная плазмида рTEV-TMS (Рис. 45), которую использовали для трансформации штамма *E. coli* BL21(DE3).

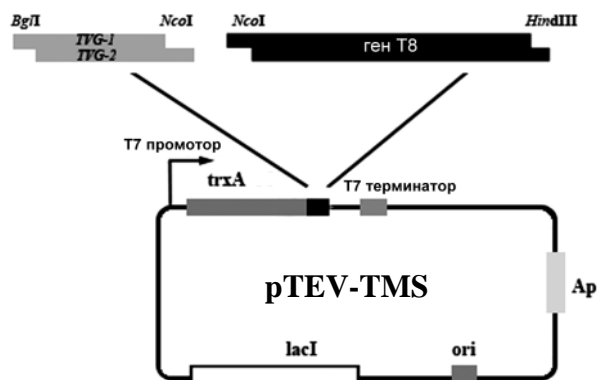


Рис. 45. Схема плазмиды рTEV-TMS. TVG-1, TVG-2 — перекрывающиеся олигонуклеотиды, кодирующие сайт расщепления TEV- протеиназы; trxA — ген, кодирующий тиоредоксин А.

В результате был создан штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/рTEV-TMS, при культивировании которого синтезируется в растворимой форме гибридный белок TrxTEVrs-TMS (21,2 кДа), состоящий из тиоредоксина, аффинного 6xHis-tag, сайта узнавания TEV протеиназы (ENLYFQ/S) и [L69K–95]-фрагмента тумстатина (Рис. 46). Наибольший съем биомассы (5 г с литра клеточной культуры) и содержание гибридного белка (не менее 32 % от суммарного клеточного белка) достигался при культивировании при 37 °С в течение 3 ч (Рис. 47, дорожки 1 – 3).



Рис. 46. Схема гибридного белка TrxTEVrs-TMS.

Следует отметить, такой рекомбинантный тумастин содержит несколько дополнительных аминокислотных остатков на N-конце (SGAMG), представляющие собой гибкий линкер, отдаляющий собственно пептид T8 от сайта расщепления TEV протеазой. Мы предположили, что такое изменение первичной структуры пептида не уменьшит его биологическую активность, так как оно не затрагивают остатки важные Lys78, Val82 и Asp84, отвечающие за антиангиогенный эффект T8 [307].

Разработка технологии выделения рекомбинантного тумастина

Очистку гибридного белка из клеточного супернатанта после разрушения 3 г биомассы проводили на колонке с металл-хелатным аффинным сорбентом Ni²⁺-IDA Sepharose в ступенчатом градиенте концентрации от 20 до 500 мМ имидазола (Рис. 47, дорожка 2). К объединенному элюату (13 мл с концентрацией белка 3.5 мг/мл) добавляли раствор TEV-

протеиназы в соотношении белок : фермент 100 : 1 и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 часов. Эффективность расщепления составляла не менее 98 % (Рис. 47, дорожки 4 – 5).

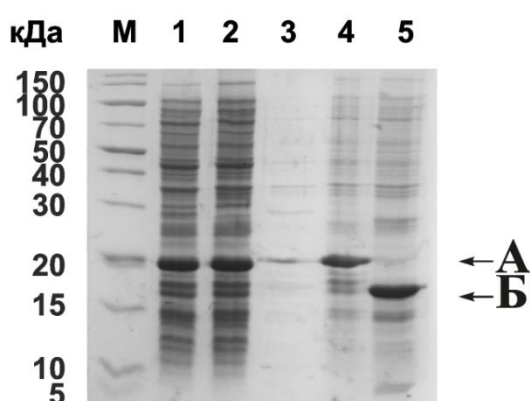


Рис. 47. Электрофоретический анализ выделения и протеолитического расщепления гибридного белка TrxTEVrs-TMS. М- стандарт молекулярных масс; 1 – тотальный клеточный лизат; 2 – осветленный клеточный супернатант; 3 – осадок клеточного дроба; 4 – гибридный белок TrxTEVrs-TMS после аффинной хроматографии; 5 – продукты расщепления гибридного белка TrxTEVrs-TMS с помощью TEV-протеиназы в соотношении 1 : 100 (фермент : белок) после инкубации в течение 20 часов при 25 °С при рН 8.0; А – гибридный белок TrxTEVrs-TMS, содержащий антиангиогенный пептид TMS; Б – остаточный белок TrxTEVrs.

Проводили хромото-масс-спектрометрический анализ реакционной смеси (Рис. 48А): на момент завершения стадии расщепления обнаруживался основной продукт с молекулярной массой m/z 3872.75 Да, соответствующей теоретически рассчитанной массе для пептида с восстановленным дисульфидным мостом (3872,4 Да) (Рис. 48Б).

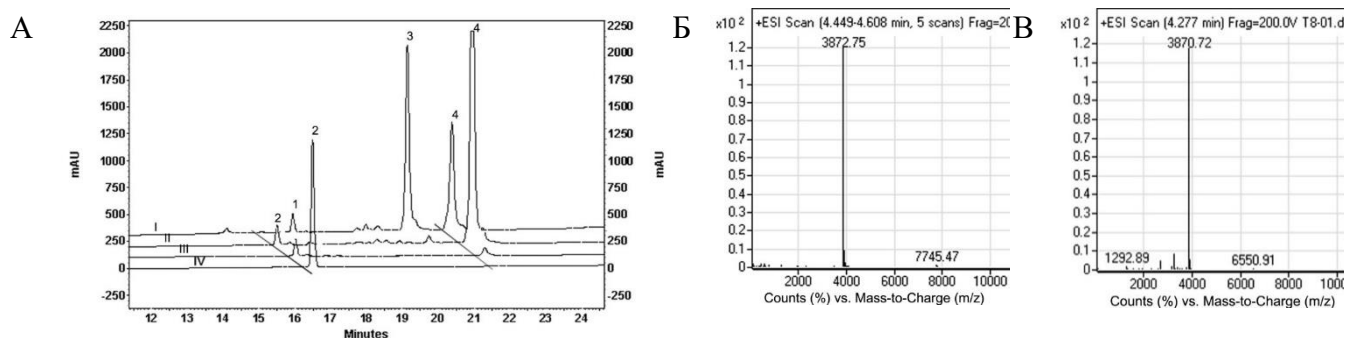


Рис. 48. Хромотографический и масс-спектрометрический анализ промежуточных продуктов на разных стадиях выделения и очистки тумастина. А — ОФ ВЭЖХ на колонке с сорбентом Prosphere C-18. I — продукты расщепления белка TrxTEVrs-TMS с помощью протеиназы TEV, II — продукты расщепления TrxTEVrs-TMS после рефолдинга, III — пептид TMS после очистки от тиоредоксина и протеиназы TEV, IV — пептид TMS, очищенный с помощью ОФ ВЭЖХ (чистота > 99 %); 1 — восстановленный TMS, 2 — окисленный TMS, 3 — восстановленный тиоредоксин, 4 — окисленный тиоредоксин; Б — масс-спектр восстановленного пептида TMS; В — масс-спектр окисленного TMS.

Для рефолдинга и образования необходимой дисульфидной связи использовали окислительно-восстановительную пару GSH/GSSG (10:1) на этапе диализа. При этом вместе с образованием целевого пептида происходит окисление восстановленной формы тиоредоксина А (Рис. 48А, профиль II). Подтверждение образования окисленного пептида TMS также проводилось масс-спектрометрически (Рис. 48В). Дальнейшую очистку целевого пептида

проводили с помощью анионообменной хроматографии и ОФ ВЭЖХ. Раствор тумастина с хроматографической чистотой более 98% лиофильно высушивали. Выход пептида составил 4 мг с литра культуры.

Масштабирование технологии выделения и очистки рекомбинантного тумастина

Ферментация штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pTEV-TMS была произведена на участке экспериментальной ферментации Опытного Биотехнологического производства (ОБП) ИБХ РАН. Осуществлено масштабирование стадии в 8 раз. При этом съём биомассы был увеличен до 13.4 ± 0.5 г с литра клеточной культуры. При этом основные характеристики были воспроизведены: содержание растворимого гибридного белка составляло не менее 34 % от суммарных клеточных белков.

При масштабировании схемы выделения отказались от использования металл-хелатной аффинной хроматографии и диализа в пользу ионообменной хроматографической очистки. Очистку гибридного белка проводили с помощью анионообменной хроматографии. Для повышения протеолитического расщепления использовали соотношение фермент : белок 1:50. А для очистки тумастина от нерасщепившегося гибридного белка и белка-носителя разработали двухстадийную хроматографическую очистку на анионообменном сорбенте. На первой стадии добивались сорбции примесных белков при pH 9.0. При этом фракция проскока содержала практически чистый целевой полипептид. Полученный раствор концентрировали с помощью анионообменной хроматографии при pH 11.0. При этом для ренатурации белка уже не требовалось использование дорогостоящей окислительно-восстановительной пары глутатионов, а было достаточно инкубации при pH 11.0 в течение 16 ч при 10 °С. Дальнейшую очистку проводили с помощью препаративной ОФ ВЭЖХ. Также была введена стадия гель-фильтрационной хроматографии для удаления следов ацетонитрила и ТФУ из раствора белка. За один технологический цикл было наработано 460 мг тумастина с хроматографической чистотой более 98%. Проведенная оптимизация и масштабирование лабораторной схемы позволило увеличить выход тумастина до 31 мг пептида с литра клеточной культуры. На основании описанных результатов была опубликована работа Esipov R.S. *et al.* [308] и зарегистрирован патент РФ № 2625008 [309].

2.3. Биотехнология получения тимических пептидов с использованием химического ацетилирования

В 1966 г Goldstein *et al.* выделили из тимусовой железы телёнка термостабильную фракцию 5 (TF5). Эта фракция состояла из 30 полипептидов с молекулярной массой от 1 до 15 кДа [310] и обладала способностью стимулировать созревание Т- клеток, модулируя Т-

клеточный ответ [311]. Входящие в TF5 пептиды, получившие название «тимозины», образуют несколько видов, которые принадлежат к семейству модификаторов биологических реакций (BRMs). Тимозины не только регулируют иммунные реакции, но и участвуют в регенерации поврежденных тканей. Наибольший интерес практического применения в здравоохранении вызвали тимозин α_1 и тимозин β_4 . Однако биотехнологическое получение этих пептидов осложнялось наличием ацетильных групп на N-концевом остатке серина. Ниже представлены результаты наших технологических разработок по получению этих пептидов.

2.3.1. Разработка технологии получения активной фармацевтической субстанции тимозина альфа-1

Тимозин- α_1 (T α_1), представляющий собой сравнительно короткий полипептид (28 а.о.), осуществляет модуляцию иммунной системы и стимулирует дифференциацию и активацию Т-клеток [312]. Природный T α_1 образуется специфическим протеолизом предшественника – прототимозина [313 - 314]. Структура T α_1 необычна – отсутствуют гистидин, ароматические и серосодержащие аминокислоты, поэтому в растворе пептид не поглощает УФ при 280 нм [312].

У природного пептида N-концевая группа серина ацетилирована, что повышает устойчивость T α_1 к действию протеаз. Наиболее распространенным способом получения T α_1 является химический синтез, причем благодаря усовершенствованному твердофазному синтезу удалось добиться выхода T α_1 более 30% [315]. Нами был разработан биотехнологический способ получения тимозина- α_1 , который заключался в создании штамма продуцента гибридного белка, содержащего дезацетилтимозин- α_1 , выделении и очистки дезацетилтимозина- α_1 и ацетилировании уксусным ангидридом с последующей очисткой конечного продукта.

Создание штамма-продуцента тимозина- α_1

Дезацетилтимозин- α_1 получали в составе гибридного белка TrxTEVrs-Thym на основе тиоредоксина А, значительно повышающего растворимость гибридного белка (Рис. 49). Для отщепления дезацетилтимозина- α_1 после тиоредоксина А следует сайт из 6 аминокислотных остатков (ENLYFQ), специфично узнаваемый и расщепляемый протеазой вируса гравировки табака (TEV-протеазой).



Рис. 49. Схема строения гибридного белка TrxTEVrs-Thym. TEVrs — сайт расщепления белка TEV-протеазой; стрелкой отмечено место расщепления.

Искусственный ген T α 1 (Рис. 50) синтезировали химико-ферментативным способом и клонировали в плазмиду pGEM5zf(-). Далее ген был переклонирован в плазмиду pER-TEVrs.

Ac-Ser-Asp-Ala-Ala-Val-Asp-Thr-Ser-Ser-Glu-Ile-Thr-Thr-Lys-
TCC-GAT-GCT-GCG-GTG-GAC-ACA-TCC-TCT-GAA-ATT-ACA-ACG-AAA-

Asp-Leu-Lys-Glu-Lys-Lys-Glu-Val-Val-Glu-Glu-Ala-Glu-Asn-OH
GAT-CTG-AAA-GAA-AAG-AAA-GAA-GTT-GTG-GAA-GAG-GCT-GAG-AAC

Рис. 50. Аминокислотная последовательность тимозина- α 1 и нуклеотидная последовательность синтетического гена тимозина- α 1.

На основе штамма-носителя *E. coli* ER2566 был получен экспрессионный штамм *E. coli* ER2566/pTEV-Thym, продуцирующий гибридный белок TrxTEVrs-Thym. Ферментация штамма-продуцента в 75 литровом ферментере в объеме 40 л клеточной культуры позволяла получать до 10 г биомассы с литра культуры с содержанием гибридного белка не менее 40 % от суммарного клеточного белка.

Разработка технологии выделения дезацетилтимозина- α 1

Лабораторная методика выделения и очистки дезацетилтимозина- α 1 во многом повторяет методику выделения тумастина, описанную в разделе 6.6. Была проведена оптимизация соотношения белок:фермент для эффективного расщепления гибридного белка: наибольшая эффективность достигалась при соотношении 50:1 и при инкубации в течение 24 ч при 25 °C (более 95 %). Для очистки от примесных белков проводили ультрафильтрацию реакционной смеси с использованием мембраны с размером пор 10 кДа. Окончательная очистка осуществлялась с помощью ОФ ВЭЖХ.

Масштабирование технологии выделения дезацетилтимозина- α 1

При масштабировании отказались от использования металл-хелатной хроматографии на Ni²⁺-IDA Sepharose в пользу анионообменной хроматографии на сорбенте Q Sepharose XL на стадии очистки гибридного белка TrxTEVrs-Thym (Рис. 51). Загрузка клеточной биомассы в один технологический цикл составляла 150 г клеточной биомассы.

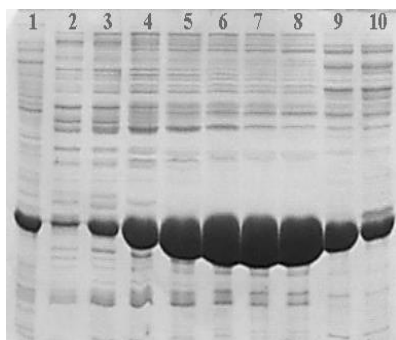


Рис. 51. Электрофоретический анализ фракций после ионообменной хроматографии, содержащие TrxTEVrs-Thym. 1 – осветленный клеточный лизат штамма-продуцента перед хроматографией, 2–10 – аликвоты фракций хроматографического разделения. 1-объединённая фракция после ионообменной хроматографии, содержащая очищенный TrxTEVrs-Thym

Объединенный элюат (505 мл с концентрацией белка 11,6 мг/мл, 5.86 г суммарного белка) использовался для постановки расщепления TEV-протеиназой. Эффективность расщепления при соотношении белок : фермент 50 : 1 при инкубации в течение 24 ч при 25°C достигала более 95% (Рис. 52).

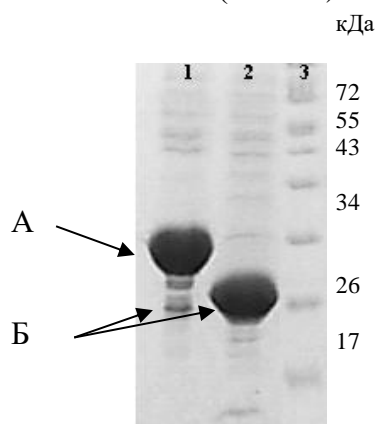


Рис. 52. Расщепление TEV-протеазой гибридного белка TrxTEVrs-Thym. Электрофорез 13 %-ДСН-ПААГ. А. гибридный белок TrxTEVrs-Thym, Б. остаточный белок Trx-TEVrs.

Для осаждения большей части примесных белков, в том числе и нерасщепленного гибридного белка, ввели стадию инкубации при рН 3.0 в течение 12 ч при +4 °С. Очистку дезацетилтимозина α1 от остаточного белка-носителя и других примесных белков проводили с помощью 3 циклов катионообменной хроматографии, а окончательную очистку – с помощью препаративной ОФ ВЭЖХ и гель-фильтрационной хроматографии. За один технологический цикл было наработано 730 ± 50 мг активной фармацевтической субстанции рекомбинантного дезацетилтимозина α1 с хроматографической чистотой не менее 98 %, что соответствует выходу 48 мг с литра культуры.

Химическое ацелирование дезацетилтимозина-α1

Ацелирование дезацетилтимозина-α1 проводили с помощью уксусного ангидрида. Основным параметром, влияющим на селективность реакции, это рН реакционной смеси. Чтобы обеспечить селективность ацелирования α-аминогруппы серина, реакцию проводили при рН 3.5 (Рис. 53). При таких условиях существенно повышается селективность реакции за счет снижения ацилирования ε-аминогрупп остатков лизина. Солевой состав, добавление органических растворителей и даже температура реакции существенного влияния на селективность реакции не оказывали. Важным фактором, определяющим выход целевого продукта и количество побочных продуктов, является используемый избыток уксусного ангидрида (Таблица 10). Интересно, что изменение температуры с 4 °С до 23 °С позволяет уменьшить избыток уксусного ангидрида, однако селективность ацелирования остается неизменной.

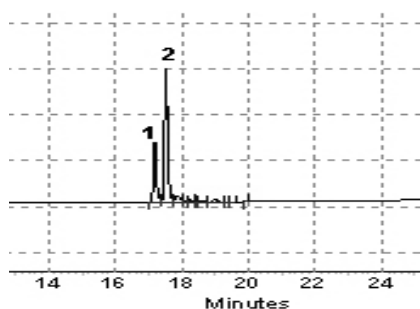


Рис. 53. Хроматографический анализ продуктов реакции ацетилирования дезацетилтимозина- α_1 ; 1-дезацетилтимозин- α_1 , 2-тимозин- α_1 .

Следует отметить, что если для аналитической реакции (до 1 мг пептида) выход реакции достигал 60%, при содержании побочных продуктов не более 10%, то при масштабировании процесса выход не превышал 48-50%. При этом изменение времени реакции, дробное добавление уксусного ангидрида, увеличение избытка ацетилирующего агента не способствовали увеличению выхода целевого продукта, а лишь приводили к увеличению содержания побочных продуктов.

Таблица 10. Содержание продуктов реакции химического ацетилирования дезацетилтимозина- α_1 в зависимости от используемого избытка уксусного ангидрида.

Избыток уксусного ангидрида	Содержание дезацетилтимозина- α_1 , %	Содержание тимозина- α_1 , %	Суммарное содержание побочных продуктов, %
600-кратный	58,2	36,4	5,4
1000-кратный	45	48,7	6,3
1900-кратный	28	61,5	10,5
3000-кратный	18	65,7	16,3

Выделение $T\alpha_1$ из реакционной смеси проводили с помощью препаративной ОФ ВЭЖХ. Общий выход целевого тимозина α_1 в форме лиофилизата за один технологический цикл составлял 244 мг с чистотой не менее 98 % (практический выход около 34%). Полученный препарат использовался для проведения доклинических исследований. На основании описанных результатов была опубликована работа Esipov R.S. *et al.* [316].

2.3.2. Разработка технологии получения активной фармацевтической субстанции тимозина β_4

Тимозин β_4 (Т β_4), впервые описанный в 1966 г [310] в составе фракции пептидов из тимуса телят, является высококонсервативным пептидом, состоящим из 43 аминокислотных остатков, с рI 4,6, аминогруппа N-концевого серина ацетилирована (Рис. 54). Опосредованно тимозин β_4 регулирует клеточную миграцию, наиболее выраженную при ангиогенезе и регенерации повреждённых тканей. Также за счет уникальных кардиопротекторных свойств тимозин β_4 является стимулятором ангиогенеза в условиях ишемии сердечной мышцы, а также блокатором проапоптотических каскадов в кардиомиоцитах. Уникальные биологические

свойства этого пептида позволили начать перспективные медико-биологические исследования по применению Тβ4 в лечении целого ряда тяжелых заболеваний и травм. Полный химический синтез, разработанный в 90-х годах [317], является довольно дорогостоящим для промышленной реализации. Альтернативой является биотехнологический способ получения Тβ4. Хотя этот подход и был реализован в начале 2000-х годов, но из-за ряда технологических недостатков не был реализован в крупном масштабе [318–320]. Учитывая интерес к Тβ4 как потенциальному лекарственному препарату с уникальными свойствами, задача создания биотехнологии получения этого пептида является весьма актуальной.

Ac-SDKPDMAEIEKFDKSKLKTETQEKNPLPSKETIEQEKKES

Рис. 54. Аминокислотная последовательность тимозина β4 (Тβ4).

Создание штамма-продуцента тимозина β4

Синтетический ген тимозина β4 (Рис. 55) был клонирован в вектор рTEV, создание и использование которого описано на примере тумастина и тимозина α1.

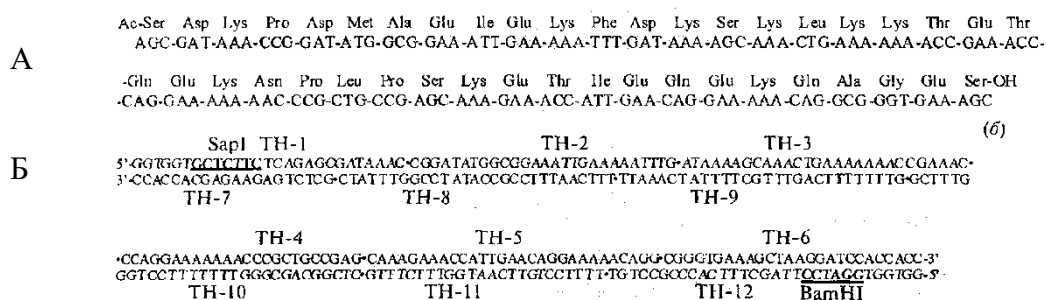


Рис. 55. А. Аминокислотная последовательность тимозина β4 и нуклеотидная последовательность кодирующего его синтетического гена. Б – схема синтеза искусственного гена Тβ4.

Полученной плазмидой рTEV-Tβ4 трансформировали штамм *E.coli* ER2566 и, таким образом, получили штамм-продуцент гибридного белка TrxTEVrs-Tβ4 (22кДа), состоящий из тиоредоксина А, вспомогательных аффинных последовательностей, сайта расщепления TEV-протеиназой и, собственно, тимозина β4. При культивировании штамма-продуцента *E. coli* ER2566 /рTEV-Tβ4 происходило накопление гибридного белка в растворимой форме в клеточном супернатанте в количестве до 40 % от общего клеточного белка.

Разработка лабораторной методики получения тимозина β4

В отличие от лабораторной методики, предложенной для тимозина α1, при выделении гибридного белка TrxTEVrs-Tβ4 из клеточного супернатанта сразу отказались от металл-хелатной аффинной хроматографии в пользу легко масштабируемой анионообменной хроматографии. Также ввели стадию осаждения балластных белков непосредственно после дезинтеграции клеточной биомассы. Для этого были использованы разные варианты:

высаливание высокими концентрациями сульфата аммония или хлорида натрия, рН-зависимое и температурное осаждение. При высаливании сульфатом аммония или хлоридом натрия вместе с балластными белками соосаждалось значительное количество гибридного белка. Поэтому наиболее предпочтительным оказался последний вариант. Это было связано с высокой термостабильностью тиоредоксина А, входящего в состав гибридного белка [297]. При инкубации при 45 – 50 °С было достигнуто значительное обогащение супернатанта по целевому белку: более 2/3 всех балластных белков агрегировали, а потери целевого гибридного белка не превышали 10 % (Рис. 56).

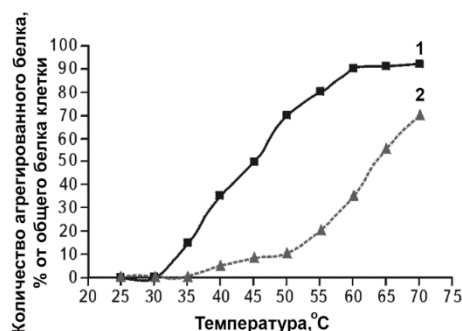


Рис 56. Степень осаждения балластных и гибридного белков при термической обработке клеточного супернатанта. 1 — балластные белки; 2 — гибридный белок.

Далее подбирали оптимальное соотношение фермент : белок для постановки протеолитического расщепления: исследовали диапазон от 1 : 400 до 1 : 25 (Рис. 57). При соотношении фермент : белок 1:100 степень расщепления гибридного белка за 12 часов инкубации достигала максимального значения (около 90 %). Увеличение количества вносимой протеиназы выход реакции не увеличивался.

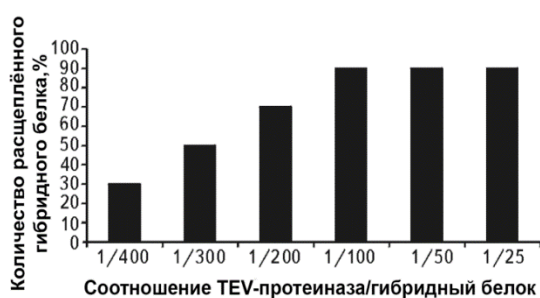


Рис. 57. Эффективность расщепления гибридного белка при различном соотношении фермент/белок.

Дальнейшую очистку дезацетилтимозина β4 приводили с помощью тангенциальной ультрафильтрации и ОФ ВЭЖХ.

Ацетилирование дезацетилтимозина β4 проводили по аналогии с получением тимозина-α1 с использованием уксусного ангидрида при рН 3.5, чтобы снизить возникновение побочных продуктов, прежде всего ацилирования остатков лизина по ε-аминогруппе. Однако, как и в случае ацилирования дезацетилтимозина-α1, выход целевого Тβ4 не превышал 55 %, т.к. селективность реакции с уксусным ангидридом не позволила провести ацетилирование только N-концевого серина. Накопление побочных продуктов неизбежно снижало выход, несмотря на многочисленные попытки варьирования условий реакции ацилирования (рН, температура,

время, добавление солей, органических растворителей и пр.). Для остановки реакции ацетилирования также использовали 10 мМ лимонную кислоту. Окончательную очистку целевого Тβ4 проводили с помощью ОФ ВЭЖХ. Фракции, содержащие чистый Тβ4, объединяли и лиофильно высушивали, а фракции, содержащие дезацетилтимозин β4, объединяли и проводили рецикл ацетилирования. Выход тимозина β4 по разработанной лабораторной методике составил около 20 мг полипептида с литра культуральной среды при загрузке до 5 г биомассы и открывала возможности масштабирования технологии. На основании описанных результатов была опубликована работа Бейрахова К.А. и др. [321].

Опытно-промышленная (пилотная) технология получения Тβ4

При масштабировании культивирования штамма-продуцента в оптимизированных условиях от качалочных колбы до промышленного ферментера съем клеточной биомассы был увеличен до 16 г с литра культуральной среды. При этом содержание гибридного белка, находящегося в растворимой форме, составило более 40 % от суммарного клеточного белка клетки.

Лабораторная методика выделения и очистки дезацетилтимозина β4 при масштабировании претерпела лишь незначительные технические модификации (Рис. 58).

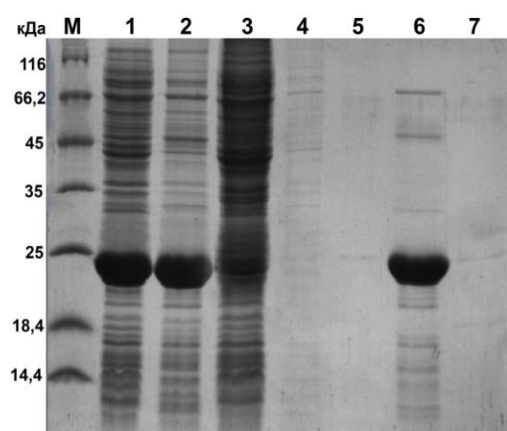


Рис. 58. Электрофоретический анализ промежуточных продуктов на стадиях выделения гибридного белка. М – стандарт молекулярных масс, **1** – супернатант после разрушения клеток, **2** – супернатант после тепловой обработки, **3** – осадок после температурной обработки, **4** – пик при нанесении на колонну, **5** – промывка колонны буфером А, **6** – суммарная фракция при элюции буфером с 0.4 М NaCl, **7** – промывка колонны буфером с 1 М NaCl.

Масштабирование стадии расщепления гибридного белка ТЕV-протеиназой не претерпело существенных изменений по сравнению с лабораторной методикой. Оптимальное соотношение фермент-субстрат определенное как 1/100 сохранилось, при этом эффективность расщепления гибридного белка составила 90 % (Рис. 59).

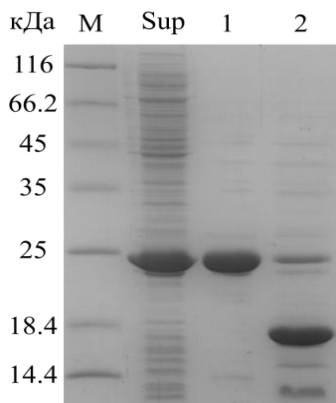


Рис. 59. Электрофоретический анализ протеолитического расщепления гибридного белка TgTEVrs-TB4. М — маркеры молекулярной массы; Sup — супернатант после термической обработки; 1 — объединенный элюат после анионообменной хроматографии; 2 — белковый раствор после стадии расщепления.

При масштабировании технологии отказались от тангенциальной ультрафильтрации для отделения дезацетилтимозина бета 4 от остаточного белка и заменили ее на катионообменную хроматографию на смоле MacroPrep High S. Учитывая близость изоэлектрических точек разделяемых белков, для очистки дезацетилтимозина β4 разработали трехстадийный протокол (Рис. 60):

- 1) После осаждения части балластных белков при рН 3.0 проводили сорбцию всех белков и элюцию раствором с 1 М NaCl.
- 2) На втором этапе осуществляли избирательную сорбцию дезацетилтимозина бета 4 при рН 5.2 на катионообменный сорбент.
- 3) На третьем этапе раствор, содержащий дезацетилтимозина бета 4, концентрировали на колонке: сорбировали при рН 3.0 и элюировали раствором с 1 М NaCl.

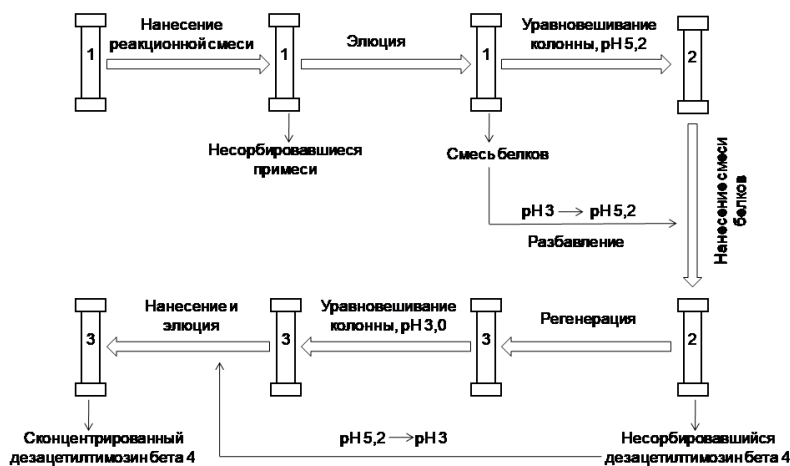


Рис. 60. Технологическая схема катионообменной хроматографии при выделении дезацетилтимозин бета 4.

Основные технологические потери при получении тимозина β4 (как и тимозина α1) происходили на стадии химического ацетилирования (практический выход не превышал 50 %). При масштабировании процесса стадия ацетилирования становится лимитирующей в достижении высокого выхода конечного продукта. Исследование кинетики реакции ацетилирования показало, что при достижении 50% конверсии дезацетилтимозина в реакционной смеси значительно увеличивается доля побочных продуктов реакции (Рис. 61).

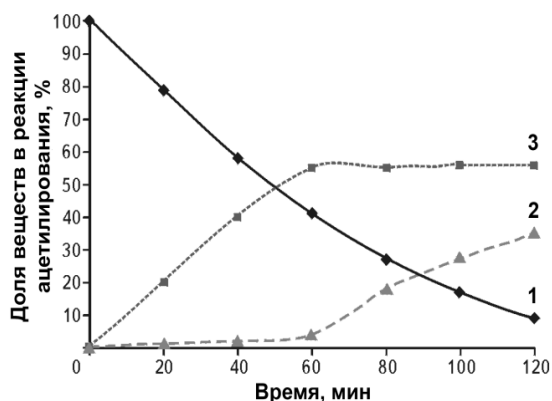


Рис. 61. Кинетика реакции ацетилирования дезацетилтимозина β4 в лабораторных условиях. 1 – содержание дезацетилтимозина β4; 2 – содержание побочных продуктов; 3 – содержание тимозина β4.

При масштабировании процесса ацетилирования с увеличением объема реакционной смеси увеличилось время нанесения реакционной смеси на колонну, что, в свою очередь, привело к накоплению побочных продуктов. Таким образом, лабораторный метод ацетилирования был воспроизводим только при объёме реакционной смеси не более 200 мл. При большем масштабировании значительно снижался выход целевого тимозина β4.

Для минимизации потерь на этой стадии были необходимы условия для остановки реакции в нужный момент времени. Согласно графику на Рис. 65 через час инкубации достигался максимальный выход при доле побочных продуктов не больше 4 %. Оценивали терминирующее действие малоновой и лимонной кислот, способных защитить свободные аминокислотные группы пептида от действия уксусного ангидрида. Лимонная кислота оказалась более эффективным терминатором - при концентрации 10 мМ реакция ацетилирования практически полностью останавливалась (Рис. 62).

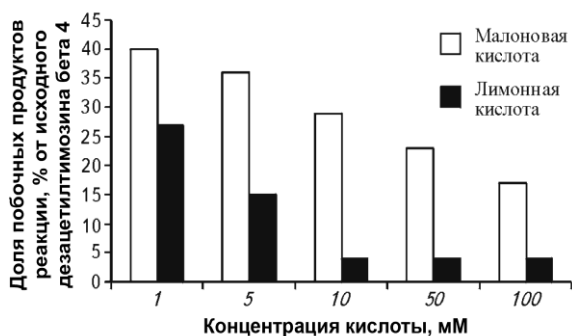


Рис. 62. Накопление побочных продуктов реакции ацетилирования в зависимости от концентрации кислоты через 1 ч после ее добавления.

Выход целевого продукта в реакции с использованием лимонной кислоты составил 55 % при содержании побочных продуктов реакции ацетилирования не более 4 %. Это позволило разработать схему с рециклом непрореагировавшего дезацетилтимозина бета 4 с минимальными потерями.

Выделение целевого Тβ4 проводили с помощью ОФ ВЭЖХ (Рис. 63). Была подобрана программа разделения для отделения непрореагировавшего дезацетилтимозина бета 4

(desAcTb4) от целевого ацелированного пептида (Tb4). При этом фракция с непрореагировавшим пептидом вновь возвращался на стадию ацелирования.

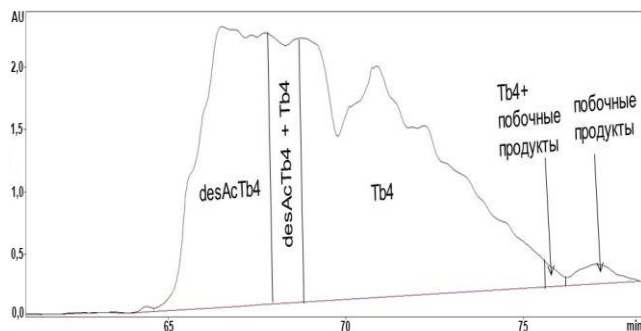


Рис. 63. Хроматографический профиль препаративной очистки тимозина β4 после оптимизации условий реакции ацелирования дезацетилтимозина β4.

Таким образом, в ходе оптимизации технологии практический выход был увеличен с 3 до 5 мг дезацелированного целевого пептида с 1 г биомассы. В результате масштабирования стадии культивирования на промышленном ферментере и оптимизации технологии химического ацелирования с учетом рециклов суммарный выход увеличился с 20 до 80 мг рекомбинантного тимозина β4 с 1 л культуральной среды.

3. Разработка биотехнологии получения рекомбинантных тимозина-α1 и тимозина-β4 с процессом ацелирования *in vivo*

Разработанная ранее биотехнология получения рекомбинантных тимозинов α1 и β4 предусматривала получение неацелированных полипептидов – дезацетилтимозинов из белков-предшественников с последующим их химическим ацелированием. В этом случае промежуточный дезацелированный продукт может быть использован для получения аналогов и с другими модификациями. Однако при таком способе ацелирования невозможно добиться высокого выхода целевого продукта из-за низкой селективности реакции ацелирования уксусным ангидридом. В качестве альтернативы химическому ацелированию тимозинов, которое проходит с недостаточно высоким выходом, нами была предложена и реализована биотехнология их получения с ацелированием рекомбинантного предшественника *in vivo*.

Мы использовали ферментативный способ, представляющий собой ацелирование белка с помощью ацетилтрансферазы и ацетилкоэнзима А в качестве субстрата [322 - 324]. Ввиду высокой стоимости ацетилкоэнзима А ацелирование *in vitro* становится абсолютно нерентабельным с точки зрения производства. Напротив, ацелирование *in vivo*, когда в качестве субстрата для фермента используется ацетилкоэнзим А самой клетки, является коммерчески выгодным. Технологические схемы получения тимозина α1 и β4 очень близки и

принципиальных различий не имеют, поэтому ниже будет представлена биотехнология получения только тимозина $\beta 4$.

Для создания экспрессионной системы, обеспечивающей одновременный синтез гибридного белка и N-ацетилтрансферазы, в единую полицистронную конструкцию были клонированы последовательности тимозина бета 4 и N-ацетилтрансферазы. В качестве ацетилирующих ферментов были выбраны аланиновая N-ацетилтрансфераза (RimJ) и сериновая N-ацетилтрансфераза (RimL) из *Escherichia coli*. А в качестве экспрессионной системы использовался вектор pTWIN1, в который клонировали олигонуклеотидный дуплекс, содержащий измененную последовательность Шайна–Дальгарно (AGGAGAATAACTAG). Для ослабления связывания РНК с рибосомой [325 - 326] и, в конечном итоге, для снижения уровня экспрессии второго гена в полицистронной конструкции, была осуществлена замена двух оснований АТ на ТА в «классической» последовательности Шайна–Дальгарно (AGGAGAAATACTAG) (Рис. 64).

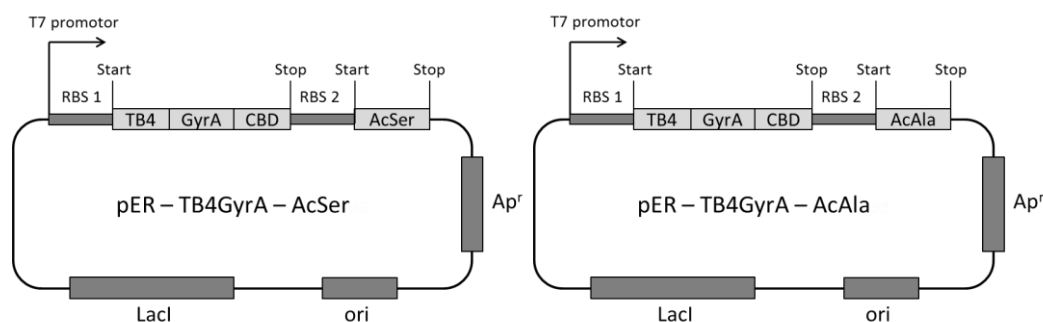


Рис. 64. Схема экспрессионных плазмид pER-Tb4GyrA-AcAla и pER-Tb4GyrA-AcSer. TB4 – ген тимозина бета 4, GyrA – ген интеина, CBD – ген хитин-связывающего домена, RBS 1 – классическая последовательность Шайна–Дальгарно, RBS 2– изменённая последовательность Шайна–Дальгарно (сайт связывания с рибосомой), AcSer – ген RimJ, кодирующий сериновую N-ацетилтрансферазу *E.coli*, AcAla – ген RimL, кодирующий аланиновую N-ацетилтрансферазу *E.coli*.

Сконструированными рекомбинантными плазмидами pER-Tb4GyrA-AcAla и pER-Tb4GyrA-AcSer были трансформированы клетки штаммов *E.coli* ER2566 и C3030. Для проверки экспрессии генов штаммы-носители выращивали в одинаковых условиях и после индукции анализировали продукты белкового биосинтеза. Во всех штаммах-продуцентах происходило накопление гибридного белка Tb4GyrA в растворимой форме и сериновой или аланиновой ацетилтрансфераз без расщепления *in vivo*. В целом, продукция гибридного белка Tb4GyrA у всех штаммов была близкой – примерно 23% от общего клеточного белка, уровень продукции ацетилтрансфераз так же был примерно одинаков и составлял около 8%. Одним из основных критериев оценки эффективности штамма-продуцента являлась доля

ацетилированной *in vivo* формы полипептида по отношению к неацетилированному предшественнику. Второй по важности критерий – это удаление N-концевого формилметионина *in vivo*. При анализе штаммов-продуцентов мы подтвердили, что в процессе посттрансляционной модификации независимо от условий культивирования штаммов-продуцентов происходило полное удаление N-концевого формилметионина. Наиболее эффективным оказался штамм на основе *E. coli* C3030, в котором при оптимальных условиях выход ацетилированного полипептида достигал 93% (Рис. 65).

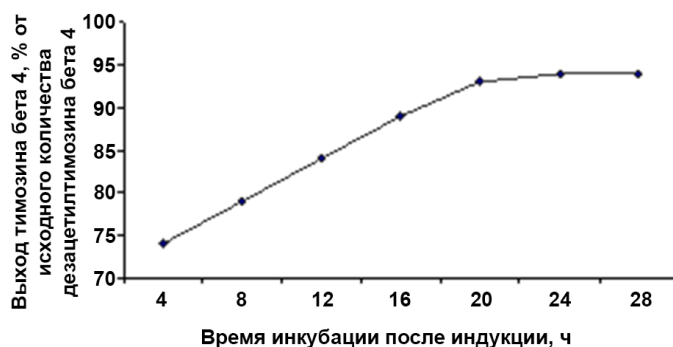


Рис. 65. Кинетика ацетилирования штамма-продуцента *E. coli* C3030/pER-Tb4GyrA-AcSer при 37°C.

Выделение целевого продукта осуществляли с помощью катионообменной хроматографии, проводя элюцию полипептидов линейным градиентом концентрации NaCl. Окончательную очистку проводили с помощью препаративной ОФ ВЭЖХ и гель-фильтрационной хроматографии. Конечный выход целевого продукта составил не менее 20 мг тимозина $\beta 4$ с 1 л культуральной среды.

На основании описанных результатов были опубликована работа Esipov R.S. *et al.* [327] и получены патенты РФ № 2593172 и № 2592860 [328 – 329].

4. Разработка биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов с использованием интеиновых структур

Альтернативным биотехнологическим подходом к получению рекомбинантных полипептидов из гибридных белков является использование белкового сплайсинга - автокаталитического расщепления за счет использования интеиновых структур. Эта идея, предложенная почти 30 лет назад, была доведена до коммерческого воплощения компанией New England BioLabs, которая выпустила две экспрессионные интеин-опосредованные системы получения рекомбинантных белков. Обе системы – IMPACT-CN (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) и IMPACT-TWIN (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag-Two Intein) – основаны на контролируемом расщеплении пептидных связей на N- или C-концах модифицированных интеинов и получили широкое распространение в лабораторных исследованиях.

Преимущества такого биотехнологического подхода очевидны: при использовании контролируемого автокаталитического расщепления гибридного белка нет необходимости в специфических протеазах и в целевом полипептиде нет «лишнего» N-концевого формилметионина. Более того, в состав получаемых гибридных белков входит хитин-связывающий домен для возможности их очистки на хитиновом сорбенте с последующим их автокаталитическим расщеплением.

Однако, не смотря на широкое использование в лабораторных исследованиях, в настоящее время использование таких интеин-опосредованных систем в масштабируемых технологиях для получения рекомбинантных белков или полипептидов не описано. Это связано с рядом проблем, особенно актуальных при промышленном (или полупромышленном) масштабе. Во-первых, в предлагаемых компанией New England BioLabs системах большой размер интеина при сравнительно небольшом размере целевого пептида приводит к тому, что гибридный белок содержит только около 10% «полезной нагрузки», а остальное является побочным продуктом, который удаляется после расщепления. Во-вторых, гибридный белок, синтезируемый *in vivo*, часто находится в растворимой форме только частично, а значительная (иногда большая) часть агрегирует, образуя «тельца включения». Поэтому при использовании рекомендованного фирмой достаточно дорогого аффинного сорбента, выход конечного полипептида резко снижается, что приводит к дополнительному снижению рентабельности. В-третьих, в случае если первой аминокислотой C-экстеина являются Ser, Cys, Asp, Glu, His, то высока вероятность автокаталитического расщепления (сплайсинга) на стадии культивирования продуцента, что также приводит к потерям целевого продукта при использовании хитинового сорбента. К этому следует добавить, что автокаталитическое расщепление гибридного белка происходит в узком диапазоне pH и требует тиол-содержащих соединений типа ДТТ или β-меркаптоэтанола при получении целевого белка на N-конце интеина (pTYB1 и pTYB2). Для клонирования полноценных белков эукариот в *E. coli* появляются проблемы, связанные с агрегацией вновь синтезированного белка в результате неправильного фолдинга (образование телец включения). Рефолдинг полученного рекомбинантного белка также затрудняет широкое использование этого подхода в широкомасштабных биотехнологиях.

В настоящей работе были созданы интеин-опосредованные биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов: глюкагон, аналоги гирудина, эндостатин, оксинтомодулин, эпидермального фактора роста человека, модифицированный фрагмент фактора дифференцировки пигментного эпителия, окситоцин, анальгетик АРНС-3, анальгетик РТ-1. На приведенных ниже результатах показано, как решались проблемы использования интеинов в каждом конкретном случае.

4.1. Разработка биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов с антитромбической активностью – дезирудина и лепирудина

Медицинские пиявки *Hirudo medicinalis* начали использовать для лечения людей с незапамятных времен, и они по-прежнему входят в арсенал терапевтических средств гирудотерапии различных заболеваний [330]. В секрете слюнных желез медицинских пиявок содержится значительное количество различных биологически активных соединений, в том числе группу сильных ингибиторов тромбина, включающая три основные формы (гирудин-1, гирудин-2 и гирудин-3) и более 17 их аналогов с различными аминокислотными заменами [331]. Среди них самым сильным ингибитором тромбина является гирудин-1, и именно он используется при лечении тромбозов [332]. Все природные гирудины – полипептиды, состоящие из 64-66 аминокислотных остатков, обладают схожей пространственной организацией. N-концевой домен содержит три дисульфидные связи, а в кислом С-концевом домене Туг63 содержит сульфогруппу [333].

Гирудины являются бивалентными ингибиторами тромбина прямого действия и блокируют одновременно два функциональных сайта: N-концевой домен гирудинов связывается с субстрат-связывающим участком активного центра тромбина, в С-концевой домен – с анион-связывающим экзосайтом тромбина [334 - 335]. Высокая специфичность связывания гирудина с тромбином во многом определяется наличием сульфатированного тирозина 63. Несульфатированные рекомбинантные аналоги гирудина обладают пониженной антикоагулянтной активностью [336]. С помощью структурных исследований комплекса гирудин-тромбин были определены аминокислотные остатки, ответственные за сродство с тромбином [337 - 339]. Эти данные послужили основой для создания многочисленных модифицированных аналогов с более высокой антитромбической активностью [340 - 342].

Нами была разработана биотехнология получения рекомбинантных аналогов природного гирудина-1, различающихся своей антитромбической активностью: 63-десульфатогирудина-1 (дезирудин) и [Leu¹, Thr²]-63-десульфатогирудина-1 (лепирудин), содержащего на N-конце две замены Val1Leu и Val2Thr, а также экспериментального аналога, получившего условное название гирудин 1/3, который в дальнейшем оказался менее биологически активен и в технологических разработках не использовался

Создание штаммов продуцентов дезирудина и лепирудина

Первичные структуры дезирудина и лепирудина различаются только двумя первыми аминокислотными остатками, а форма 1/3 является составной из последовательностей лепирудина и гирудина-3 (Рис. 66). Хотя получаемые аналоги гирудина очень близки по

первичной и вторичной структуре, изоэлектрической точке и гидрофобности, тем не менее разрабатываемые технологии выделения и очистки различаются.

Искусственные гены дезирудина, лепирудина и гирудина 1/3 были синтезированы химико-ферментативным способом из синтетических олигонуклеотидов после оптимизации нуклеотидных последовательностей по составу кодонов [343]. Синтезированные гены были клонированы в плазмидный вектор pGEM-5Zf(-) и после подтверждения структуры прямым секвенированием были переклонированы в экспрессионный вектор pTWIN1 по сайтам рестрикции SapI и BamHI.

Таким образом, были получены плазмиды pER-HIR, pER-HIRLep и pER-HIR1/3, несущие ген гибридного белка, содержащего целевой пептид. Этими плазмидами pER-HIR, pER-HirLep и pER-HIR1/3 были трансформированы компетентные клетки штамма *E. coli* ER2566 и полученные штаммы продуценты *E. coli* ER2566/pERID-HIR, *E. coli* ER2566/pERID-HIRLep и *E. coli* ER2566/pER-HIR1/3, соответственно, использовались в дальнейшей работе.

- а) VVYTDCTESGQNLCLCEGSNVCGQGNKCILGSDGEKNQCVTGEGTPKPKQSHNDGDFEETPEEYLO
- б) **LT**YTDCTESGQNLCLCEGSNVCGQGNKCILGSDGEKNQCVTGEGTPKPKQSHNDGDFEETPEEYLO
- в) **LT**YTDCTESGQNLCLCEGSNVCGQGNKCILGSDGEKNQCVTGEGTPKPKQSHN**QGDFFETPEEDAYDE**

Рис. 66. Аминокислотная последовательность рекомбинантных аналогов природного гирудина. а - дезирудин, б – лепирудин, в – гирудин 1/3. Выделены аминокислотные замены в полипептидах по отношению к дезирудину.

Выделение и очистка дезирудина и лепирудина

Как указано выше одной из проблем, связанных с использованием экспрессионных систем на основе интеинов, заключается в невозможности предсказать склонность получаемого гибридного белка к самопроизвольному автокаталитическому расщеплению *in vivo*, приводящее в свою очередь к неоправданным потерям целевого продукта [344]. Таким образом, эффективность процесса в значительной мере определяется структурой гибридного белка, а предсказать заранее результат без экспериментальных данных не представляется возможным.

Электрофоретический анализ экспрессии генов, кодирующих гибридные белки, хорошо иллюстрирует проблемы, возникающие при разработке интеиновых технологий (Рис. 67). Оказалось, что образующийся после индукции гибридный белок, содержащий лепирудин, достаточно стабилен, и за 4 часа при 37 °С уровень его экспрессии достигает 32% от суммарного клеточного белка (дорожки 4 и 5 на Рис. 67). В то же время гибридный белок, содержащий дезирудин, за 3 часа инкубации при 37 °С расщепляется *in vivo* почти на 80 % (Рис. 67, дорожки 2,3). Ферментация при пониженной температуре после индукции снижает этот негативный эффект до 18 % для штамма-продуцента дезирудина и не оказывает

существенного влияния на биосинтез в штамме-производителе лепирудина. При этом в экспериментальном штамме-производителе рекомбинантного гирудина-1/3 (Рис. 67, дорожка 6,7) биосинтез гибридного белка существенно отличался от первых двух штаммов. Для экспериментального штамма-производителя гирудина-1/3 температурная зависимость ровно противоположная – пониженная температура при культивировании существенно повышает степень авторасщепления гибридного белка *in vivo*. Таким образом, культивирование штаммов-производителей проводили при разных температурах: *E. coli* ER2566/pER-HIRLep и ER2566/pER-HIR1/3 – при 37 °С, а ER2566/pER-HIR – при 23 °С.

Следует отметить, что гибридный белок, содержащий дезирудин, синтезировался в растворимой форме, а гибридный белок, содержащий лепирудин, в бактериальных клетках агрегировал в тела включения. Поэтому дальнейшие этапы получения целевых полипептидов различаются на этапах выделения гибридного белка и постановки его расщепления. Поэтому дальнейшие этапы получения целевых полипептидов несколько различаются.

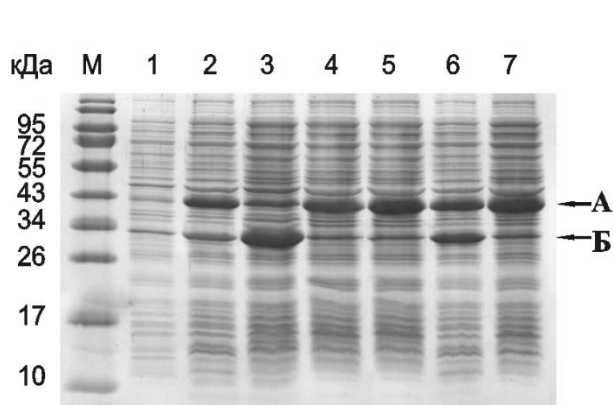


Рис. 67. Анализ биомассы штаммов-производителей *E. coli* ER2566/pER-HIR (дорожки 2, 3), *E. coli* ER2566/pER-HIRLep (дорожки 4, 5) и *E. coli* ER2566/pER-HIR1/3 (дорожки 6, 7). SDS-ПААГ. М – маркеры молекулярной массы; 1 – неиндуцированная клеточная культура; 2, 4, 6 – лизаты после выращивания культуры при 25 °С; 3, 5, 7 – лизаты после выращивания культуры при 37°С; время культивирования 3 ч (2, 3) и 4 ч (4 – 7); А – гибридный белок, Б – белок-носитель (мини-интеин SspDnaB).

При получении дезирудина и гирудина 1/3 выделение гибридных белков из осветленного клеточного лизата проводили с помощью анионообменной хроматографии на колонке с Q Sepharose XL. Чтобы избежать преждевременного расщепления гибридного белка рН всех хроматографических растворов была не ниже 9. Расщепление гибридного белка индуцировали снижением рН до 6.0 и проводили в течение 24 ч при 25°С. Степень автолиза гибридного белка в результате достигала 95% (Рис. 68).

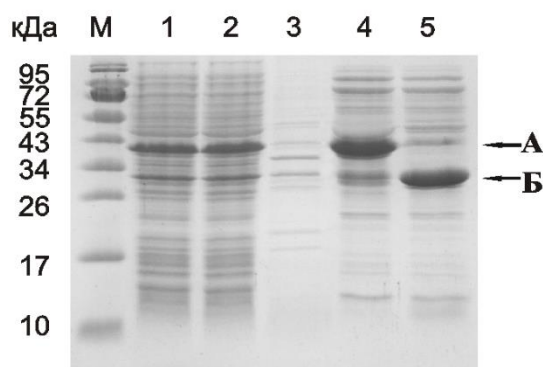


Рис. 68. Электрофоретический анализ поэтапного выделения 63-десульфатогирудина-1. М – маркеры молекулярной массы; 1 – клеточный лизат; 2 – супернатант клеточного лизата; 3 – тела включения; 4 – ренатурация гибридного белка; 5 – расщепление гибридного белка после 24 ч при 25°С при рН 6.0. А – гибридный белок, Б – белок-носитель (мини-интеин SspDnaB).

Поскольку лепирудин образовывал тела включения, то его выделение требовало обязательную стадию солюбилизации гибридного белка из тел включения и последующую его ренатурацию. Для этого при растворении тел включения в буфере с 8 М мочевиной вносили β-меркаптоэтанол. В дальнейшем белковый раствор разводили в 20 раз и инкубировали при перемешивании в течение 24 ч при 10°C при перемешивании (Рис. 69).

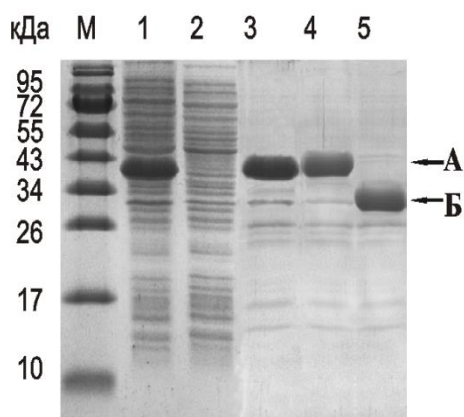


Рис. 69. Выделение и расщепление гибридного белка DnaB-HIRLep. М – маркеры молекулярной массы; 1 – клеточный лизат; 2 – супернатант после центрифугирования клеточного лизата; 3 – тельца включения; 4 – ренатурация гибридного белка; 5 – расщепление гибридного белка через 24 ч при 25°C при pH 6.0. А – гибридный белок, Б – остаточный полипептид (хитин-связывающий домен и интеин *SspDnaB*). Электрофорез в 15% ПААГ в денатурирующих условиях.

Образовавшиеся при расщеплении целевые полипептиды выделяли по одинаковой схеме с помощью последовательных анионообменной хроматографии в градиенте pH и ОФ ВЭЖХ и лиофильно высушивали. Поскольку при тестировании активности форма гирудин 1/3 оказался неэффективным, то от дальнейшей работы с ним отказались.

Масштабирование схемы выделения и очистки дезирудина и лепирудина

Наработку клеточной биомассы штаммов-продуцентов дезирудина и лепирудина проводили в ферментере Electrolux (Швеция) объемом 75 л с объемом загрузки 55 л. Съем клеточной биомассы для обоих штаммов составил около 13.0 ± 1.0 г с литра культуры. В обоих случаях содержание гибридных белков составило не менее 28 %. При этом расщепление гибридного белка DnaB-Hir не превышало 12 %. Было проведено 80-ти кратное масштабирование разработанных лабораторных методик. Единственным изменением было включение в технологический цикл стадии гель-фильтрационной хроматографии перед лиофилизацией. Согласно разработанному лабораторному регламенту из 400 г влажной биомассы штамма-продуцента возможно получение 1030 мг АФС дезирудина и 1050 мг АФС лепирудина в виде лиофилизата. На основании описанных результатов была опубликована работа Костромина М.А. и др. [345] и получен патент РФ № 2435858 [346].



Рис. 71. Схема гибридного белка DnaB-Endo, содержащего [1-49]-фрагмент эндостатина.

Плазмидой pERID-Endo были трансформированы клетки штамма *E. coli* ER2566. Полученный штамм-производитель *E. coli* ER2566/pERID-Endo культивировали в качалочных колбах в питательной среде LB при 37 °С в течение 4 ч после внесения индуктора и при центрифугировании получали до 5 г влажных клеток с литра клеточной культуры. При этом гибридный белок накапливался в нерастворимой форме в виде тел включения в количестве до 37 % от суммарного клеточного белка и не претерпевал автокаталитического расщепления *in vivo* (Рис. 72).

Выделение и очистка рекомбинантного [1-49]-фрагмента эндостатина

Схема выделения гибридного белка DnaB-Endo практически полностью повторяет методику, разработанную для пигастина. Однако для эффективного расщепления (до 80 %) гибридного белка потребовалось внесение в раствор до 0.2 М NaCl для предотвращения агрегации, снижающей выход целевого продукта практически до 20 % (Рис. 72). Собственно расщепление индуцировали снижением pH до 6.5 и проводили в течение 12 ч при 25 °С.

Агрегаты гибридного белка DnaB-Endo отделяли центрифугированием и дальнейшую очистку [1-49]-фрагмента эндостатина проводили с помощью тангенциальной ультрафильтрации с использованием мембраны из регенерированной целлюлозы с размером пор 10 кДа. Концентрирование целевого белка также проводили с помощью ультрафильтрации на мембране с размером пор 5 кДа.

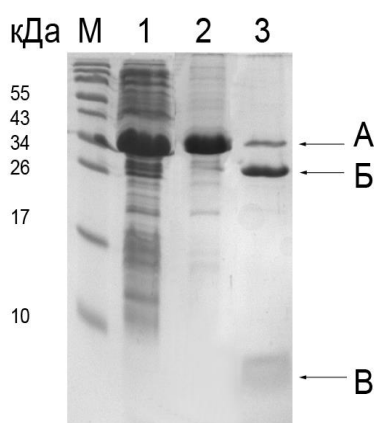


Рис. 72. Электрофоретический анализ содержания гибридного белка DnaB-Endo при культивировании штамма-производителя ER2566/pERID-Endo и его расщепление при выделении. Электрофорез в 15% ПААГ в денатурирующих условиях. М — стандарты молекулярных масс; 1 — тотальный клеточный лизат; 2 — экстракт тел включения; 3 — расщепление гибридного белка DnaB-Endo: pH 6.5, буфер с 0.2 М NaCl, инкубация 24 ч А — гибридный белок DnaB-Endo, Б — лидерный полипептид (интеин *SspDnaB* и хитин-связывающий домен), В — [1-49]-фрагмент эндостатина.

Окончательную очистку целевого пептида осуществляли с помощью ОФ ВЭЖХ и объединяли и лиофилизовали фракции, содержащие пептид с хроматографической чистотой более 98 % (Рис. 73А). Основной пик в масс-спектре [1-49]-фрагмент эндостатина наблюдали

при m/z 5338,73 (Рис. 73Б), что соответствует теоретически рассчитанной массе пептида (5338,12 Да).

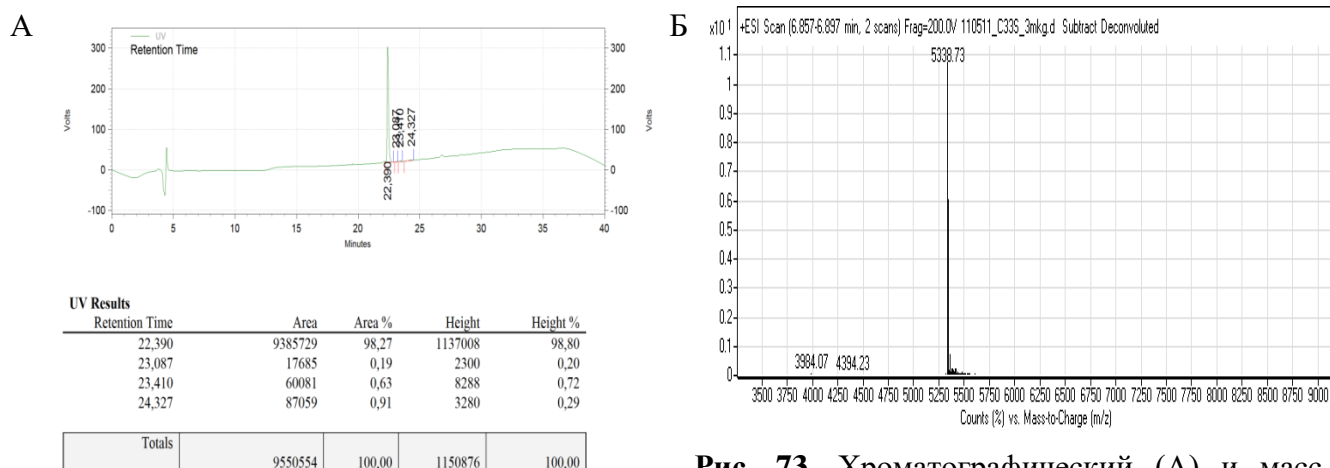


Рис. 73. Хроматографический (А) и масс-спектрометрический (Б) анализ [1-49]-фрагмента эндостатина

Конечный выход продукта составил 4.8 мг с 1 г влажных клеточной биомассы или 19 мг с л клеточной культуры. Всего было получено и передано для проведения биологических исследований 30 мг фармацевтической субстанции рекомбинантного [1-49]-фрагмента эндостатина.

4.3. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного модифицированного фрагмента фактора дифференцировки пигментного эпителия человека – основного компонента лекарственного средства «Пигастин»

Фактор дифференцировки пигментного эпителия (PEDF) – гликопротеин (MW 50 кДа), секретируемый клетками пигментного эпителия. PEDF относится к группе ингибиторов сериновых протеаз и является эффективным эндогенным ингибитором ангиогенеза, препятствуя миграции эндотелиальных клеток, блокируя патологический рост сосудов за счет снижения экспрессии VEGF, ключевого проангиогенного фактора [349 – 352]. Нами было показано, что [44 – 77] фрагмент PEDF, содержащий на С-конце стабилизирующую последовательность ProGlyPro, обладает всем спектром антиангиогенных эффектов полноразмерного гликопротеина: блокирует миграцию и индуцирует апоптоз эндотелиальных клеток, подавляет патологическую неоваскуляризацию сосудистой оболочки глаза и роговицы [353 – 356]. Поэтому для медико-биологических исследований и для возможного практического применения именно этот фрагмент представляет особый интерес. Ниже представлены результаты разработанной биотехнологии получения модифицированного рекомбинантного [44 – 77] фрагмента PEDF, который получил название пигастин.

Создание штамма-продуцента гибридного белка DnaB-PGS

Синтетический ген, кодирующий пигастин, был синтезирован химико-ферментативным методом (Рис. 74) и клонирован в экспрессионный вектор pTWIN1.

А

Asp-Pro-Phe-Phe-Lys-Val-Pro-Val-Asn-Lys-Leu-Ala-Ala-Ala-Val-Ser-Asn-Phe-Gly-
 GAT-CCS-TTC-ITT-AAA-GTT-CCG-GTT-AAC-AAA-CTG-GCG-GCA-GCC-GTT-TCT-AAC-TTT-GGC-
 Tyr-Asp-Leu-Tyr-Arg-Val-Arg-Ser-Ser-Met-Ser-Pro-Thr-Thr-Asn-Pro-Gly-Pro
 -TAC-GAT-CTG-TAC-CGT-GTT-CGT-TCT-TCC-ATG-TCT-CCG-ACC-ACT-AAC-CCG-GGT-CCG

Б

SapI P-1 P-2
 5' -GGTGGTGCTCTTCCAACGATCCGTTCTTTAAAG • TTCGGTTAACAAACGGCCAGCCGTTTCTAACTTTG •
 3' -CCACCACGACAAAGGTTGCTAGGC • AAGAAATTCAAGGCCAATTTGTTGACCG • CCGTCGGCAAGATGAAAC
 P-5 P-6 P-7
 P-3 P-4
 GCTACGATCTGTACCCTGTTCTTCCATGTCT • CCGACCACTAACCCGGGTCGTAAGGATCCACCAAC-3'
 CGATGCTAGACATGGCACAAGCAAGGAGTACAGAGCTGGT • GATGGGCCAAGGCATTTCCTAGGTGGTGG-5'
 P-8 P-9 BamHI

Рис. 74. Искусственный ген пигастина - PEDF-(44–77). А – аминокислотная последовательность и соответствующая оптимизированная последовательность нуклеотидов; Б – схема синтеза искусственного гена из олигонуклеотидов P1–P9. Точкой обозначены участки лигирования соседних олигонуклеотидов.

Полученной плазмидой pERID-PGS трансформировали клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) и получили в результате штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pERID-PGS. При культивировании штамма синтезируется в виде тел включения гибридный белок DnaB-PGS, состоящий из хитин-связывающего домена (CBD) интеина SspDnaB и целевого [44 – 77] фрагмента PEDF (Рис. 75). Была сделана оценка накопления гибридного белка в зависимости от условий культивирования. Наблюдалось преждевременной автокаталитическое расщепление *in vivo*: при 23 °C после внесения ИПТГ уровень автолиза достигал 45% через 4 часа культивирования, а при 37 °C – только 12%. Съём влажной биомассы при выращивании при 37 °C составлял около 4.9 г с литра клеточной культуры, а содержание гибридного белка не менее 28 % относительно общих клеточных белков.



Рис. 75. Схема строения гибридного белка, содержащего пигастин.

Выделение и расщепление гибридного белка DnaB-PGS

Для подбора условий расщепления гибридного белка DnaB-PGS проводили несколько параллельных экспериментов. Поскольку пигастин не содержит дисульфидных связей, то длительная ренатурация гибридного белка после экстракции из тел включения не требовалась. Поэтому непосредственно после разбавления раствора солиобилизованного гибридного белка в

8М мочеvine перешли к оценке эффективности расщепления. Уже при снижении рН до 7.5 ожидаемо происходило значительное выпадение целевого гибридного белка (до 60 %), что связано с близостью рI гибридного белка DnaB-PGS (рI 7.39). Поэтому основным вариантом было работа при рН ниже изоэлектрической точки. Для этого непосредственно после солубилизации рН раствора белка в 8 М мочеvine снижали до значений 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0. А затем разбавляли в 20 раз буфером для ренатурации и расщепления, содержащим 20 % глицерин с тем же рН и инкубировали в течение 20 часов при 23 °С. Использование раствора без глицерина приводило к немедленному выпадению белка, т.е. глицерин выполнял стабилизирующую функцию. После 30 мин перемешивания наблюдали выпадение белка в образцах с рН больше 6.6 (от 29 до 54% белка согласно измерению концентрации белка). В образцах с рН 6.0, 6.2 и 6.4 в присутствии 20 % глицерина за время инкубации выпало 15, 20 и 26 % гибридного белка, соответственно. При этом во всех случаях гибридный белок, оставшийся в растворе, расщеплялся полностью (по электрофоретическому анализу). Таким образом, среди проведенных экспериментов наилучший результат (высокая эффективность расщепления и низкая степень агрегации не более 15 %) был показан при ренатурации белка при рН 6.0 в присутствии 20% глицерина. Использование в качестве раствора для ренатурации других буферных растворов (25 мМ NaH₂PO₄, рН 6.0, 5 мМ EDTA, 20% глицерин или 50 мМ HEPES, рН 6.0, 5 мМ EDTA, 20% глицерин) не привело к уменьшению степени выпадения гибридного белка.

Очистка пигастина

Теоретически рассчитанные изоэлектрические точки PEDF, гибридного белка DnaB-PEDF и остаточного белка CBD-DnaB составляли 9.58, 7.39 и 6.51, соответственно. Такая разница в рI позволила разработать двухэтапную методику хроматографической очистки PEDF. На первом этапе осуществляли очистку PEDF от остаточного белка и нерасщепленного гибридного белка (менее 2%). Для этого проводили загрузку белкового раствора при рН 8.5 на колонку с анионообменным сорбентом Q Sepharose XL. В ходе нанесения происходило связывание остаточного белка с сорбентом, в то время как PEDF элюировался с колонки. На втором этапе осуществляли концентрирование целевого белка с помощью катионообменной хроматографии на сорбенте SP Sepharose XL при рН 4.3 в линейном градиенте концентрации NaCl. Последующую очистку PEDF осуществляли с помощью ОФ ВЭЖХ Фракции, содержащие целевой белок с чистотой 98%, объединяли и лиофильно высушивали. В результате было получено 36 мг PEDF с чистотой не менее 98%, Выход составил 9.8 мг пептида с 1 литра клеточной культуры. Потери при выделении связаны с преждевременным расщеплением гибридного белка на 12% *in vivo*, а также с выпадением 15% гибридного белка при расщеплении.

Создание штамма-продуцента гибридного белка GyrA-PGS

Поскольку при разработке вышеописанной схемы мы столкнулись с рядом трудностей, приведших к снижению выхода целевого продукта, была разработана новая технология, лишенная этих недостатков. Был сконструирован новый экспрессионный вектор pERIG, в котором в качестве белка-носителя использован мини-интеин *MxeGyrA*. Общая схема строения гибридного белка осталась неизменной. В качестве штамма-носителя также был использован штамм *E.coli* BL21(DE3). Синтезирующийся в виде тел включения гибридный белок GyrA-PGS не претерпевал значительного расщепления *in vivo*: уровень автолиза не превышал 5 %. Съем влажной биомассы при выращивании при 37 °C составлял около 5.0 г с литра клеточной культуры, а содержание гибридного белка не менее 37 % относительно общих клеточных белков (Рис. 76).

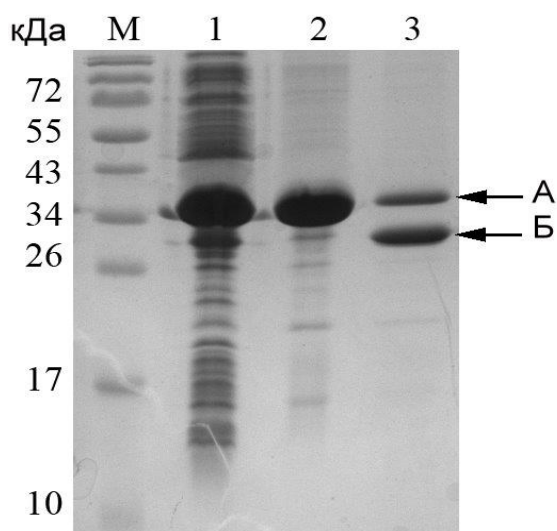


Рис. 76. Электрофоретический анализ биосинтеза и расщепления гибридного белка GyrA-PGS в денатурирующих условиях. М – стандарты молекулярных масс; 1 – тотальный клеточный лизат штамма-продуцента BL21(DE3)/pERIG-PGS; 2 – экстракт телец включения; 3 – расщепление гибридного белка. А – гибридный белок GyrA-PGS. Б – белок-носитель (GyrA).

Очистка пигастина

Вплоть до стадии постановки расщепления гибридного белка была повторена технология из схемы I. Ввиду значительно более низкого значения *pI* у гибридного белка GyrA-PGS (6.07), расщепление при *pH* в диапазоне от 6.5 до 7.0 не сопровождалось выпадением белка, но требовало более длительной инкубации: не менее 70 % после 48 ч инкубации при 23 °C. После завершения стадии расщепления ввели этап осаждения значительной части примесных белков при *pH* 4.3. Разница в *pI* между остаточным и гибридным белком и целевым продуктом (5.70, 6.07 и 9.58, соответственно) позволила значительно сократить схему очистки до одной хроматографии на колонке с катионообменным сорбентом MacroPrep High S. При нанесении при *pH* 4.3 происходила сорбция всех продуктов расщепления гибридного белка. А разделение происходило в 2 стадии: в градиенте *pH* от 4.3 до 7.5 и от 0 до 100 mM NaCl проводили элюцию остаточного белка-носителя и нерасщепившегося гибридного белка, а целевой полипептид элюировали ступенью 500 mM NaCl.

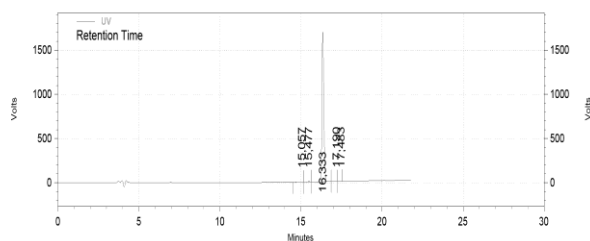
Последующую очистку PEDF осуществляли в соответствии со схемой I. Выход пигастина составил 16.3 мг белка с литра клеточной культуры.

Масштабирование технологии выделения и очистки пигастина

При ферментации штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pERIG-PEDF в 75 л ферментере с загрузкой 50 л культуры было наработано 830 г биомасса, что соответствует съему 16.6 г с литра клеточной культуры. При этом содержание гибридного белка составило не менее 38 %. Расщепление *in vivo* происходило не более чем на 5 %.

Было проведено выделение пигастина из 200 г клеточной биомассы. Расщепление проводили в объеме 19 л в течение 66 ч при 23 °С с эффективностью не менее 74 %. После завершения стадии расщепления гибридного белка целевой полипептид выделяли с помощью катионообменной хроматографией на MacroPrep High S, ОФ ВЭЖХ и гель-фильтрационной хроматографий. Очищенный препарат обессоливался и лиофилизировался в стерильных условиях. За один технологический цикл было наработано 690 мг АФС пигастина в виде лиофилизированного порошка с практическим выходом около 50 %. Что соответствует выходу не менее 57 мг целевого белка с литра клеточной культуры. Анализ конечного продукта с помощью аналитической ВЭЖХ и масс-спектрометрии показал высокую чистоту – не менее 98% (Рис. 77). Препарат был передан на поведение биологических и доклинических исследований.

А



UV Results					
Retention Time	Area	Area %	Height	Height %	
15,057	82373	0,15	6174	0,09	
15,477	267554	0,49	29021	0,43	
16,333	54578197	99,29	6774222	99,45	
17,190	21352	0,04	1725	0,03	
17,483	16479	0,03	805	0,01	
Totals		54965955	100,00	6811947	100,00

Б

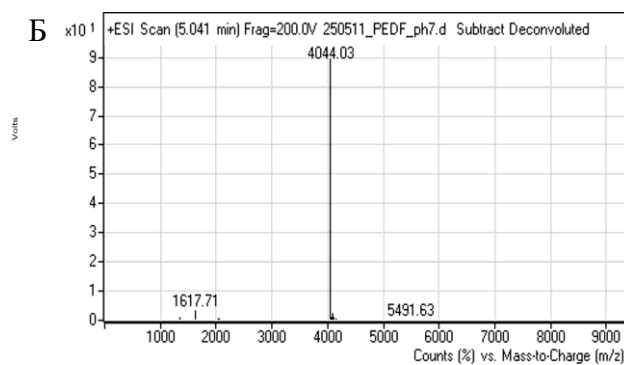


Рис. 77. Хроматографический и масс-спектрометрический анализ АФС пигастина. А – хроматографический профиль пептида. ВЭЖХ на колонке с сорбентом Prosphere C-18; Б – ESI-TOF масс-спектр целевого пептида.

На основании описанных результатов была опубликована работа Есипов Р.С. и др. [357] и получен патент РФ № 2664199 [358].

4.4. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного оксинтомодулина

Оксинтомодулин – это 37-членный пептидный гормон, образующийся в результате процессинга препроглюкагона в кишечнике и мозге после еды [359 - 361]. Его уникальная биологическая активность – подавление усвоения пищи и существенное снижение аппетита – делает это пептид весьма интересным для медицинского применения. Однако низкое содержание этого полипептида в природных источниках делают его выделение из животного сырья абсолютно нерентабельным. Поэтому нами была разработана биотехнология интееин-опосредованного получения рекомбинантного оксинтомодулина.

Создание штамма-продуцента оксинтомодулина

Нуклеотидная последовательность, кодирующая целевой полипептид, была синтезирована химико-ферментативным методом, клонирована в экспрессионный вектор pTWIN1 по сайтам SapI и BamHI (Рис. 78).

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-
CAT-TCT-CAG-GGC-ACG-TTT-ACC-AGC-GAT-TAT-AGC-AAA-TAC-CTG-GAC-TCT-CGT-CGC-GCG-
Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Lys-Asn-Asn-Ile-Ala-Ter
CAG-GAT-TTC-GTG-CAG-TGG-CTG-ATG-AAC-ACC-AAA-CGC-AAC-AAA-AAC-AAC-ATT-GCG-TAA

Рис. 78. Аминокислотная последовательность оксинтомодулина и нуклеотидная последовательность кодирующего его гена.

Полученная плазида pER-Oxm была использована для трансформации клеток штамма *E.coli* ER2566. В результате был получен штамм-продуцент *E.coli* ER2566/pEROxm. Его культивирование проводили при 37 °С в течение 5 ч после внесения индуктора белкового биосинтеза. При этом гибридный белок накапливался в виде тел включения в количестве не менее 30 % от суммарного клеточного белка.

Лабораторная методика выделения и очистки оксинтомодулина

Поэтому после разрушения клеток тела включения, содержащие гибридный белок, отделяли центрифугированием и солюбилизировали в буферном растворе с 6М мочевиной. Ренатурацию проводили в течение 16 ч при 4°С путем 20х кратного разведения буфером с рН 9,0, содержащим 10% глицерина. Следует отметить, при ренатурации соблюдали ограничение в концентрации гибридного белка: при более 0.3 мг/мл происходило выпадение гибридного белка в осадок. После чего инициировали расщепление снижением рН. Следует отметить, что автокаталитическое расщепление на хитиновом сорбенте в условиях, традиционно

используемых для расщепления гибридных белков на основе интеина *Ssp DnaB*, в этом случае проходило неэффективно (Рис. 79, дорожки 5 и 6). Поэтому расщепление проводили в растворе. При этом оценивали эффективность расщепления по двум параметрам: времени инкубации (до 48 ч) и рН (от 6.0 до 7.5 с шагом 0.5 единиц) (Рис. 79). Поскольку рI гибридного белка составляла 6.52, то при значениях близких к рН 6.5, гибридный белок ожидаемо необратимо агрегировал. Было показано, что оптимальными условиями расщепления является инкубация в течение 16 ч при рН 7.0, при которых расщепляется не менее 90 % гибридного белка (Рис. 79, дорожки 7 и 8). Увеличение длительности инкубации приводит к частичной деградации отщепленного оксинтомодулина. Для предотвращения деградации рН реакционной смеси через 16 часов после начала расщепления снижали до 4.0.

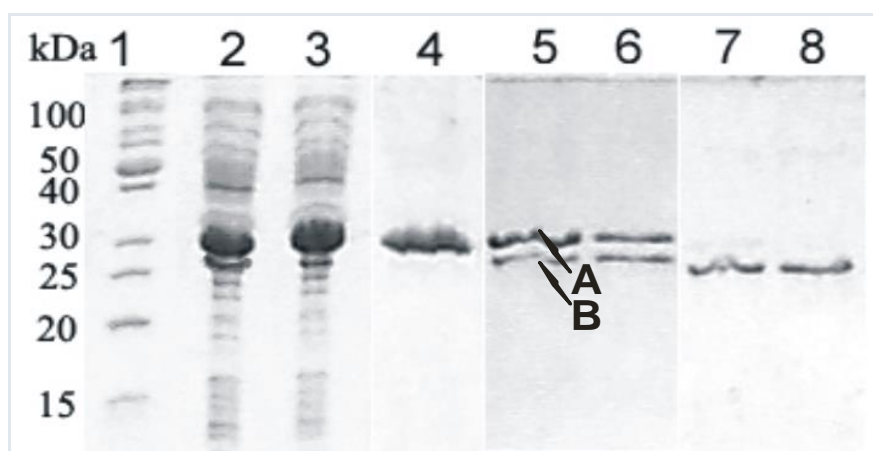


Рис. 79. Электрофоретический анализ продуктов автокаталитического расщепления гибридного белка DnaB-Oxm в различных условиях.

А - гибридный белок DnaB-Oxm, В - продукт автокаталитического расщепления белка DnaB-Oxm; пептидный продукт (оксинтомодулин) детектировали при помощи ВЭЖХ.

1 - стандарты молекулярных масс 10-200 кДа; 2-3 - тотальный клеточный лизат; 4 – отмытые тела включения; 5 - 6 - автокаталитическое расщепление гибридного белка на хитиновом сорбенте после индукции в течение 24 ч (5) и 36 ч (6); 7 - 8 - автокаталитическое расщепление гибридного белка в растворе после индукции в течение 12 ч (7) и 24 ч (8).

После завершения реакции расщепления выпавший в осадок белок отделяли центрифугированием, а дальнейшую очистку оксинтомодулина от остаточного пептида и ГБ, не выпавшего в осадок, производили при рН 7.0 с помощью катионообменной хроматографии на колонке с сорбентом SP Sepharose HP в линейном градиенте NaCl.

Окончательную очистку оксинтомодулина проводили с помощью ОФ ВЭЖХ (Рис. 80). Очищенный продукт обессоливали, используя сорбент P2 BioGel и лиофилизовали в стерильных условиях.

Выход оксинтомодулина с хроматографической чистотой не менее 98 %, составил 20.6 мг на 1 литр культуры (36 % от теоретического выхода и выход до 6% относительно суммарного белка клетки). Разработанная лабораторная методика была в дальнейшем

отмасштабирована и использована для процесса получения модифицированного оксинтомодулина – оксинтолонга.

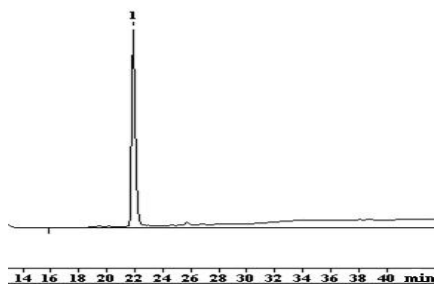


Рис. 80. Хроматографический анализ оксинтомодулина после очистки с помощью препаративной ОФ ВЭЖХ. 1 – оксинтомодулин.

На основании описанных результатов была опубликована работа Степаненко В.Н. и др. [362] и получен патент РФ № 2524204 [363].

5. Получение модифицированных рекомбинантных полипептидов с улучшенными фармакологическими свойствами

Природные полипептиды оксинтомодулин и тимозин $\beta 4$ в организме млекопитающих быстро метаболизируют за счет протеолитических ферментов. Поэтому увеличение времени полупревращения этих соединений *in vivo* способствует увеличению времени терапевтического воздействия, т.е. улучшает фармакологические свойства препарата. Для повышения устойчивости рекомбинантных белков в составе готовых лекарственных форм используют различные приемы: от ковалентной модификации белков низкомолекулярными и высокомолекулярными агентами до создания комплексов с биополимерами.

Полисиаловая кислота – природный биополимер, входящий в состав молекул адгезии нервных клеток млекопитающих и являющийся компонентом клеточной стенки некоторых бактерий (Рис. 81). Полисиаловую кислоту часто используют для ковалентной модификации белков и пептидов. Существует коммерчески доступный препарат полисиаловой кислоты, позволяющий воспроизводимо получать модифицированные белковые производные [364 - 365].

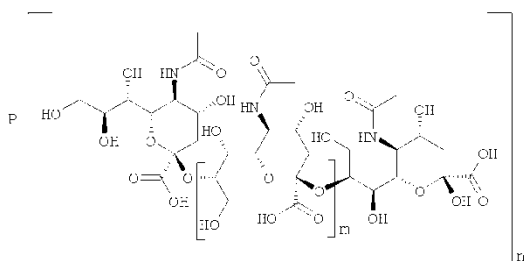


Рис. 81. Схематическое изображение структуры белка, модифицированного полисиаловой кислотой, где: $m=20-110$; $n=1-4$; P - биологически активный рекомбинантный белок.

Нами были проведены исследования по увеличению стабильности полученных оксинтомодулина (такой модифицированный полипептид получил коммерческое название оксинтолонг) и тимозина $\beta 4$ после их модификации полисиаловой кислотой. Важным условием

проведения модификаций является сохранение полипептидами их биологической активности, которая делает их столь привлекательными для практического использования в медицине.

Природный тимозин $\beta 4$ содержит на N-концевом сериновом остатке ацетильную группу. Поэтому для нужной модификации мы решили к N-концевому сериновому остатку дезацетилтимозина присоединить полисиаловую кислоту (ПСК). Модификация протекает в две стадии. Сначала к N-концевому сериновому остатку присоединяется бутиральдегидное производное полисиаловой кислоты с образованием нестабильного основания Шиффа. На второй стадии при восстановлении цианборгидридом натрия образуется стабильный конъюгат (Рис. 82).

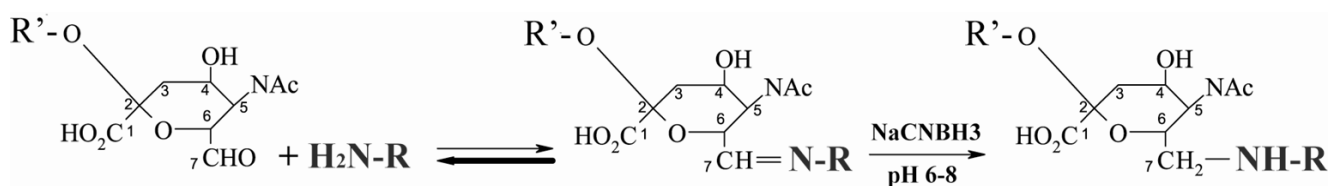


Рис. 82. Схема химического сиалирования пептидов.

Варьируя условия проведения первой стадии (температура, время, pH, соотношение ПСК/полипептид, содержание ацетонитрила в растворе) удалось добиться за три часа 60 % выхода модифицированного полипептида. Выделенный с помощью препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ модифицированный полипептид был проанализирован пептидным картированием в совокупности с хромато-масс-спектрометрическим анализом протеолитической смеси. Было подтверждено наличие ПСК-группы на N-конце полипептида. Изучение сравнительной стабильности в сыворотке крови кролика показало, что в аналогичных условиях время полупревращения полипептидов для природного тимозин $\beta 4$ составляет 2 часа, а для ПСК-модифицированного полипептида – 6 часов. На основании описанных результатов была опубликована работа Макаров Д.А. и др. [366] и получен патент РФ № 2605385 [267].

Аналогичная работа была проделана по получению модифицированного оксинтомодулина – оксинтолонга. Оптимальные условия для синтеза препарата: концентрация оксинтомодулина 1 - 1,5 мг/мл; pH 4.5; содержащий ацетонитрила 30%; конечная концентрация NaCNBH₃ 4-5 мг/мл; мольное соотношение ПСА:оксинтомодулин = 2÷3:1; температура 25-30°C; время реакции 3 часа. Очищенный с помощью препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ препарат прошел все необходимые доклинические испытания. В настоящее время получено разрешение Минздрава России на проведение клинических исследований лекарственного препарата «Оксинтолонг, лиофилизат для приготовления раствора для подкожного введения, 50 мг». В следующем разделе приведены результаты создания промышленной биотехнологии получения «Оксинтолонга».

6. Разработка промышленной биотехнологии получения рекомбинантных полипептидов на основе интеиновых систем

В предыдущих подразделах 2 и 4 были изложены результаты исследований двух различных биотехнологических подходов для получения активных фармацевтических субстанций на основе полипептидов. Накопленный опыт позволил перейти к разработкам промышленных биотехнологий, которые были в конечном счете реализованы в созданных промышленных и опытно-промышленных регламентах на получение лекарственных средств на основе рекомбинантных полипептидов. Ниже изложены основные результаты этих исследований.

6.1. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции на основе рекомбинантного глюкагона – лекарственного средства «Глюкоран»

Глюкагон - гормон, участвующий в углеводном и липидном обмене и представляющий собой 29-членный пептид, синтезируемый в альфа-клетках островков Лангерганса (Рис. 83). Глюкагон обеспечивает надежный контроль постоянного уровня глюкозы, являясь одним из антагонистов инсулина [368]. В качестве лекарственного средства глюкагон применяется при тяжелых гипогликемических состояниях и гипогликемической коме, возникающих у больных сахарным диабетом после инъекции инсулина или приема пероральных сахаропонижающих препаратов, в качестве «скорой помощи» в случае тяжелой гипогликемии, при интоксикации бета-адреноблокаторами и антагонистами кальция. Глюкагон применяется также с диагностической целью при рентгенологических исследованиях.

HSNGTPTSNTSKTLNSRRAQDPVQWLMNT

Рис. 83. Аминокислотная последовательность глюкагона человека.

В мировой практике рекомбинантный глюкагон обычно получают в составе гибридного белка, содержащего лидерную последовательность для транспорта в периплазматическое пространство клетки [369 - 370]. Однако, в этих способах для расщепления гибридного белка используется весьма дорогостоящая специфическая протеаза V8 из *Staphylococcus aureus*. Описаны масштабные биотехнологии получения глюкагона, в том числе с использованием дрожжей, и последующим выделением гормона из культуральной среды [371 - 372]. В РФ глюкагон не производится, и лекарственные формы препарата импортируются. Для создания отечественной технологии получения глюкагона был выбран биотехнологический способ его получения на основе экспрессии искусственного генно-инженерного конструкта в штамм-продуценте.

В качестве экспрессионной системы для получения глюкагона была выбрана коммерчески доступная система IMPACT-TWIN компании New England BioLabs и создан штамм-продуцент гибридного белка, состоящего из интеина *DnaB* из *Synechocystis sp.* и целевой полипептид - глюкагон. Поэтому разработка методики получения глюкагона сводится к следующим этапам:

- 1) разработка генетической конструкции, продуцирующей гибридный белок,
- 2) наработка и очистка гибридного белка,
- 3) подбор оптимальных условий автокаталитического расщепления гибридного белка,
- 4) окончательная очистка целевого пептида,
- 5) анализ конечного продукта.

Создание штамма-продуцента для получения рекомбинантного глюкагона

Синтетический ген, кодирующий глюкагон человека, клонировали в плазмидный вектор pGEM-5Zf(-). После подтверждения последовательности, ген глюкагона был переклонирован в экспрессионный вектор pTWIN1. Полученной экспрессионной плазмидой pER-G1 были трансформированы клетки штамма *E. coli* BL21(DE3). В результате был создан штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pER-G1, при культивировании которого синтезируется гибридный белок DnaB-Glu.

Было разработано три варианта схемы получения глюкагона из гибридного белка DnaB-Glu. В первом варианте оптимизацией стадии культивирования добились синтеза гибридного белка в растворимой форме. Для этого штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3)/pERG1 культивировали в течение 14-16 ч при 14 °C после внесения ИПТГ. При таком варианте культивирования более 70 % гибридного белка находилось в растворимой форме. Однако, при этом не менее 25 % гибридного белка подвергалось автокаталитическому расщеплению *in vivo*. Попытки предотвратить или хотя бы снизить преждевременное расщепление добавлением в растворы $ZnCl_2$ в диапазоне 1-5 мМ оказались безуспешными. Мы предполагаем, что это связано с модификацией интеина *SspDnaB*, которая привела к отсутствию аминокислотных остатков Cys и Ser в области, ответственной за автокаталитическое расщепление. Одним из последствий такой модификации явилось снижение хелатирующей способности белка, что и выразилось в ослаблении влияния ионов Zn^{+2} на автокаталитическое расщепление.

Было проведено выделение и расщепление гибридного белка из супернатанта на хитиновом сорбенте. При этом значения pH всех растворов (растворы для разрушения клеток, нанесения на сорбент и промывки сорбента) находились в диапазоне от 10 до 11. Это позволило избежать преждевременного автокаталитического расщепления в процессе нанесения на колонку. Расщепление индуцировали снижением pH рабочего раствора до 6.0. При ОФ ВЭЖХ

анализе пептидных продуктов расщепления гибридного белка была обнаружено не менее 3 % формы глюкагона, деградированная с С-конца, что подтвердили данные масс-спектрометрического анализа и С-концевого секвенирования. По-видимому, эти продукты образуются *in vivo* в процессе культивирования после неконтролируемого частичного расщепления гибридного белка в клетках. В литературе проблема частичного протеолиза гибридного белка, содержащего глюкагон, неоднократно отмечалась, и одним из путей ее решения предложен вариант экспрессии рекомбинантного гена с образованием агрегированных форм – тел включения [373].

Чтобы избежать протеолиза глюкагона были изменены условия культивирования штамма-продуцента, позволившие получать гибридный белок DnaB-Glu в нерастворимой форме в виде тел включения. Был проведен сравнительный анализ ряда экспрессионных штаммов *E. coli* BL21(DE3), ER2566, Origami(DE3) при культивировании в условиях, обеспечивающих высокий уровень продукции белка DnaB-Glu в виде тел включения (при 37 °C в течение 4-6 часов после внесения ИПТГ). С помощью электрофоретического анализа было показано, что наименьший уровень автокаталитического расщепления (менее 0.2%) достигается в штаммах *E. coli* ER2566 и Origami (в штамме Origami несколько ниже, чем в штамме ER2566). При этом продуктивность штаммов *E. coli* ER2566 и BL21(DE3) была почти в 2 раза выше, чем у *E. coli* Origami, и составляла не менее 150 мг гибридного белка с литра клеточной культуры. Кроме того, при использовании штамма *E. coli* ER2566 удалось добиться получения тел включения с большим содержанием гибридного белка (Рис. 84, 85). Следовательно, для получения глюкагона был выбран штамм-продуцент *E. coli* ER2566/pER-GI.

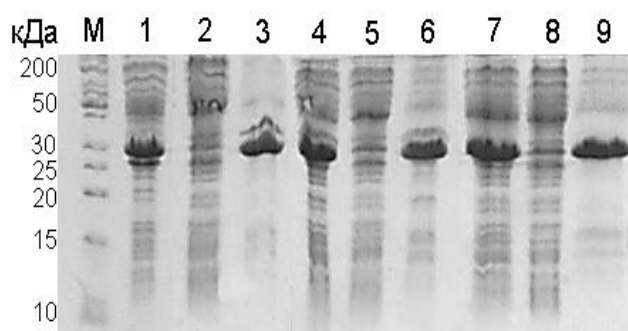


Рис. 84. Электрофоретический анализ накопления гибридного белка DnaB-Glu в штаммах *E. coli*: BL21(DE3)/pERGI (1-3), ER2566/pERGI (7-9), Origami(DE3)/pERGI (4-6). М – стандарты молекулярных масс. 1, 4, 7 – тотальный клеточный лизат; 2, 5, 8 – супернатант после отделения тел включения; 3, 6, 9 – тела включения, солюбилизованные в буфере с 6М мочевиной.

При этом, как мы и предполагали, гибридный белок находящийся в телах включения, деградирует заметно меньше (Рис. 85). Таким образом, подобранные условия культивирования (выращивание при 37°C до оптической плотности культуры D_{600} 0.6-0.7, затем индукция ИПТГ и инкубация 4 ч. при 37 °C) позволили практически полностью избежать преждевременного расщепления *in vivo* и одновременно существенно снизить деградацию целевого пептида, а также почти в 3 раза увеличить продукцию гибридного белка по сравнению с первой схемой.

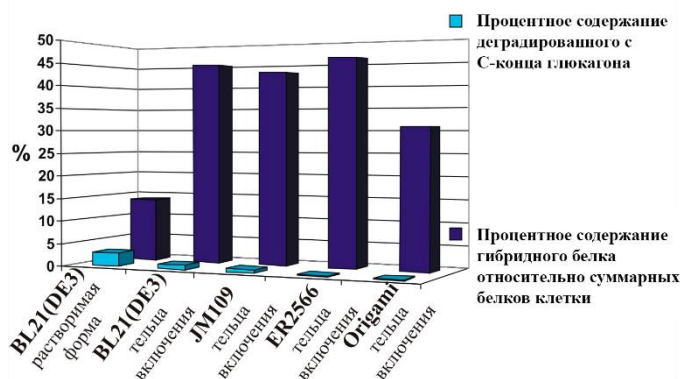


Рис. 85. Процентное содержание гибридного белка относительно суммарных белков клетки и деградированного с С-конца глюкогена в различных штаммах *E. coli*.

Масштабирование стадии культивирования штамма-продуцента

Для разработки лабораторной методики и ее дальнейшего масштабирования вначале проводили ферментацию штамма-продуцента *E.coli* ER255/pER-GL. Штамм-продуцент был запатентован в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН (патент № 2302465) [374]. Для проведения циклов ферментаций был создан рабочий банк штамма продуцента со сроком хранения 1 год для использования в приготовлении посевного материала для ферментации штамма-продуцента.

Посевной материал готовили из рабочего банка непосредственно перед циклом ферментации штамма-продуцента *E.coli* ER2556/pER-GL в количестве 2 л с оптической плотностью культуральной жидкости не менее 5 о.е. Засев ферментера производили посевным материалом в стерильную жидкую питательную среду объемом 200 л. Ферментация проводилась под контролем АСУ ТП (автоматизированной системы управления технологическим процессом). Проводили постоянный мониторинг температуры, рН среды, давления в аппарате, расхода воздуха и скорости перемешивания (Рис. 86) в соответствии с программой «Культивирование». Оптимальную концентрацию растворенного кислорода (pO_2) поддерживали, скорость вращения мешалки. Для корректировки рН в процессе выращивания продуцента использовали стерильный раствор глюкозы и 25% раствор аммиака. Скорость подачи стерильного раствора глюкозы регулировали вручную, не допуская защелачивания культуральной жидкости по показаниям величины рН.

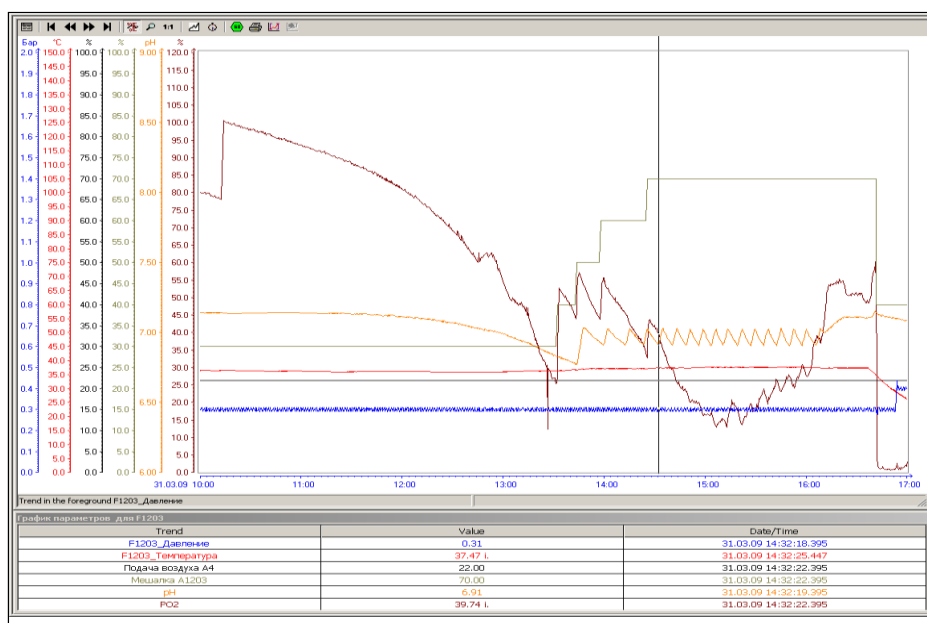


Рис. 86. График контроля параметров по АСУ ТП при ферментации штамма-продуцента *E.coli* ER255/pER-GL.

Экспериментально были найдены оптимальные условия для индукции синтеза целевого белка – гибридного рекомбинантного белка, содержащего интеин и глюкагон, и окончания ферментации. Индукцию синтеза белка проводили ИПТГ при оптической плотности культуральной жидкости $OD_{600}=5-6$ о.е., а сбор клеток – при $OD_{600}=11-13$ о.е. Весь цикл ферментации занимал 5-6 часов, а рост клеток после индукции – 2-2,5 часа. По окончании ферментации культура выращенных клеток должны была соответствовать следующим критериям: оптическая плотность $OD_{600}=12 \pm 1$ о.е., отсутствие посторонней микрофлоры при микроскопировании, типичность морфологии - мелкие палочки, содержание целевого белка – не менее 23 %.

Оптимизированные таким образом условия позволяли получать 210 л культуральной жидкости с содержанием гибридного белка на уровне 23 % от суммарного белка клетки (Рис. 87). Съём клеточной биомассы составил 10.0 ± 1.0 г с литра культуры.

Основными требованиями спецификации для суспензии клеток при остановке ферментации и съеме биомассы были следующие:

1. Оптическая плотность культуральной жидкости 12 ± 1 о.е.
2. Съём сырой биомассы с 1 л культуральной жидкости $10,0 \pm 1,0$ г
3. Содержание влаги в биомассе 72 ± 1 %
4. Содержание гибридного белка от суммарного клеточного белка $23/0 \pm 2/5$ %

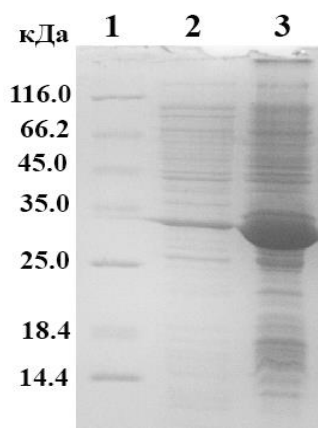


Рис. 87. Электрофоретический анализ биосинтеза гибридного белка в процессе ферментации штамма-продуцента *E.coli* ER255/pER-GL.

- 1 – маркеры молекулярных масс;
- 2 – белки культуральной жидкости до индукции ИПТГ;
- 3 – белки культуральной жидкости после индукции ИПТГ

Сразу по окончании ферментации культуральная жидкость подвергалась сепарации для отделения биомассы от культуральной жидкости. Полученную биомассу или подвергали сразу дезинтеграции, или хранили при температуре не выше – 40 °С.

Разработка лабораторной методики выделения и очистки глюкагона

Отмывку тел включения, полученных при разрушении клеточной биомассы, первоначально проводили в деионизованной воде и буфере для разрушения, как и при лабораторной методике. Однако, в дальнейшем при оптимизации от такого варианта отказались, поскольку при двойной отмывке происходила значительная потеря (до 8 %) гибридного белка без обогащения тел включения. Тела включения после обработки содержали не менее 84 % гибридного белка.

Была исследована растворимость тел включения при разных концентрациях мочевины в буфере в присутствии 2 мМ ДТТ. В буфере, содержащем 6 М мочевины, в раствор из тел включения переходит 96% белка в течение 1 – 2 ч при температуре 10 °С. Известно о высокой растворимости белков при высоких значениях рН и низких концентрациях хаотропных агентов. Такой способ растворения тел включения является более мягким, поскольку не происходит нарушения вторичной структуры белка, и обеспечивает его эффективный рефолдинг.

Мы исследовали солубилизацию тел включения в буфере с 2 М мочевиной при рН 11.0. При данных условиях полученные нами тела включения полностью растворялись в течение 30 минут при 4°С. Щелочная среда и 2М мочевины дестабилизировали взаимодействия, способствующие агрегации гибридного белка в тела включения, и агрегированный белок быстро растворялся. Однако, дальнейший хромато-масс-спектрометрический анализ показал, что при этих условиях происходят химические модификации глюкагона человека, основным продуктом которых является сульфоксид-глюкагона (продукт окисления метионина) ~ 40 % (Рис. 88А).

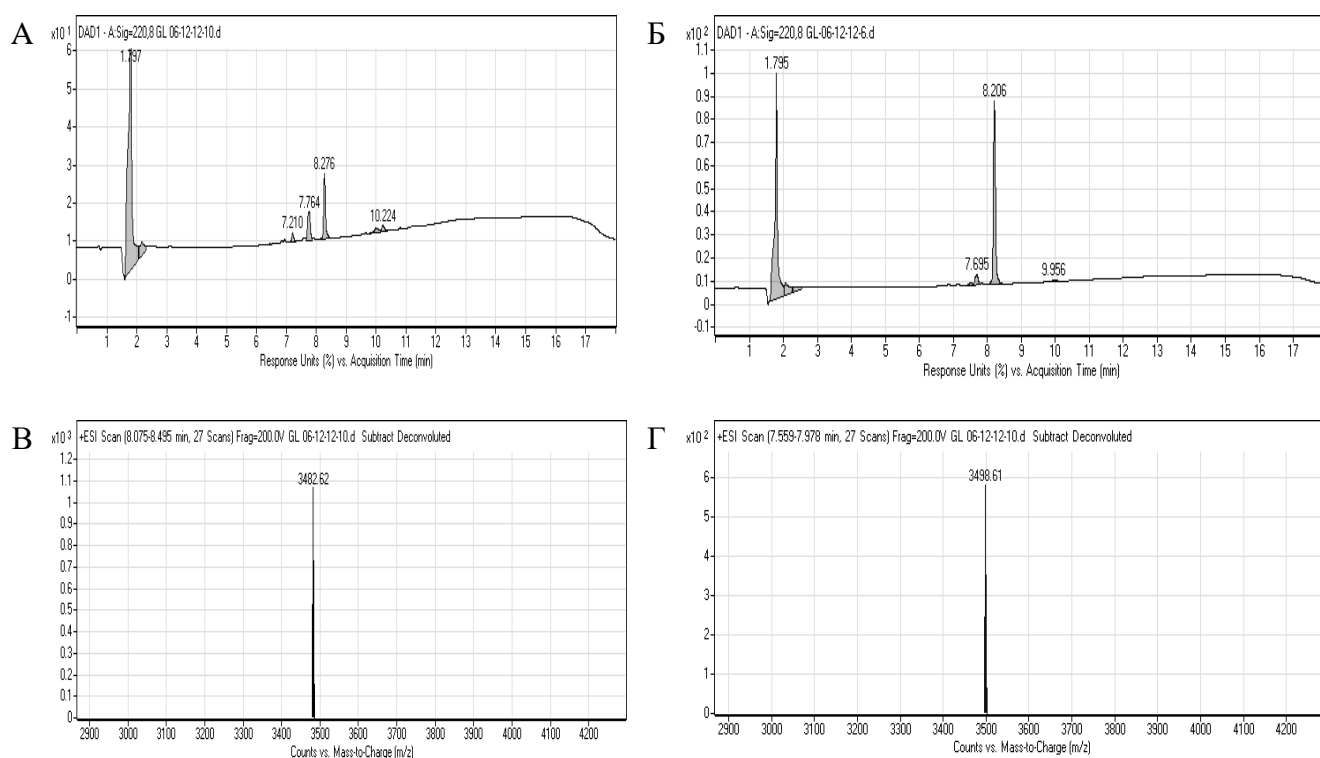


Рис. 88. Влияние условий солюбилизации тел включения на модификации глюкагона человека. Хромато-масс-спектрометрический анализ осуществляли на приборе 6224 ESI-TOF (Agilent) с колонкой YMC-Pack C₈ (150×2,1 мм; YMC Europe). А – солюбилизация при pH 11.0; Б – солюбилизация при pH 9.0 и 6 М мочевины; 1 – глюкагон человека, 2 – сульфоксид глюкагона человека; В – масс-спектр пика 1; Г – масс-спектр пика 2.

При солюбилизации буферным раствором pH 9.0, содержащим 6 М мочевины степень модификации глюкагона не превышает 5 % (Рис. 88Б). Таким образом, оптимальным является солюбилизация буферным раствором pH 9.0 с 6 М мочевиной.

При оптимизации стадий культивирования и солюбилизации тел включения для очистки гибридного белка использовали методику, предполагающую расщепление гибридного белка на хитиновом сорбенте. Однако, эффективность в таком варианте была недостаточной (не более чем на 70 %). Оптимизация этой стадии побудила нас разработать вариант, в котором предполагалось провести расщепление в растворе.

Ренатурацию, совмещенную с автокаталитическим расщеплением, осуществляли пульсовым методом разведения. Раствор солюбилизированных тел включения порциями вносили в буфер для ренатурации до концентрации суммарного белка 0.5 – 0.8 мг/мл, при этом концентрация хаотропного агента не превышала 0.8 М. Мы оценили влияние различных параметров на степень автокаталитического расщепления гибридного белка:

1) Влияние тиольного реагента и температуры.

На первом этапе мы оценили влияние тиольных реагентов, таких как ДТТ и MESNA, на С-концевое расщепление модифицированного мини-интеина *SspDnaB*, хотя в существующих

публикациях такое влияние отрицалось [375]. В нашем случае максимальный выход целевого пептида наблюдался в присутствии 2 мМ ДТТ, при чем, это увеличение эффективности расщепления сопровождалось и ростом его скорости (Рис. 89). При этом, с ростом температуры значительно снижалось время, необходимое для расщепления белка, но не эффективность.

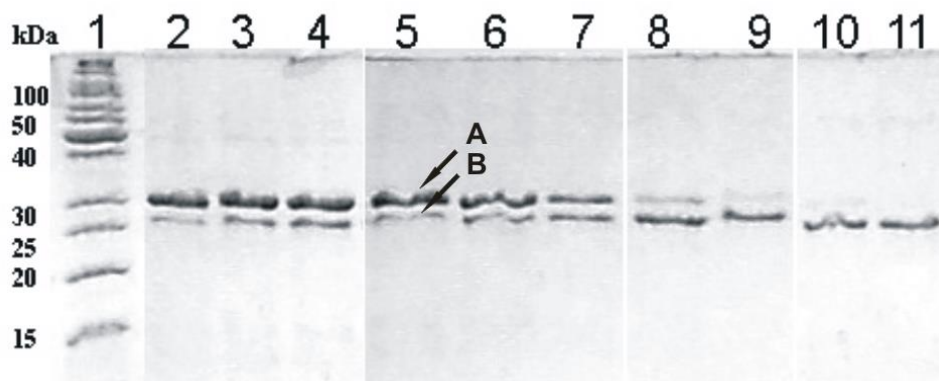


Рис. 89. Электрофоретический анализ продуктов автокаталитического расщепления гибридного белка DnaB-Glu в различных условиях.

А - гибридный белок DnaB-Glu, Б – остаточный белок

1 – стандарты молекулярных масс 10-200 кДа

2 – 4 – расщепление гибридного белка через 12 ч после индукции (2), 24 ч (3) и 36 ч (4);

5 – 7 – расщепление гибридного белка в присутствии 2мМ MESNA через 12 ч после индукции (5), 24 ч (6) и 36 ч (7);

8 – 9 – расщепление гибридного белка в присутствии 0.5 мМ ДТТ через 12 ч после индукции (8) и 24 ч (9);

10 – 11 – расщепление гибридного белка в присутствии 2 мМ ДТТ через 12 ч после индукции (10) и 24 ч (11);

2) Влияние pH

Оценивали влияние pH на расщепление и возможную агрегацию гибридного белка. Как и в случае с оксинтомодулином, pI (6.5) гибридного белка практически совпадала с pH, оптимальном для постановки реакции автокаталитического расщепления. Ожидаемо гибридный белок при значениях, близких к pI, выпадал в осадок. Максимальный выход целевого пептида (не менее 80 % расщепления после 8 ч инкубации) наблюдался при расщеплении в буфере с pH 7.0 в присутствии 2 мМ ДТТ. (Рис. 90).

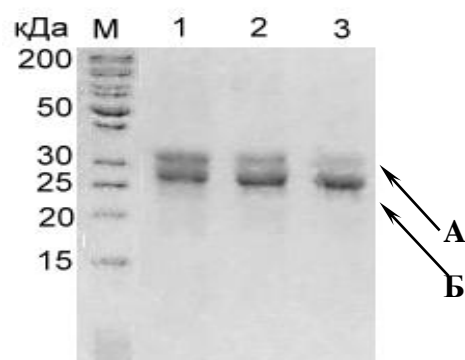


Рис. 90. Электрофоретический анализ эффективности расщепления гибридного белка DnaB-Glu при различных значениях pH. 13%-ДСН-ПААГ. М – стандарты молекулярных масс, А – гибридный белок, Б – Остаточный белок. 1 – при pH 8.0; 2 – при pH 7.5; 3 – при pH 7.0.

3) Оптимизация длительности автокаталитического расщепления

Мы исследовали скорость расщепления гибридного белка при подобранных оптимальных условиях (Рис. 91). При инкубации в течение 8 ч степень расщепления составляла не менее 80 %, а через 16 ч достигала ~ 90 – 95%. Но дальнейшее увеличение времени расщепления при нейтральных значениях рН приводило лишь к накоплению продуктов деградации и модификации глюкагона и не увеличивает степень расщепления.

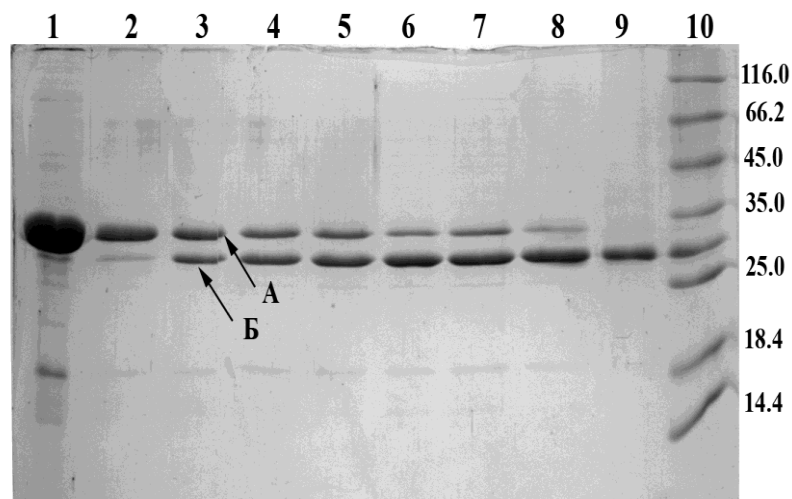


Рис. 91. Кинетика автолиза ГБ при оптимизированных условиях реакции. Электрофорез в 13%-ном ПААГ; А – гибридный белок, Б – остаточный белок (мини-интеин *SspDnaB* с CBD). 1 – экстракт тел включения; 2 – белковый раствор до индукции расщепления; 3 – 9 – белковый раствор через 2, 3, 4, 5, 6, 8 и 16 ч автолиза соответственно; 10 – маркеры молекулярных масс

Для предотвращения деградации целевого пептида через 16 часов после начала автолиза рН реакционной смеси снижали до 3.0, при этом значительная часть остаточного и гибридного белка (до 80 %) выпадала в осадок, а глюкагон человека оставался в растворе (Рис. 92). После завершения автолиза и формирования осадка раствор осветляли центрифугированием.

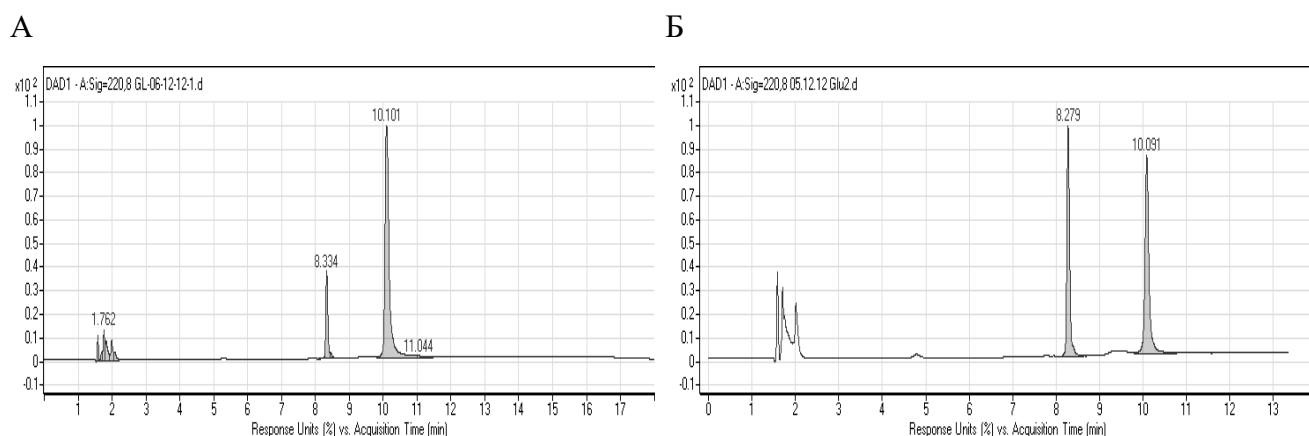


Рис. 92. Влияние рН реакционной смеси на содержание глюкагона в смеси продуктов автолиза. Хроматографический анализ осуществляли на приборе 6224 ESI-TOF (Agilent) с колонкой YMC-Pack C₈ (150×2,1 мм; YMC Europe). А - рН смеси продуктов автолиза 7.0; Б - рН смеси продуктов автолиза 3.0; 1 - глюкагон человека, 2 – мини-интеин *SspDnaB*

Очистку глюкагона от примесных белков, не выпавшего в осадок, производили с помощью тангенциальной ультрафильтрации на мембране с размером пор 10 кДа из регенерированной целлюлозы (Рис. 93). Полученный фильтрат помимо глюкагона содержал не

более 5 % примесных белков. Этот метод обеспечивал высокие скорости фильтрации и может быть использован для очистки глюкагона в промышленных масштабах.

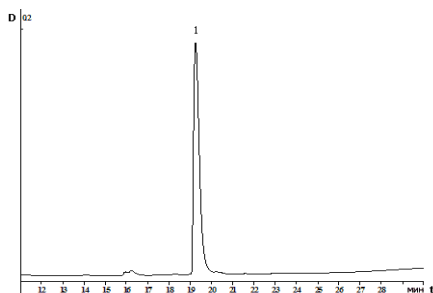


Рис. 93. ОФ ВЭЖХ анализ продуктов фильтрата после тангенциальной ультрафильтрации раствора с продуктами расщепления гибридного белка DnaB-Glu. 1 – глюкагон.

Финальная очистка целевого продукта проводилась с помощью катионообменной хроматографии и ОФ ВЭЖХ. В результате этот лабораторный способ позволил получить глюкагон человека высокой степени чистоты не менее 98 % (Рис. 94).

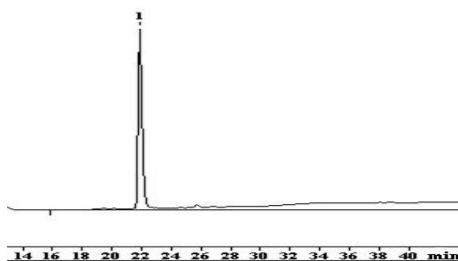


Рис. 94. ОФ ВЭЖХ анализ рекомбинантного глюкагона

Масштабирование лабораторной технологии выделения и очистки АФС рекомбинантного глюкагона человека

Лабораторная методика получения глюкагона была рассчитана на 1-10 г исходной клеточной биомассы [376]. Увеличение загрузки потребовало изменений как аппаратных и технологических на всех стадиях процесса. Первое изменение – разрушение биомассы и отмывка тел включения. Для разрушения биомассы вместо ультразвукового дезинтегратора был использован гидродинамический дезинтегратор. Разрушение клеток существенно ускорилось, полнота лизиса – не менее 95%. Загрузка тел включения в технологический цикл составляла 100 г.

Все дальнейшие этапы оптимизированной лабораторной методики от сольубилизации тел включения до очистки глюкагона с помощью ультрафильтрации и катионообменной хроматографии были масштабированы. При расщеплении гибридного белка в течение 16 ч эффективность составила не менее 90 %. Для отделения белкового осадка, образовавшегося при снижении рН до 3.0 использовали центрифугирование с проточным ротором. Для дальнейшей очистки глюкагона человека от примесей использовали тангенциальную ультрафильтрацию в резервуаре объемом 1 л линией постоянной подачи раствора, а для его концентрирования – катионообменную хроматографию на колонне с сорбентом SP Sepharose FF в линейном

градиенте концентрации хлорида натрия. Фракции, содержащие глюкагон человека чистотой не менее 80%, объединяли и проводили очистку с помощью ОФ ВЭЖХ на полупрепаративной колонке Диасорб-130-С16Т 7 мкм. Фракции, содержащие глюкагон человека хроматографической чистотой не менее 98 %, объединяли и наносили на колонку гель-фильтрационную колонку с сорбентом P2 Biogel. Полученный элюат лиофильно высушивали. Выход целевого пептида составил 730 мг со 100 г тел включения.

Основными недостатками такой технологической схемы является:

1. длительное время автокаталитической реакции расщепления ГБ с высвобождением глюкагона приводит к накоплению побочных примесных продуктов;
2. на стадии ультрафильтрации и концентрирования на катионите образуются значительные потери целевого продукта.

Доработка и масштабирование технологического процесса

Детальное изучение кинетики реакции расщепления гибридного белка DnaB-Glu в большом объеме (20 л) показало, что реакция значительно замедляется примерно через 6 – 8 ч при степени расщепления 75 – 80 % (Рис. 95). Дальнейшее увеличение продолжительности реакции до 48 часов приводило к весьма незначительному увеличению степени расщепления гибридного белка (4 – 5%), однако значительно увеличивало накопление сульфоксида глюкагона и продуктов деградации полипептида с С-конца.

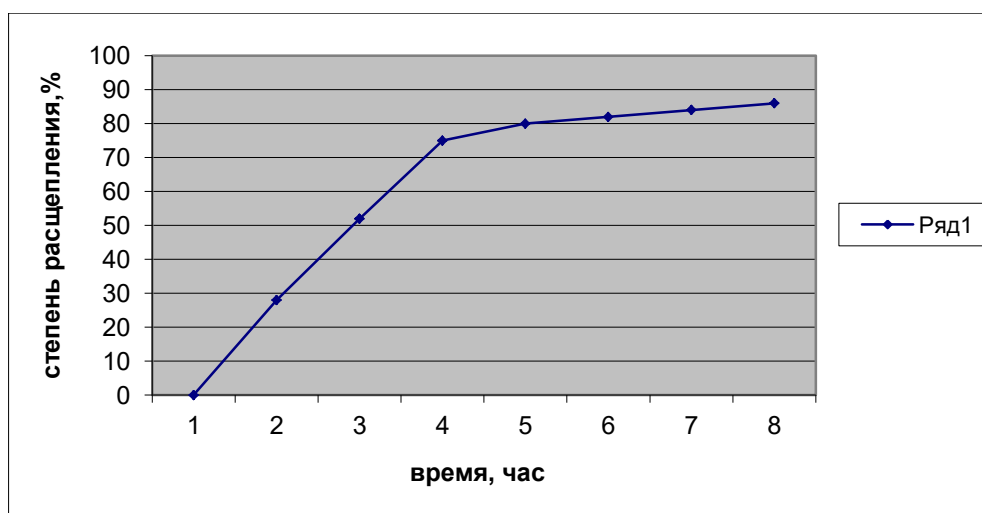


Рис. 95. Динамика расщепления гибридного белка DnaB-Glu при масштабировании.

Следует отметить, что интенсивное перемешивание на этой стадии проводило только к увеличению доли побочных продуктов и не изменяло степени автолиза (II на Рис. 96А). Таким образом, для промышленного объема производства оптимальное время автокаталитического расщепления ГБ – 6 часов.

После завершения автолиза и закисления реакционной смеси до pH 3.0 формировался белковый осадок, который отделяли проточным центрифугированием. Мы отказались от тангенциальной ультрафильтрации из-за значительных потерь вещества (до 15 %) вследствие необратимой сорбции на мембране. Поэтому стадии ультрафильтрации и концентрирования на сорбенте SP Sepharose XL и заменили на катионообменную хроматографию на сорбенте Масрогрер High S. Подобранный программа разделения позволила не только сконцентрировать целевой продукт, но и осуществить его отделение от остаточного и гибридного белков, не выпавших в осадок.

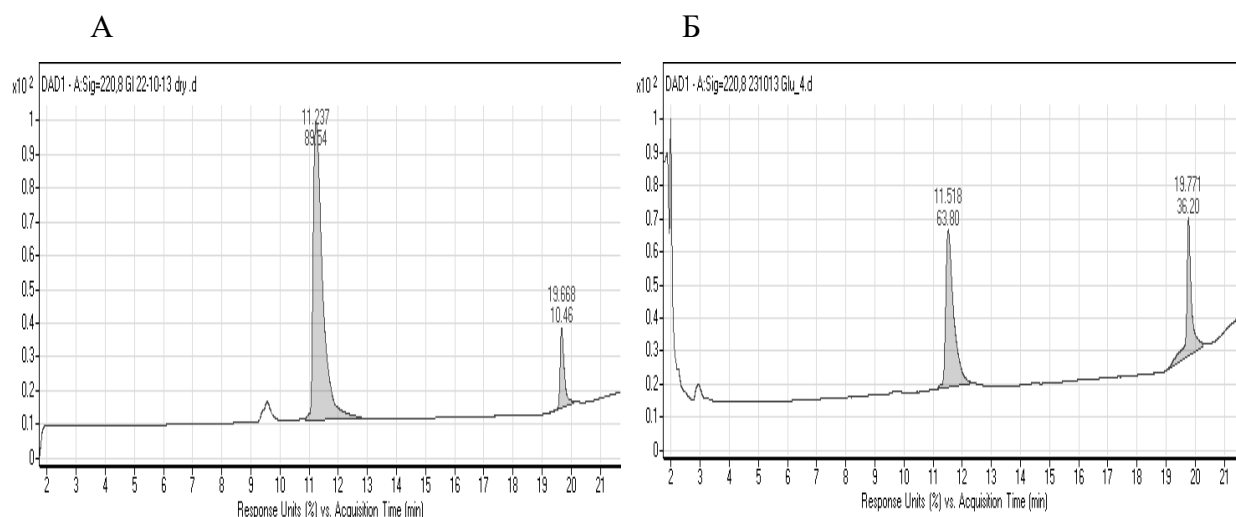


Рис. 96. ОФ ВЭЖХ анализ пептидных продуктов расщепления гибридного белка. А) 48 ч автолиза при интенсивном перемешивании; Б) 6 ч автолиза без перемешивания. I – целевой глюкагон, II – сульфоксид глюкагона.

Для увеличения нагрузочной емкости и скорости нанесения реакцию смесь было разумно закислить вплоть до pH 2.5. Однако при таких условиях в объединенной фракции полученной после катионообменной хроматографии наблюдалось образование родственного продукта с той же молекулярной массой, что и у глюкагона (Рис. 97).

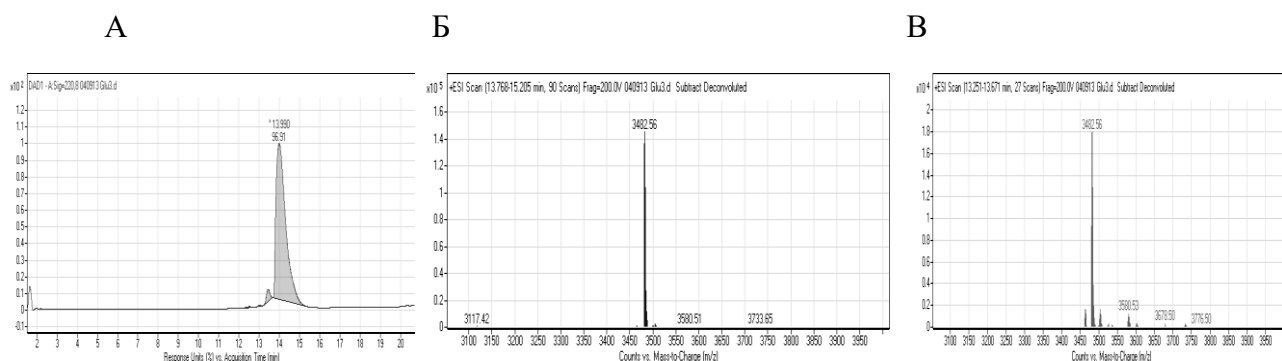
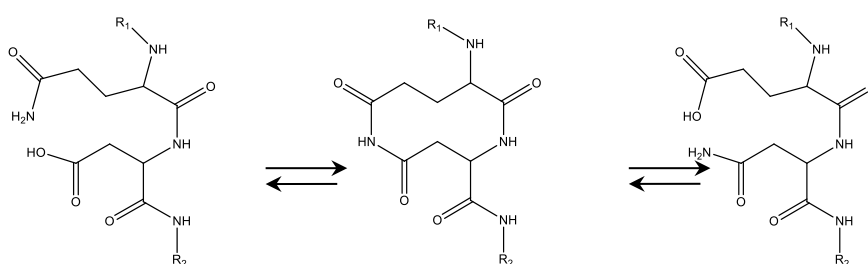


Рис. 97. Хромато-масс-спектрометрический анализ объединенной фракции, полученной после катионообменной хроматографии на сорбенте Масрогрер High S. Использован прибор 6224 ESI-TOF (Agilent) с колонкой YMC-Pack C₈ (150×2,1 мм; YMC Europe). А) – ОФ ВЭЖХ хроматограмма; Б) – масс-спектр пика II, В) – масс-спектр пика I.

Известно, что при частичном кислотном гидролизе белка часто образуются пептиды не соответствующие природному фрагменту из-за инверсии порядка аминокислот. Одной из причин инверсии может являться образование промежуточного имидного производного, легко протекающее в разбавленных кислотах при комнатной температуре. Гидролиз этих циклических соединений может привести как к исходному, так и к изомерному пептиду с обращенной последовательностью аминокислот

В последовательности глюкагона остаток глутамина соседствует с остатком аспарагиновой кислоты, следовательно, при кислой среде возможна инверсия через промежуточное имидное производное с образованием остатков глутаминовой кислоты и аспарагина (Рис. 98)

А)



Б) HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT



Рис. 98. Предполагаемый механизм образования региоизомера глюкагона.

Мы изменили pH реакционной смеси при нанесении на колонку до pH 3 – 3.2 и в дальнейшее проведение процесса при pH не ниже 3.0 позволило избежать образования побочного продукта (Рис. 99). Таким образом, оптимальным значением pH при катионной хроматографии на этой стадии является 3.0-3.2.

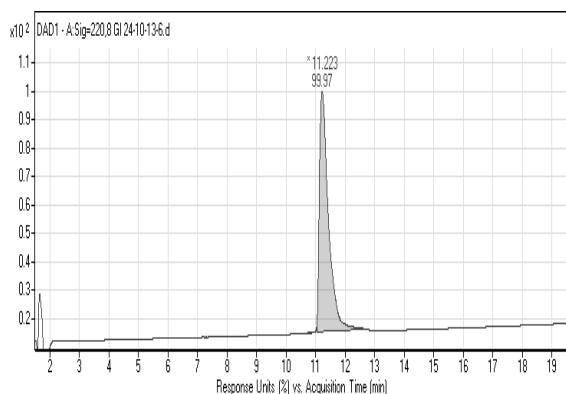


Рис. 99. ОФ ВЭЖХ анализ объединенной фракции, полученной после катионообменной хроматографии с нанесением реакционной смеси при pH 3.2. Использован прибор 6224 ESI-TOF (Agilent) с колонкой YMC-Pack C₈ (150×2,1 мм; YMC Europe).

Масштабирование процесса выделения глюкагона с помощью ОФ ВЭЖХ проводилось на колонке 100x700 мм с сорбентом Диасорб 130 C16T с сохранением основных параметров разделения, что и при лабораторном выделении. После чего проводили удаление компонентов

буферов для ОФ ВЭЖХ с помощью гель-фильтрационной хроматографии на колонне с сорбентом BioGel P-2DG.

Выход одного полного технологического цикла составил не менее 1000 ± 50 мг активной фармацевтической субстанции рекомбинантного глюкагона с хроматографической чистотой 98 %. Полученную АФС передавали для приготовления готовой лекарственной формы.

6.2. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного пуротоксина 1 – основного компонента лекарственного средства «Пунальгин»

Одним из потенциальных высокоэффективных препаратов анальгетического действия является пуротоксин-1, впервые выделенный в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН из яда среднеазиатского паука-«волка» *Alopecosa marikovskiyi* [377 - 378]. Этот пептид, состоящий из 35 аминокислотных остатков содержит 8 цистеиновых остатков, образующих «жесткий каркас» за счет внутримолекулярных S-S связей, так называемый «цистеиновый узел» (Рис. 100А).

А) **MGYCAEKGIRCDDIHCSCTGLKCKCNASGYNCVCRKK**

Б) GGTACCATGGGTTACTGCGCTGAGAAGGGTATCCGTTGCGATGACATCCACTGTTGCACCGGTCTGAA
GTGCAAATGCAACGCTTCTGGTTACAACSTGCGTTTGCCGTAAGAAATAGGGATCC

Рис. 100. Аминокислотная последовательность (А) пептида пуротоксина-1 и нуклеотидная последовательность гена, кодирующего пептид РТ1(Б).

Пуротоксин-1 селективно ингибирует пуринаргический рецептор P2X3, который рассматривается в качестве мишени при купировании болевых состояний. Учитывая весьма экзотический источник и крайне низкое содержание природного пуротоксина, для практического применения этого полипептида была разработана биотехнология получения АФС пуротоксина-1, которая является основой препарата «Пунальгин».

Так рекомбинантный РТ1 был получен в штамме *E. coli* ER2566 с выходом 3 мг с 1 л культуры [379]. Для этого ген, кодирующий РТ1, был клонирован в составе экспрессионного вектора рЕТ-32b+ (Novagen, США). Искомый пептид получали в составе гибридного белка, носителем в котором был тиоредоксин. Отделение пептида РТ1 от тиоредоксина проводили с помощью гидролиза гибридного белка каталитической субъединицей энтерокиназы человека, ранее полученной в ИБХ РАН. Такой способ получения РТ1 легко реализуем и оправдан в исследовательской лаборатории, однако оказался слишком дорогостоящим и неудобным для масштабирования, поскольку включал в себя аффинную хроматографию и давал низкий выход целевого белка. Поэтому мы решили оптимизировать описанный выше способ, используя

другие генетические конструкции и, соответственно, изменив технологию выделения целевого пептида. В данной работе были проведено сравнительное исследование получения пуротоксина-1 с помощью двух разных подходов с использованием сайт-специфического расщепления гибридных белков протеазами и автокаталитического при участии интеинов.

Создание штамма-продуцента пуротоксина-1

Было создано четыре генно-инженерные конструкции, содержащих в одной рамке считывания синтетический ген пуротоксина-1 с разными белками-носителями: тиоредоксином А (гибридный белок Trx-PT1), хитин-связывающим доменом (CBD-PT1), модифицированным интеином *MxeGyrA* (GyrA-PT1) и мини-интеином *SspDnaB* (DnaB-PT1) (Рис. 101).

В гибридных конструкциях pTrx-PT1 или pCBD-PT1 в качестве лидера использовались соответственно тиоредоксин А или последовательность хитин-связывающего домена, слитые с целевым полипептидом через сайт узнавания протеиназы вируса гравировки табака (TEV-протеиназа). Значительным преимуществом конструкции на основе хитин-связывающего домена из *Bacillus circulans* является его относительно небольшой размер в сравнении с тиоредоксином [170]. В гибридных конструкциях pGyrA-PT1 и pDnaB-PT1 использовали подход, заключающийся в получении гибридных белков, в которых белками-носителями являлись модифицированные мини-интеины *MxeGyrA* и *SspDnaB*, осуществляющие рН-зависимое автокаталитическое отщеплению целевого пептида.

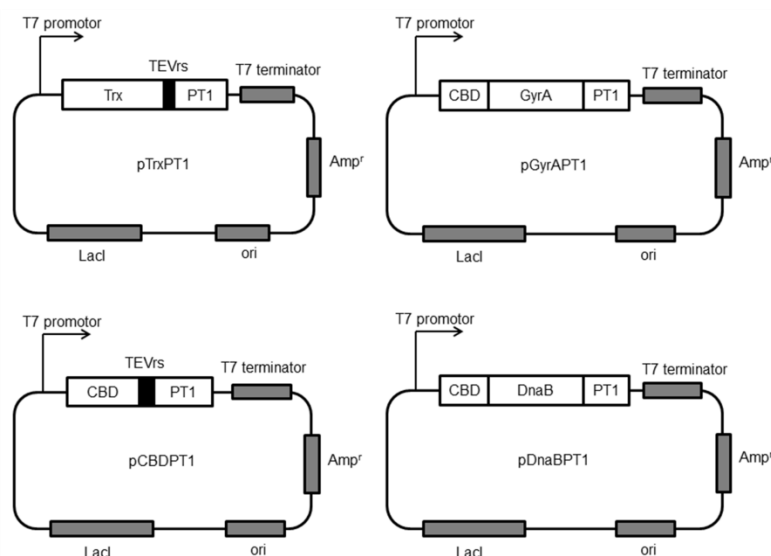


Рис. 101. Схемы экспрессионных векторов: pTrxPT1 и pCBDPT1, pGyrAPT1 и pDnaBPT1. CBD – хитин-связывающий домен, TEVrs- сайт расщепления TEV протеиназы, LacI- ген, кодирующий белок-репрессор, ori – точка начала репликации, Amp^r- ген, кодирующий бета-лактамазу, PT1 – ген, кодирующий пуротоксин-1.

Ген целевого пептида пуротоксина-1 (PT1) (Рис. 101Б), оптимизированный по составу кодонов для экспрессии в бактериальной системе *E.coli*, был синтезирован химико-ферментативным методом и клонирован в перечисленные экспрессионные вектора. Таким образом, были созданы четыре плазмидных вектора pTrxPT1 и pCBDPT1, pGyrAPT1 и pDnaBPT1 (Рис. 101).

Созданные экспрессионные плазмиды были трансформированы клетки штамма-носителя *E.coli* C3030 и проведено сравнение продуктивности полученных штаммов-продуцентов и эффективности расщепления гибридных белков. При культивировании каждого штамм-продуцента гибридные белки синтезировались в растворимой форме в количестве не менее 20 % от суммарного клеточного белка (Рис. 102). Стоит отметить, что для штамма *E. coli* C3030/pDnaB-PT1 (дорожка 1 на рисунке 102, IV) наблюдалось значительное преждевременное автокаталитическое расщепление гибридного белка *in vivo*.

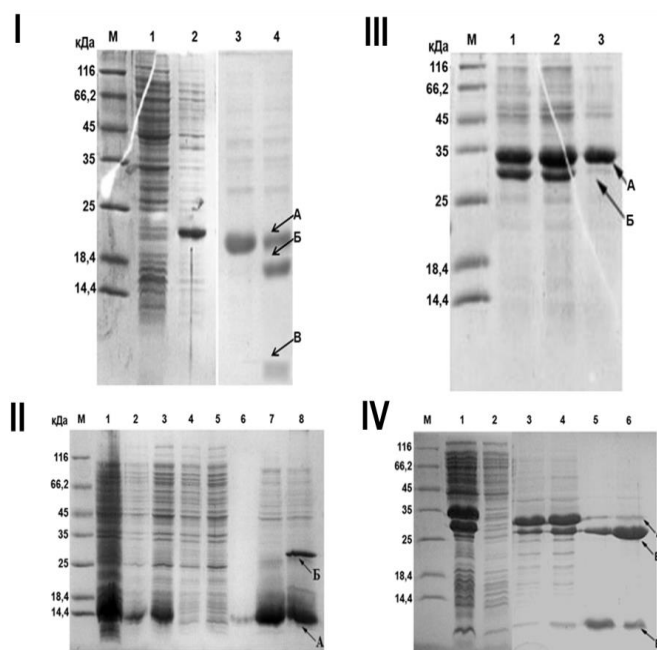


Рис. 102. Электрофоретический анализ продуктивности штаммов продуцентов и эффективности расщепления гибридного белка.

I – Штамм-продуцент *E.coli* C3030/pTrxPT1: М – стандарт молекулярных масс; 1 – тотальный лизат клеток перед добавлением ИПТГ; 2 – тотальный лизат клеток после 4 ч инкубации после добавления ИПТГ; 3 – объединённая фракция после ионообменной хроматографии; 4 – объединённая фракция с ионообменной хроматографии после 24 ч инкубации с TEV протеиназой; А – гибридный белок TrxPT1, Б – остаточный белок, В – PT1.

II – Штамм-продуцент *E.coli* C3030/pCBDPT1: М – стандарты молекулярных масс; 1 – тотальный клеточный лизат; 2 – осадок после разрушения клеток; 3 – осветлённый клеточный лизат; 4, 5 – фракции, не сорбировавшиеся на аффинном сорбенте; 6 – пустая дорожка; 7 – проба с хитинового сорбента после нанесения образца; 8 – проба с хитинового сорбента после 24 ч инкубации с TEV-протеазой; А – TEV протеиназа, Б – гибридный белок CBDPT1.

III – Штамм-продуцент *E.coli* C3030/pGyrAPT1: М – стандарты молекулярных масс, 1 – проба с хитинового сорбента после нанесения; 2 – проба с хитинового сорбента после 24 ч инкубации с ДТТ; 3 – проба с хитинового сорбента после 48 ч инкубации с ДТТ; А – гибридный белок GyrAPT1, Б – остаточный белок GyrA.

IV – Штамм-продуцент *E.coli* C3030/pDnaBPT1: М – стандарты молекулярных масс; 1 – тотальный лизат клеток после 4 ч инкубации с момента добавления индуктора; 2 – фракция, не сорбировавшаяся на аффинном сорбенте; 3 – проба с хитинового сорбента после нанесения; 4 – проба с хитинового сорбента после 4 ч инкубации с ДТТ; 5 – проба с хитинового сорбента после 12 ч инкубации с ДТТ; 6 – проба с хитинового сорбента после 24 ч инкубации с ДТТ; А – гибридный белок DnaBPT1, Б – остаточный белок SspDnaB, В – PT1.

В случае гибридного белка TRX-PT1 очистку осуществляли с помощью ионообменной хроматографии на Q Sepharose HP, а расщепление проводили в растворе. Очистку и расщепление гибридных белков, содержащих хитиновый домен, CBD-PT1, GyrA-PT1 и DnaB-PT1 проводили на хитиновом сорбенте. Наиболее существенным различием полученных гибридных белков оказалась различная эффективность их расщепления. Так гибридные белки,

содержащие сайт узнавания TEV-протеазы (TRX-PT1 и CBD-PT1), при соотношении фермента к гибриднему белку 1:100 за 24 часа расщеплялись не более чем на 30 % (Рис. 102, I и II). Гибридный белок, содержащий модифицированный мини-интеин *MxeGyrA* за то же время расщеплялся примерно на 15 % (Рис. 102, III). В этих же условиях гибридный белок, содержащий модифицированный мини-интеин *SspDnaB*, расщеплялся почти на 90 % (Рис. 102, IV). При этом было показано, что в ходе культивирования целевой продукт не подвергается протеолизу *in vivo* из-за своей жесткой третичной структуры. Соответственно, штамм-продуцент *E. coli* C3030/pDnaBPT1 на основе мини-интеин *SspDnaB* был использован для создания промышленной биотехнологии.

Масштабирование и оптимизация технологии получения пуротоксина

Съем клеточной биомассы при ферментации штамма-продуцента *E. coli* C3030/pDnaBPT1 в 75-литровом ферментере составил не менее 15 г биомассы с 1 л культуральной среды. При этом также происходило значительное преждевременное автокаталитическое расщепление гибридного белка *in vivo*.

Для снижения потерь пуротоксина-1 мы отказались от классической схемы очистки, предложенной фирмой-производителем, когда сорбция и расщепление гибридного белка *in vitro* осуществляется на хитиновом сорбенте. Поскольку целевой полипептид, отщепленный *in vivo* в ходе биосинтеза, получался, также как и гибридный белок, в растворимой форме, то непосредственно после получения осветленного клеточного лизата проводили расщепление оставшегося гибридного белка в растворе при pH 6.0 в течение 16 ч при 4 °С. Суммарный целевой полипептид сорбировали на колонку BPG 100/500 с катионообменным носителем MacroPrep High S (Bio Rad, США). Таким образом, замена аффинной хроматографии на ионообменную предотвратила потери, которые происходили бы при использовании классической схемы выделения на аффинном сорбенте.

Для осаждения остаточных белков снижали pH белкового раствора до значения 3.0 и инкубировали в течение 3 ч. при 4⁰С. Супернатант отделяли от осадка центрифугированием на проточном роторе и проводили катионообменную хроматографическую очистку на колонке с катионообменным носителем MacroPrep High S, элюируя целевой пуротоксин-1 линейным градиентом концентрации хлористого натрия.

Окончательная очистка полипептида была проведена с помощью препаративной ОФ ВЭЖХ на колонне Kromasil 300-10-C18 (GMBH, Германия). Целевой полипептид с хроматографической чистотой не менее 98% очищали от компонентов элюента ВЭЖХ гель-фильтрационной хроматографией на Biogel P2 и лиофильно высушивали.

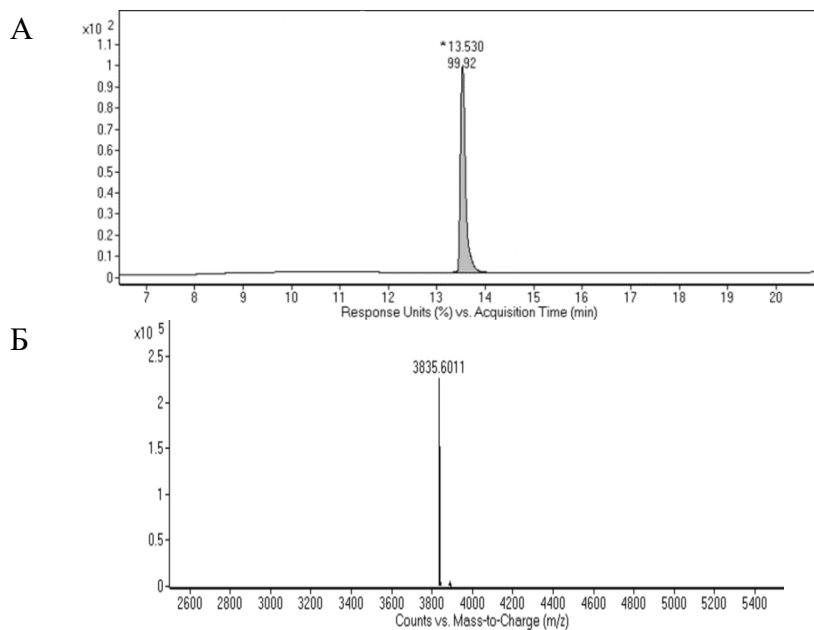


Рис. 103. А. ОФ ВЭЖХ (А) и масс-спектрометрический (Б) анализ АФС пуротоксина-1.

Чистоту полученного продукта подтверждали методом аналитической ОФ ВЭЖХ (Рис. 103А), подлинность полученного продукта проверяли масс-спектрометрически (Рис. 103Б). Всего за один технологический цикл из 780 г биомассы штамма-продуцента получали 857 мг активной фармацевтической субстанции пунальгина в виде лиофильного порошка (практический выход 40 %). В сжатые сроки было наработано 6 г фармацевтически чистого рекомбинантного препарата для проведения доклинических испытаний. На основании описанных результатов была опубликована работа Есипов Р.С. и др. [380] и получен патент РФ № 2571942 [381].

6.3. Разработка биотехнологии получения активной фармацевтической субстанции рекомбинантного обезболивающего полипептида АРНСЗ – основного компонента лекарственного средства «Пептальгин»

Болевые ощущения помимо функции сигнализации о грозящей организму опасности могут быть обусловлены различными нейропатическими заболеваниями, которые вызывают значительные физические и моральные страдания и не обеспечивают защитной функции. Для терапии болевых ощущений на сегодняшний день могут использоваться различные препараты: нестероидные противовоспалительные средства, опиоидные анальгетики, антидепрессанты, антиконвульсанты. Каждая группа препаратов имеет побочные эффекты, которые сильно ограничивают их применение. Опиоиды вызывают привыкание, и к ним достаточно быстро появляется толерантность. Нестероидные противовоспалительные средства отрицательно влияют на состояние желудочно-кишечного тракта. Антидепрессанты и антиконвульсанты могут оказывать значительное влияние на ЦНС и на соматические органы, что приводит к множеству побочных эффектов. Поэтому в последнее время особое внимание уделяется

разработке и получению принципиально новых анальгетических средств, специфично действующих на молекулярные механизмы генерации боли с минимальными побочными эффектами.

Рецептор TRPV1 является одной из конечных мишеней действия целого ряда воспалительных медиаторов (простагландины, метаболиты арахидоновой кислоты, брадикинины, прокинетины и др), он чувствителен к таким основным раздражителям как температура и кислотность среды. Признана его роль как системного интегратора болевого сигнала, заключающаяся не столько в сенсорных функциях на различные опасные раздражители сколько в формировании конечного болевого импульса, посылаемого в головной мозг. Некорректная работа этих рецепторов приводит к развитию нейропатических болей, диабетических нейропатий, болей при онкологических заболеваниях, астме, ревматоидным артритам, хроническим кашлям и многим другим хроническим болезням.

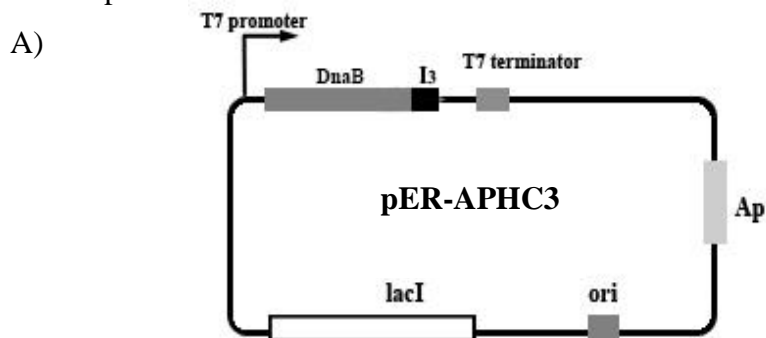
Антагонисты TRPV1 обладают способностью предотвращать боль, блокируя или частично модулируя режимы работы этого важного рецептора. При такой блокаде сигналы, достигающие чувствительных нейронов, не передаются далее в головной мозг, поэтому не происходит локального нейрогенного воспаления. В результате чего болевые ощущения не развиваются или заметно ослабляются. Такие эффекты при применении антагонистов TRPV1 были экспериментально показаны на животных моделях при использовании разнообразных болевых стимулов.

Природный обезболивающий полипептид АРНСЗ, впервые выделенный в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН из морской тропической анемоны *Heteractis crispa*, проявляет высокий уровень селективности и специфичности по отношению к ванилоидному рецептору TRPV1, играющему важную роль в генерации нейрогенного воспаления и передаче болевого сигнала [382]. Весьма экзотический источник и низкое содержание природного АРНСЗ в морской анемоне предполагает разработку биотехнологического способа получения ценного пептида. Описанный в литературе способ получения рекомбинантного АРНСЗ заключался в экспрессии рекомбинантного гена в составе гибридного белка, содержащего тиоредоксин, целевой пептид и аффинные метки [383]. Метод разработан для лабораторного применения и требует применения дорогостоящего фермента, поэтому был радикально переработан.

Создание штамма-продуцента пептальгина

Рекомбинантный ген пептида АРНСЗ (Рис. 104Б), который позднее получил коммерческое название пептальгин ВЗ, клонировали в экспрессионный вектор рTWIN1. Полученная плаزمиды (Рис. 104А) содержит ген гибридного белка, в состав которого входит

мини-интеин *SspDnaB* и целевой пептид. Полученным рекомбинантным плазмидным вектором трансформировали клетки *E. coli* C3030, таким образом, был создан штамм-продуцент *E. coli* C3030/pER-APHC3.



Б) GSICLEPKVVGPCTAYFPRFYFNSETGKCTPFIYGGCEGNGNNFETLRACRGICRA

Рис. 104. А) Структура экспрессионной плазмиды pER-APHC3. DnaB – ген DnaB мини-интеина из *Synechocystis* sp., I₃ – ген анальгетического полипептида APHC3 из *Heteractis crispata*. Б) Аминокислотная последовательность APHC3.

При культивировании штамма-продуцента гибридный белок образуется в нерастворимой форме, агрегируя в тела включения (Рис. 105 дорожки 3 и 4).

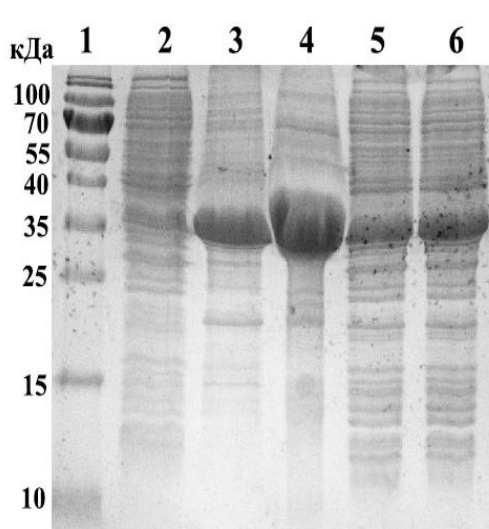


Рис. 105. Анализ содержания гибридного белка в клеточной биомассе штамма-продуцента *E. coli* C3030/pER-APHC3. 15%-ДСН-ПААГ.

1 – стандарты молекулярных масс;
 2 – клеточный супернатант;
 3 – осадок тел включений;
 4 – супернатант после солюбилизации тел включений;
 5 – тотальный клеточный лизат после 3.5 ч культивирования штамма-продуцента после внесения индуктора;
 6 – тотальный клеточный лизат после 4.5 ч культивирования штамма-продуцента после внесения индуктора

Оптимальное время культивирования биомассы после индукции составило 4-5 ч при 37 °С после внесения индуктора (Рис. 106). Съем клеточной биомассы составил 5,5 г с литра клеточной культуры, а содержание гибридного белка – не менее 20 % от суммарного клеточного белка.

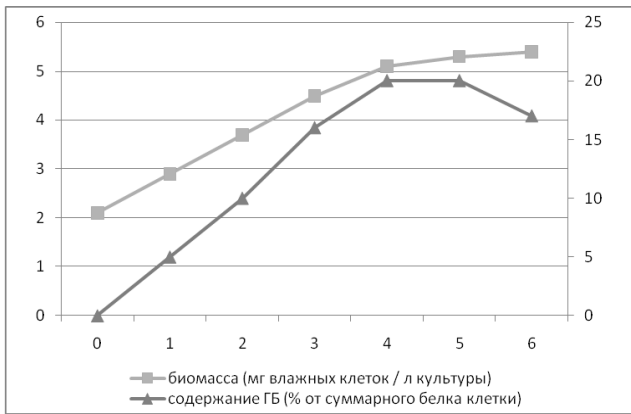


Рис. 106. Оптимизация культивирования штамма-продуцента *E. coli* С3030/pER-APHС3 по содержанию гибридного белка и съему клеточной биомассы. Серым цветом показано оптимальное время культивирования

Выделение и очистка пептальгина

После дезинтегрирования биомассы тела включения, содержащие гибридный белок, солюбилизовали, полученный белковый раствор разбавляли в 10 раз в буфере для ренатурации и инкубировали при рН 7.2 и 25 °С в течение 48 ч для проведения автолиза. В этих условиях доля расщепленного гибридного белка достигала 80 % (Рис. 107).

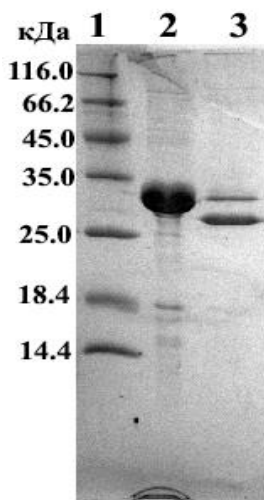


Рис. 107. Анализ автокаталитического расщепления гибридного белка. Электрофорез в 15% ПААГ в денатурирующих условиях:
 1 – стандарты молекулярных масс;
 2 – супернатант, полученный после солюбилизации тел включения;
 3 – 48-часовой автолиз гибридного белка.

Однако, анализ продуктов автолиза посредством ОФ ВЭЖХ показал, что только 50 % целевого полипептида ренатурировало, а остальные 50 % соответствовали формам с неправильно-замкнутыми дисульфидным связям (Рис. 108).

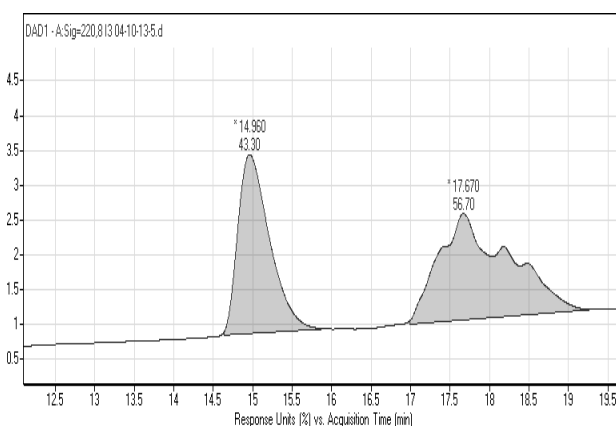


Рис. 108. ОФ ВЭЖХ анализ пептидных продуктов автолиза.
 I – целевой полипептид (пептальгин В3),
 II – продукты неправильного фолдинга.

Важно, что процессы ренатурации и расщепления гибридного белка протекают одновременно, при этом лимитирующей стадией в образовании «правильного» рекомбинантного полипептида в данном случае является именно ренатурация гибридного белка. Поэтому был проведен подбор оптимальных условий ренатурации пептида, при которых автолиз проходил бы так же эффективно (Рис. 109). После оптимизации условий доля расщепленного гибридного белка достигала 80% с долей ренатурированного полипептида не менее 90%.

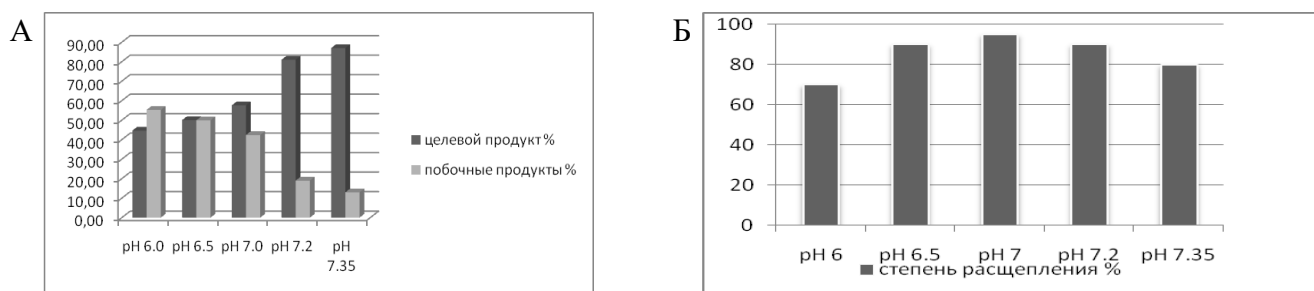


Рис. 109. Подбор условий для одновременного проведения ренатурации и расщепления гибридного белка. А) Содержание целевого продукта в зависимости от pH при ренатурации Б) Степень автолиза в зависимости от pH при ренатурации

Тем не менее, был поставлен эксперимент, в ходе которого эти 2 стадии были разделены: ренатурацию гибридного белка осуществляли при pH 9.0 в течение 24 ч при 25 °С, а расщепление – при подобранном значении pH 7.2 в течение 72 ч при 25 °С. Таким образом, удалось добиться 100 %-ой эффективности ренатурации АРНС3 без изменения стадии расщепления.

Выделение АРНС-3 проводили в две стадии: сначала с помощью ионообменной хроматографии отделяли нерасщепленный гибридный белок и интеин-содержащий остаточный белок, а затем при препаративной ОФ ВЭЖХ получали полипептид с хроматографической чистотой не менее 98 % (Рис. 110). Далее с помощью гель-фильтрационной хроматографии удаляли компоненты буферов для ОФ ВЭЖХ, и полученный элюат лиофильно высушивали. Согласно технологическому регламенту из 400 г биомассы штамма-производителя получали 1210 мг активной фармацевтической субстанции рекомбинантного АРНС-3 с хроматографической чистотой 98 – 99 % в виде лиофилизированного порошка, которые передавали для биологических испытаний. Выход по разработанной технологии составил 44.4 мг целевого продукта с литра клеточной культуры. На основании описанных результатов была опубликована работа Esipov R.S. et al. [384] и получен патент РФ № 2619170 [385].

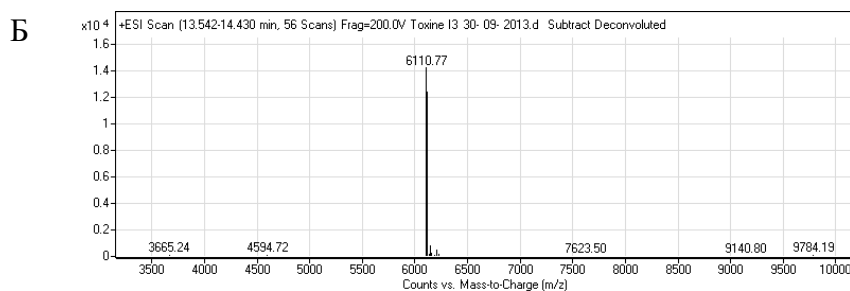
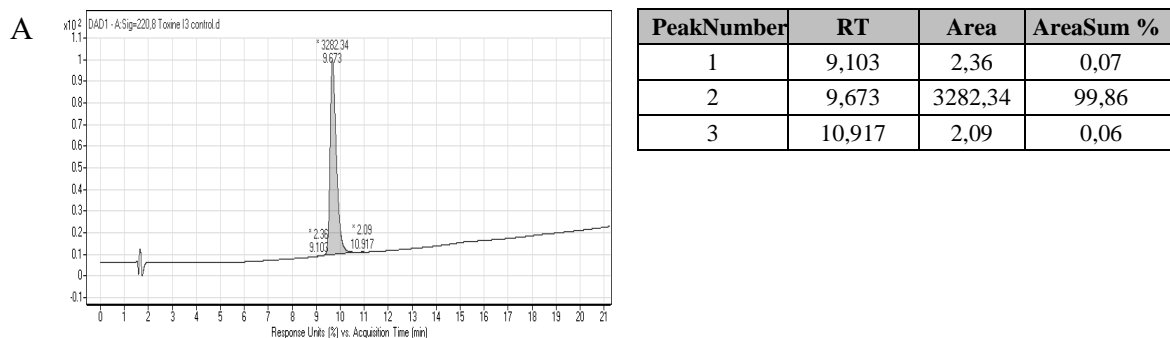


Рис. 110. Хромато-масс-спектрометрический анализ объединенного элюата после ОФ-ВЭЖХ.

Использован прибор 6224 ESI-TOF (Agilent) с колонкой YMC-Pack C₈ (150×2,1 мм; YMC Europe). А – хроматограмма; Б – масс-спектр основного пика.

6.4. Разработка биотехнология получения активной фармацевтической субстанции и лекарственного гипергликемического средства «Оксинтолонг» на основе конъюгата биосинтетического оксинтомодулина человека и полисиаловой кислоты

Масштабирование технологии выделения и очистки оксинтомодулина

Масштабирование технологии получения химически гликомодифицированного оксинтомодулина человека, оксинтолонга, проводили постадийно. Ферментация штамма продуцента *E.coli* ER2566/pER-Охут проводилась в 200 л ферментере в условиях, аналогичных выращиванию культуры для получения глюкагона, подробно описанных ранее. Съём клеточной биомассы составил 3.2 кг с 200 л среды или 17.2 г с литра клеточной культуры. Было проведено разрушение клеточной биомассы, отделение осадка тел включения центрифугированием и их отмывка. Всего было наработано 980 г тел включения с содержанием гибридного белка не менее 45 % от суммарного клеточного белка. Замороженные на этой стадии тела включения могут храниться при -20°C не менее 6 месяцев.

110 г замороженных тел включения гомогенизировали в буфере с 8 М мочевиной и после полного растворения проводили центрифугирование для отделения нерастворимого дебриса. Для ренатурации белка полученный супернатант разбавляли в 20 раз и инкубировали в течение 16 ч при 8-10 °С при постоянном перемешивании. После чего индуцировали расщепление снижением рН.

При анализе продуктов автокаталитического расщепления гибридного белка в ходе масштабирования технологии оказалось, что часть фракций полученных после препаративной обращенно-фазовой хроматографии и соответствующих началу основного пика, содержит

HSQGTFTSDYSK

HNHSQGTFTSDYSK

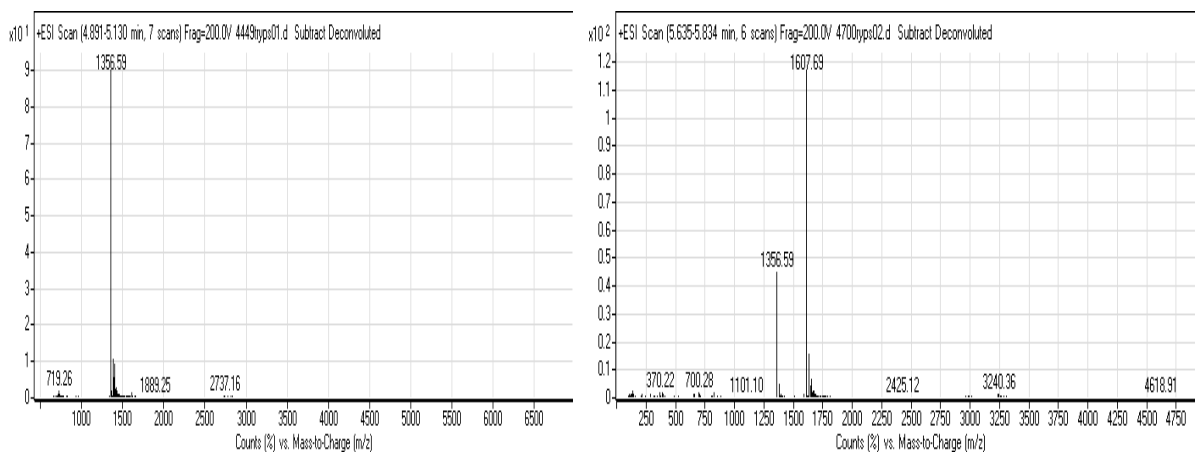


Рис. 113. ESI-TOFMS анализ триптических продуктов трипсинолиза оксинтомодулина и смеси оксинтомодулин + примесь.

Для оптимизации стадии автокаталитического расщепления гибридного белка с целью минимизировать образование HN-оксинтомодулина мы провели серию экспериментов, варьируя температуру процесса и солевой состав реакционной смеси. При этом pH реакции оставляли неизменным, т.к. его изменение приводит к значительному снижению эффективности автокаталитического расщепления. Результаты представлены в виде зависимости процентного содержания примеси (кол-во примеси/(кол-во примеси + кол-во оксинтомодулина)*100%) от температуры и ионной силы раствора (Рис. 114 и 115).

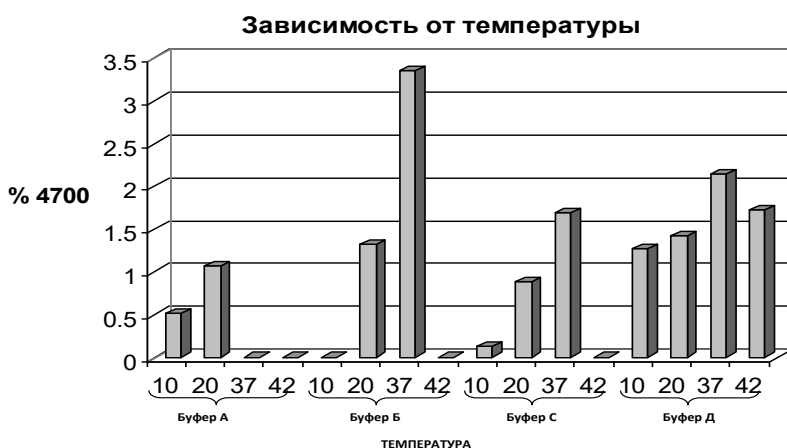


Рис. 114. Зависимость содержания примеси (кол-во примеси/(кол-во примеси + кол-во оксинтомодулина) *100%) от температуры при разных pH. буфер А: 20 мМ Трис-НСl pH 7.0 10мМ EDTA; буфер Б: 20 мМ Трис-НСl pH 7.0 20 мМ MgCl₂; буфер С: 20 мМ Трис-НСl pH 7.0 250 мМ NaCl 10мМ EDTA; буфер Д: 20 мМ Трис-НСl pH 7.0 500 мМ NaCl 10мМ EDTA).

Исходя из полученных экспериментальных данных был сделан вывод, что наличие двухвалентных катионов, высокая ионная сила и температура ~ 20 °C способствуют образованию побочного продукта автокаталитического расщепления. Совокупность этих факторов может привести к значительному увеличению доли побочного продукта и как следствие существенно осложнить очистку целевого оксинтомодулина.

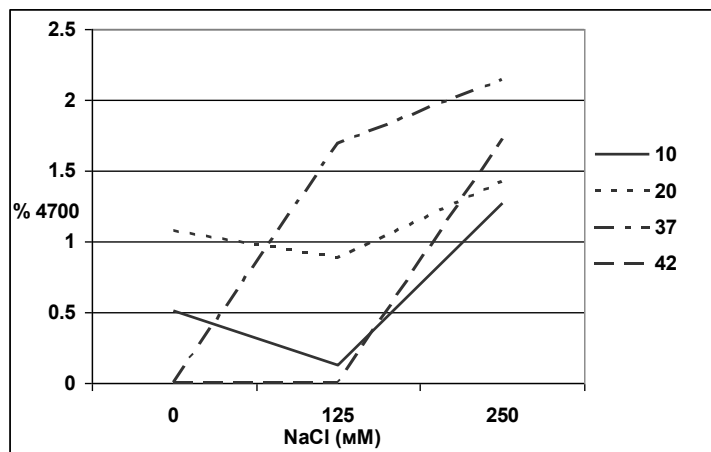


Рис. 115. График зависимости содержания примеси (кол-во примеси/(кол-во примеси + кол-во оксинтомодулина)* 100%) от ионной силы раствора.

Итогом этих экспериментов стала следующая модификация стадии препаративного автокаталитического расщепления гибридного белка. К раствору ренатурированного гибридного белка добавляли буфер с pH 5.0 и 47 °С в соотношении 1 : 1. После перемешивания температура разбавленного раствора составляла 37 °С. Реакционную смесь подтитровывали соляной кислотой до pH 7.0, для индукции расщепления гибридного белка. Через 16 ч инкубации при комнатной температуре снижали pH белкового раствора до значения 3.0, фильтровали для отделения осадка и проводили хроматографическую очистку оксинтомодулина на катионообменном сорбенте SP-Sepharose XL. Фракции, содержащие оксинтомодулин с хроматографической чистотой не менее 90 %, объединяли и проводили следующую стадию очистки с помощью ОФ ВЭЖХ на колонне PerfectSil 300 ODS C18. Один из вариантов дальнейшей подготовки субстанции АФС оксинтомодулина с чистотой не менее 98 – постановка гель-фильтрационной хроматографии на колонке с сорбентом Biogel P2 и лиофилизация. Согласно этому варианту технологического регламента из 300 г клеточной биомассы за один технологический цикл получали 1.0 г АФС рекомбинантного оксинтомодулина с практическим выходом не менее 40 %. В дальнейшем от проведения гель-фильтрационной хроматографии отказались и использовали промежуточный продукт – объединенный элюат после ОФ ВЭЖХ – для постановки реакции моносиалирования.

Моносиалирование оксинтомодулина

Сиалирование проводили порциями с загрузкой по 10 мг оксинтомодулина по схеме, представленной на Рис. 82. Для взаимодействия альдегида полисиаловой кислоты с амино-группой необходимо, чтобы амино-группа не была протонирована. В связи с этим реакцию сиалирования обычно проводят при слабощелочных или нейтральных значениях pH. Однако в таких условиях происходит модификация всех аминокрупп полипептида, как N-концевой, так и боковых аминокрупп остатков лизина. Для того, чтобы обеспечить избирательное ацетилирование α-аминогруппы, обладающей более низкой pK (9.0) по сравнению с ε-аминогруппами лизинов (pK 10.8), мы проводили реакцию сиалирования оксинтомодулина в

слабокислых условиях (рН 2.0 – 7.5). Продукты реакции анализировали с помощью аналитической ОФ ВЭЖХ. Было установлено, что при рН 7.5 преимущественно образовывались полисиалированные конъюгаты оксинтомодулина, снижение рН до 6.0 и 4.5 привело к увеличению доли моносиалированного продукта, а при рН 2.0 происходила значительная агрегация оксинтомодулина. С целью увеличения выхода реакции уменьшили конечное мольное соотношение ПСК/пептид до 2/1 и разделили внесение ПСК на 2 равные порции с интервалом в 2 ч. Мы провели исследование влияния температуры на реакцию сиалирования оксинтомодулина (температура реакции 5, 18, 30 и 40 °С). Наилучший выход целевого продукта при наименьших затратах ПСА наблюдается при температуре 30 – 40°С. При этих температурах не наблюдалась агрегация оксинтомодулина, а реакция полностью проходила в течение 2 ч. В то же время для протекания реакции при 5 °С требовалось не менее 8 часов и наблюдалась значительная агрегация оксинтомодулина. Результаты эффективности сиалирования оксинтомодулина при рН 4.5 и 6.0 приведены в Таблице 11.

Таблица 11. Постановка реакции сиалирования оксинтомодулина при рН 4.5 и 6.0.

Показатель	рН 4.5	рН 6
Концентрация Охп	2 мг/мл	2 мг/мл
Концентрация САО	15 мг/мл	8 мг/мл (2 порции)
Концентрация NaCNBH₃	5 мг/мл	5 мг/мл (2 порции)
Время реакции	2 ч	2 ч
Температура	37 °С	37 °С
САО:Охп (мольное)	1,5мг/0,2 мг; 3,75:1	2,8 мг/0,2 мг; 7:1
Степень прохождения реакции	83 %	77 %
Целевой продукт, %	47 %	25 %

Исходя из ранее полученных данных по химической модификации альфа аминоксигруппы тимозина бета 4 мы решили ввести в реакционную смесь полярный апротонный растворитель – ацетонитрил в количестве 30 % (такой выбор обусловлен технологической целесообразностью т.к. при ОФ ВЭЖХ очистке оксинтомодулин элюируется при ~ 30 % ацетонитрила). Апротонный растворитель дестабилизирует гидратную оболочку, возникающую в водных растворах вокруг заряженных функциональных групп существенно повышая их доступность и реакционную способность. При рН 2.5 в присутствии в реакционной смеси 0.1% трифторуксусной кислоты значительно увеличивается селективность альфа аминоксигруппы по отношению к гамма аминоксигруппам лизинов. Эти изменения привели к существенному росту доли моносиалированного продукта в реакции без потерь оксинтомодулина из-за агрегации (Рис. 116).

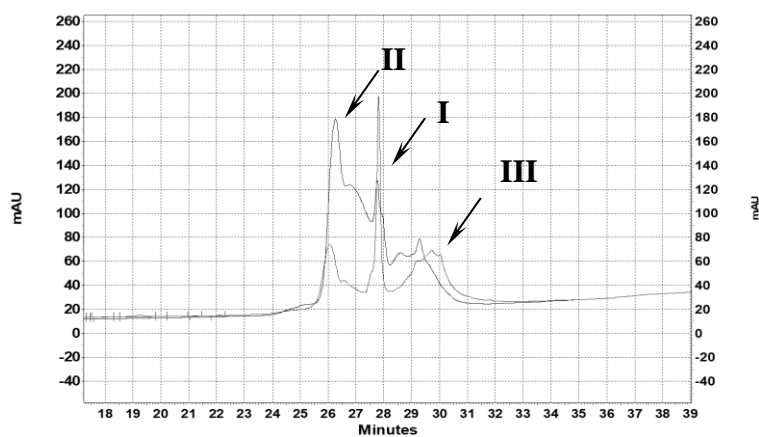


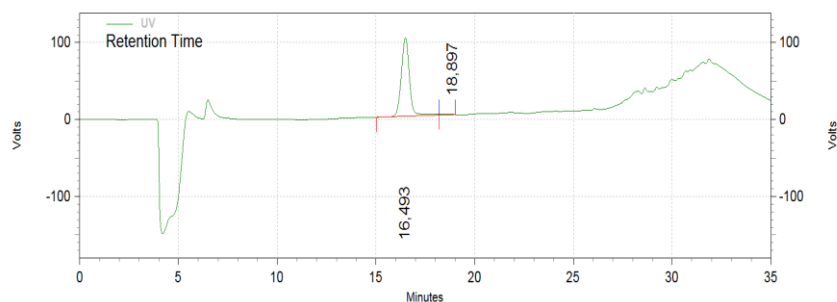
Рис. 116. Хроматографический анализ продуктов сиалирования оксинтомодулина человека. I — оксинтомодулин человека; II — продукт(ты) моносиалирования оксинтомодулина человека; III — продукты полисиалирования оксинтомодулина; Красным — реакция сиалирования pH 4.5 соотношении ПСК/пептид 2/1 и концентрации NaCNBH₃ 5 мг/мл спустя 4 ч инкубации при 37 °С. Синим — реакция сиалирования pH 2.5 в присутствии 30% ацетонитрила, соотношении ПСК/пептид 2/1 и концентрации NaCNBH₃ 5 мг/мл спустя 4 ч инкубации при 37 °С. Хроматографию проводили на колонке Macrosphere RP 300 C18 5μ (250x4.6) в градиенте ацетонитрила 0,1% ТФУ со скоростью 0,5 мл/мин.

Таким образом, для технологии получения оксинтолонга при загрузке 50 мг оксинтомодулина оптимальными условиями являются следующие:

- концентрация оксинтомодулина 2 мг/мл;
- буферная система: 0.1 % ТФУ, pH 2.5, 20 - 30% ацетонитрила;
- конечная концентрация NaCNBH₃ 5-10 мг/мл;
- мольное соотношение ПСА:оксинтомодулин= 2÷3:1;
- температура 30 – 40 °С;
- время реакции 2 – 3 часа;

Было проведено масштабирование разработанной схемы сиалирования от 1 до 50 мг оксинтомодулина. Очистку модифицированного оксинтомодулина проводили с помощью ОФ ВЭЖХ и гель-фильтрационной хроматографии. Окончательная модификация технологии заключалась в использовании в реакционной смеси не лиофилизованной субстанции оксинтомодулина, а промежуточного продукта – объединенного элюата после ОФ ВЭЖХ очистки, концентрация белка в котором была количественно определена с помощью аналитической ОФ ВЭЖХ. Полученный сиалированный оксинтомодулин лиофилизовали в стерильных условиях. Всего из 50 мг исходного пептида было получено 55 мг лиофилизованной активной фармацевтической субстанции Оксинтолонг с чистотой не менее 98 % (Рис. 117).

Data File: C:\EZChrom Elite\Projects\Default\Data\Oxm\Новая папка\26.11.09 OxM_sial1.1.dat
 Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Method\Sial2.met
 Acquired: 26.11.2009 13:24:20
 Printed: 30.11.2009 16:51:44



UV Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
16,493	11626549	99,00	408905	99,13
18,897	116910	1,00	3583	0,87
Totals	11743459	100,00	412488	100,00

Рис. 117. ОФ ВЭЖХ анализ очищенного моносиалированного оксинтомодулина ВЭЖХ на колонке Macrosphere RP 300 C18.

Этот продукт был использован для проведения доклинических испытаний и приготовления готового лекарственного средства «Оксинтолонг».

7. Получение готовых лекарственных форм

Активные фармацевтические субстанции, по сути, являются промежуточными продуктами (полуфабрикатами) и используются для приготовления лекарственных форм. Так как основной способ применения лекарственных средств на основе полипептидов – инъекционный, нами были разработаны технологии получения готовых лекарственных форм в виде лиофилизата для приготовления раствора для инъекций.

В состав лекарственной формы помимо фармацевтической субстанции входят дополнительные компоненты, способствующие улучшению фармакологических параметров и/или длительному хранению препарата. В представленной работе были разработаны технологии получения готовых лекарственных форм для фармацевтических субстанций глюкагона (глюкорана) и модифицированного оксинтомодулина (оксинтолонга).

7.1. Получение лекарственной формы глюкагона – глюкорана

Получение глюкорана (лекарственной формы глюкагона) состоит из нескольких этапов: приготовление фармацевтической композиции рекомбинантного глюкагона и ее стерилизация; розлив (расфасовка) по флаконам и лиофильная сушка; укупорка, завальцовка, маркировка и окончательная упаковка продукта.

В состав фармацевтической композиции входят:

- фармацевтическая субстанция рекомбинантного глюкагона 1 мг (соответствует 1 МЕ)
- лактоза моногидрат 107 мг

Учитывая специфику применения препарата глюкагона (инъекции), все этапы получения готовой лекарственной формы должны обеспечить стерильность конечного продукта. Стерилизация композиции осуществлялась ультрафильтрацией, а розлив и лиофилизация проводились в соответствующих асептических условиях. Следует отметить, что с химической точки зрения содержание целевого соединения – глюкагона – в конечном продукте составляет менее 1%. Тем не менее, проведенные испытания биологической активности глюкорана показали, что подобранные условия технологического процесса обеспечивают сохранность биологической активности готовой лекарственной формы после всех манипуляций в течение заявленного срока хранения (1 год).

7.2. Приготовление готового лекарственного средства Оксинтолонг

Одной из целей работы являлась разработка технологии получения готового лекарственного средства (ГЛС) рекомбинантного белкового препарата пролонгированного действия – химически гликомодифицированного оксинтомодулина человека для лечения сахарного диабета второго типа. ГЛС разрабатываемого белкового препарата должно представлять собой стерильный раствор для подкожного введения, содержащий АФС гликомодифицированного оксинтомодулина человека в требуемой дозировке. Так как длительное хранение белковых (полипептидных) препаратов в растворе приводит к ухудшению их качества, то для таких препаратов оптимальной формой является лиофилизированный порошок (лиофилизат).

Поэтому разработанная нами ГЛС гликомодифицированного оксинтомодулина представляет собой лиофилизированный порошок, для приготовления раствора для подкожного введения. Фармакопейный состав ГЛС следующий:

Гликомодифицированный оксинтомодулин	10 мг
<i>Вспомогательные вещества:</i>	
Натрий хлорид	8,77 мг
Натрий гидрофосфат дигидрат	1,44 мг
Натрий дигидрофосфат дигидрат	0,32 мг
Вода для инъекций	до 1 мл

Для получения ГЛС «Оксинтолонг» ранее полученная активная фармацевтическая субстанция растворяется в 10 мМ натрий фосфатном буфере, рН 7,4, содержащим 0,9% хлористый натрий. Конечная концентрация АФС – 10 мг/мл. Раствор стерилизуется фильтрованием, расфасовывается в стерильных условиях и лиофильно высушивается. Полученный лиофилизат, который является конечным продуктом, укупоривается и

маркируется. Проведенный нами испытания показали, что полученное по этой технологии ГЛС Оксинтолонг полностью сохраняет биологическую активность в течение 2 лет.

8. Методы технологического контроля и анализа конечного продукта

Разработка биотехнологии получения фармацевтических субстанций всегда содержит аналитическую составляющую – методы технологического контроля и анализа продукции. В аналитической части работы мы выделили три составляющих: методы, используемые при разработке технологи (исследовательская часть), методы текущего технологического контроля, обеспечивающие наблюдение за ключевыми стадиями процесса, и методы анализа конечного продукта. Анализ каждого конечного продукта подробно описан в разработанных нами соответствующих фармацевтических статьях.

8.1. Аналитические методы, используемые при разработке биотехнологии

Аналитические методы, использованные в настоящем исследовании при разработке биотехнологий, являются традиционными методами молекулярной биологии, которые применяются для характеристики белков и пептидов: электрофорез в ПААГ и аналитическая ВЭЖХ. В отдельных случаях для характеристики получаемого продукта и доказательства его структуры (например, идентификации окисленного глюкогона или картировании модификации пептидов ПСК) использовалась хромато-масс-спектрометрия. При возможности использовался. Следует отметить, что помимо подтверждения соответствия свойств полученных препаратов заданным или предполагаемым параметрам и их сравнения с фармакопейными стандартами (в случае глюкогона) или внутренними эталонами объектами исследования в разработанных нами аналитических методах являлась воспроизводимость технологического процесса на всех стадиях.

При определении уровня экспрессии гибридных белков в штаммах-продуцентов, при оптимизации условий расщепления гибридных белков, при анализе фракций после хроматографической очистки на разных стадиях получения препаратов основным методом контроля процессов является электрофоретический анализ в ДСН-ПААГ с последующей денситометрической оценкой. Примеры использования электрофореза в разработке биотехнологий и технологического процесса приведены на Рис. 28, 33, 34, 38, 47, 51, 52, 58, 59, 67 и др. Для анализа АФС полипептидов использовали два варианта окрашивания ПААГ красителем кумасси R250 и нитратом серебра, что позволило повысить точность количественной оценки чистоты препаратов.

В качестве второго количественного метода анализа была использована аналитическая ОФ ВЭЖХ. Метод позволяет точно определить чистоту и содержание препарата и примесей на

разных технологических стадиях. В разработанных технологических процессах химического ацетилирования тимозина $\alpha 1$ и $\beta 4$ аналитическая ОФ ВЭЖХ, совмещенная с хромато-масс-спектрометрией, являлась основным методом контроля.

Масс-спектрометрия активно использовалась при разработке биотехнологий для идентификации родственных соединений и посторонних примесей. Важную роль сыграл этот метод при определении положения ацетильной группы в молекулах тимозинов, идентификации модифицированных форм (окисленные, карбомоилированные и деамидированные производные, продукты деградации белка), продуктов неправильного рефолдинга. Пептидное картирование в сочетании с хромато-масс-спектрометрией позволило однозначно идентифицировать все модификации рекомбинантных полипептидов. В самом технологическом цикле ни для характеристики промежуточных продуктов, ни для характеристики конечной фармацевтической субстанции масс-спектрометрический анализ не требуется.

8.2. Аналитические методы контроля технологического процесса

Для всех технологических процессов нами были разработаны методы контроля, являющиеся составной частью технологических регламентов и обеспечивающие воспроизводимость процессов в рамках заданных параметров. Так при ферментации штаммов-продуцентов были подготовлены маршрутные карты для контроля основных параметров процесса: рН среды, температуры, скорости перемешивания, насыщения кислородом, скорости роста культуры (по оптической плотности). Электрофоретический анализ в ПААГ является основным методом для контроля результатов ферментации, стадии разрушения биомассы, анализа фракций после хроматографической очистки гибридного белка. После стадии расщепления гибридного белка и при очистке целевых полипептидов основным методом контроля является аналитическая ОФ ВЭЖХ.

8.3. Методы контроля конечного продукта

Методы контроля качества активной фармацевтической субстанции рекомбинантных полипептидов были разработаны коллективом лаборатории биотехнологии совместно с Контрольно-аналитической лабораторией ОБП ИБХ РАН и отражены в фармакопейных статьях предприятия (ФСП). Нарботка и сертификация опытных серий АФС и ЛС проводилась в соответствии с опытно-промышленным регламентом в условиях опытно-промышленной установки ИБХ РАН по всем параметрам, прописанным в ФСП. Для всех созданных фармацевтических субстанций были разработаны и утверждены фармацевтические стандарты предприятия для стандартизации анализа конечного продукта и оценки стабильности качества получаемых АФС. Нормы по показателям для генно-инженерных фармацевтических

субстанций, таким как содержание иммунореактивных белков *E.coli* и остаточной ДНК штамма-продуцента и микробиологическая чистота, установлены на уровне, предъявляемым к аналогичным препаратам в международной практике. Последняя характеристика – биологическая активность – является уникальной для каждого вида фармацевтической субстанции и определяется специфическим тестом, разработанным специально для каждого рекомбинантного полипептида с учетом его биологической функции в организме.

8.4. Тестирование биологической активности рекомбинантных полипептидов

Разработка животных моделей и тестирование биологической активности полученных препаратов являлись составной частью всех описанных разработок. Лишь малая часть из получаемых препаратов является признанными лекарственными средствами. Для большей части необходимо было разработать или воспроизвести стандартные международные протоколы.

Условно все фармацевтические субстанции рекомбинантных полипептидов, технологии получения которых описаны в настоящей работе, можно условно разделить на две группы. В первую группу входят фармацевтические субстанции с устоявшейся практикой применения, с известным общепринятым международным стандартом. В данной работе к таким продуктам относятся глюкагон («Глюкоран») и окситоцин. Фактически тестирование биологической активности этих фармацевтических субстанций свелось к сравнению с фармакологическим воздействием стандартного препарата. Для глюкагона таким образом сравнения являлся препарат «Glucagen HypoKit» (Novo Nordisk A/S). Фармацевтическая субстанция рекомбинантного глюкагона человека, полученная по разработанной в ИБХ РАН биотехнологии, также как и готовая лекарственная форма «Глюкоран» показали полную аутентичность с препаратом «Glucagen HypoKit».

К второй группе следует отнести фармацевтические субстанции рекомбинантных полипептидов, которые еще не получили окончательного признания как лекарственные средства и не имеют четких устоявшихся критериев биологической активности. Это фармацевтические субстанции рекомбинантных полипептидов, имеющие аминокислотные замены или модифицированные производные с улучшенными фармакологическими характеристиками. К этой второй группе в данной работе относятся: тимозины $\alpha 1$ и $\beta 4$ и их модификации, модифицированный оксинтомодулин, фрагменты пептидных ингибиторов ангиогенеза (фактора дифференцировки пигментного эпителия (PEDF), тумстатина и эндостатина).

Доклинические испытания препаратов «Глюкоран», «Оксинтолонг», «Пептальгин» и «Пунальгин», тимозинов $\alpha 1$ и $\beta 4$, аналогов гирудина (дезирудин и лепирудин) и часть работ с

препаратами «Пигастин» и «Тумастин» проводились в лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН под руководством Мурашева А.Н.

Модифицированный оксинтомодулин – «Оксинтолонг» – тестировали по гипогликемической активности препарата в сравнении с эксенатидом (Баэта, Eli Lilly and Company) в тесте нагрузки глюкозой. Тимозин $\beta 4$ и его аналоги тестировали на лабораторных животных на способность к терапии хронического воспалительного поражения кожи спины (хронический дерматит) и на животной модели ишемии миокарда.

Тестирование биологической активности полипептидных анальгетиков, препаратов «Пептальгин» и «Пунальгин» проводилась в сравнении с низкомолекулярными анальгетиками, т.к. пептидных аналогов этих препаратов пока не существует. Биологическую активность пептидного анальгетика «Пептальгин» определяли по снижению болевой реакции мышей в тесте «горячая пластина», а препарата «Пунальгин» – в тесте «уксусные корчи» для оценки перитонвисцеральной боли при химическом раздражении брюшины.

Биологическая активность фрагментов пептидных ингибиторов ангиогенеза тестировалась на кафедре офтальмологии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова под руководством академика В.А.Ткачука на модели неоваскуляризации роговицы кролика, модели гипероксигенационной ретинальной неоваскуляризации на глазах мышей и модели неоваскуляризации на глазах кроликов с целевой трансвитреальной доставкой (имплантацией) VEGF в субретинальное пространство и последующей лазерной ретино-хориоидальной деструкцией. Результаты проведенного доклинического исследования препарата «Пигастина» для интравитреального введения показали, что антиангиогенное действие «Пигастина» по степени выраженности было идентичным «терапевтическому» эффекту контрольного ЛС офтальмологического назначения – «Луцентис» (Novartis Pharma).

ВЫВОДЫ

1. На основании проведенных исследований разработаны принципы и реализованы пути создания активных фармацевтических субстанций рекомбинантных пептидов, полученных с использованием экспрессионных интениновых систем. Полученные результаты можно рассматривать как общее методическое биотехнологическое направление при создании новых лекарственных препаратов генно-инженерного происхождения.
2. Разработаны новые векторные системы и получены высокопродуктивные бактериальные штаммы-продуценты соответствующих гибридных белков, состоящих из интенинов и целевых полипептидов. Изучены экспрессия гибридных генов и стабильность белков *in vivo*, оптимизированы условия культивирования штаммов и показана возможность их использования для производственной ферментации.
3. Созданы интенин-опосредованные биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов: глюкагона, аналогов гирудина, фрагмента эндостатина, оксинтомодулина, модифицированного фрагмента фактора дифференцировки пигментного эпителия, окситоцина, анальгетических полипептидов АРНС-3 и РТ-1 с использованием гибридных белков, содержащих элементы белкового сплайсинга и не требующие применения специфических протеаз. Показана возможность совмещения интенин-опосредованных стадий процесса в одном реакторе: одновременного рефолдинга интенинового домена и целевого полипептида, автокаталитического расщепления гибридного белка и осаждения балластных белков.
4. Созданы биотехнологии получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов дезацетилтимозина $\alpha 1$, дезацетилтимозина $\beta 4$ и фрагмента тумстатина с использованием сайт-специфической TEV-протеиназы.
5. Разработаны технологии получения активных фармацевтических субстанций тимозина $\alpha 1$ и тимозина $\beta 4$ посредством химического ацетилирования, оксинтомодулина и тимозина $\beta 4$, модифицированных полисиаловой кислотой.
6. Разработана интенин-опосредованная биотехнология получения рекомбинантных тимозина $\alpha 1$ и тимозина $\beta 4$ с ацетилированием *in vivo*, исключая стадию химического ацетилирования пептида.
7. Для всех полученных рекомбинантных полипептидов на клеточных и животных моделях показана высокая специфическая биологическая активность и фармакологическая значимость.

8. На основе разработанных биотехнологических подходов созданы опытно-промышленные технологии получения активных фармацевтических субстанций следующих рекомбинантных полипептидов: тимозина $\alpha 1$, тимозина $\beta 4$, глюкагона, аналогов гирудина (лепирудин и дезирудин), оксинтомодулина (оксинтолонг), модифицированных фрагментов фактора дифференцировки пигментного эпителия (пигастин) и тумстатина (тумастин), анальгетических полипептидов – АРНС-3 (пептальгин) и РТ-1 (пунальгин). Все технологии описаны в разработанных технологических регламентах на производство соответствующих активных фармацевтических субстанций.
8. Для всех созданных технологий разработаны методы технологического контроля и анализа конечного продукта, включая тестирование биологической активности. Методы анализа конечного продукта включены в разработанные фармакопейные статьи предприятия (ФСП).
9. На основе созданных опытно-промышленных технологий получения активных фармацевтических субстанций рекомбинантных полипептидов разработаны промышленные технологии получения готовых лекарственных форм (ГЛФ): «Глюкоран» (глюкагон рекомбинантный человеческий генноинженерный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 1МЕ) и «Оксинтолонг» (конъюгат генноинженерного оксинтомодулина человека и полисиаловой кислоты, фракция 14 кДа, лиофилизированный порошок для приготовления раствора для подкожного введения 50 мг).

БЛАГОДАРНОСТИ

В связи с завершением диссертации и представлением ее к защите выражаю искреннюю признательность всем моим соавторам за участие в выполнении отдельных этапов и полезные дискуссии, моему научному консультанту академику А.И.Мирошникову за постоянную поддержку. Благодарю всех сотрудников лаборатории биотехнологии и опытного биотехнологического производства за многолетнее плодотворное сотрудничество, позволившее выполнить представленную работу. Особенные слова благодарности безвременно ушедшей Т.И. Костроминой за неоценимую помощь при реализации масштабных проектов, требующих наработки больших объемов биомассы, и А.И. Гуревичу которому я обязан своим становлением, как ученого. Отдельная благодарность сотрудникам кафедры офтальмологии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова под руководством академика В.А.Ткачука и врачам отделения офтальмологии Центральной Клинической больницы РАН. Выражаю свою признательность сотрудникам лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН за многолетнюю плодотворную совместную работу, и особенно ее руководителю А.Н. Мурашеву. Благодарю своих родных и близких, поддерживавших меня при выполнении этой работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clark A.J. Adeniyi-Jones R.O. Knight G. Leiper J.M. Wiles P.G. Jones RH. Keen H. MacCuish A.C. Ward J.D. Watkins P.J. Cauldwell J.M. Glynne A. Scotton J.B. Biosynthetic human insulin in the treatment of diabetes. A double-blind crossover trial in established diabetic patients. // *Lancet*. 1982; 2(8294): 354-357.
2. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. // *Nature Biotechnology*. 2018; 36:136–1145.
3. Распоряжение Правительства Российской Федерации № 337-р от 28 февраля 2018 г.
4. Transparency Market Research. Peptide Therapeutics Market: Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast 2012–2018. Transparency Market Research (2012)
5. Usmani SS, Bedi G, Samuel JS, Singh S, Kalra S, Kumar P, Ahuja AA, Sharma M, Gautam A, Raghava GPS. THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics. // *PLoS One*. 2017; 12(7):e0181748.
6. Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today*. 2015 Jan; 20(1):122-8.
7. Berlec A, Strukelj B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. // *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2013; 40(3-4):257-74.
8. Martínez JL, Liu L, Petranovic D, Nielsen J. Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. // *Current opinion in biotechnology*. 2012; 23(6): 965–71.
9. Walsh G. New biopharmaceuticals.// *Biopharm Int* 2012; 25(6):34–36
10. Al Musaimi O1,2, Al Shaer D3,4, de la Torre BG5, Albericio F. 2017 FDA Peptide Harvest. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2018 May 7;11(2). pii: E42.
11. Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. // *Appl. Microbiol Biotechnol*. 2006; 72(2):211-22.
12. Nierman WC. Vectors for cloning promoters and terminators. // *Biotechnology* 1988; 10:153-77.
13. Tegel H, Ottosson J, Hober S. Enhancing the protein production levels in *Escherichia coli* with a strong promoter. // *FEBS.J* 2011; 278(5):729-39.
14. Friehs K. Plasmid copy number and plasmid stability. // *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2004; 86:47-82.
15. Fuller F. A family of cloning vectors containing the lacUV5 promoter. // *Gene*. 1982; 19(1):43-54.

16. Herman A, de Boer, Lisa J, Comstock M.V. The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. // *Biochemistry*. 1983; 80(1): 21–25.
17. Polisky B., Bishop R.J., Gelfand D.H. A plasmid cloning vehicle allowing regulated expression of eukaryotic DNA in bacteria. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976; 73(11): 3900–4.
18. Brosius J, Erfle M, Storella J. Spacing of the -10 and -35 regions in the tac promoter. Effect on its in vivo activity. // *J. Biol Chem*. 1985; 260(6): 3539-41.
19. Mulligan ME, Brosius J, McClure WR. Characterization in vitro of the effect of spacer length on the activity of *Escherichia coli* RNA polymerase at the TAC promoter. // *J Biol Chem*. 25; 260(6): 3529-38.
20. Deuschle U, Kammerer W, Gentz R, Bujard H. Promoters of *Escherichia coli*: a hierarchy of in vivo strength indicates alternate structures. // *EMBO J*. 1986 5(11):2987-94.
21. Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. // *J. Mol. Biol*. 1986; 189, 113–130
22. Studier F.W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. // *J. Mol. Biol*. 1991; 219(1): 37–44.
23. Lodge Julia, Lund Peter M.S. Production of protein from cloned genes // *Gene cloning. Principle and application.* / под ред. L.G. Elizabeth Owen, Lyous Kirsti. : Taylor&Francis Group, 2007: 249–276.
24. Grossman TH, Kawasaki ES, Punreddy SR, Osburne MS. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. // *Gene*. 1998; 209(1-2): 95–103.
25. Jia B, Jeon C.O. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. // *Open Biol*. 2016 Aug; 6(8).
26. Josh BH, Puri RK. Optimization of expression and purification of two biologically active chimeric fusion proteins that consist of human interleukin-13 and *Pseudomonas* exotoxin in *Escherichia coli*. // *Protein Expr Purif*. 2005; 39(2):189-98.
27. de Marco A. Recombinant polypeptide production in *E. coli*: towards a rational approach to improve the yields of functional proteins. // *Microb. Cell Fact*. 2013 12, 101
28. Graslund S, et al. Protein production and purification. // *Nat. Methods* 2008; 5, 135–146
29. Lin WJ, Huang SW, Chou CP. DegP-coexpression minimizes inclusion-body formation upon overproduction of recombinant penicillin acylase in *Escherichia coli*. // *Biotechnol Bioeng*. 2001; 73: 484–492.
30. Lee SK, Keasling JD. Propionate-regulated high-yield protein production in *Escherichia coli*. // *Biotechnol Bioeng*. 2006; 93(5):912-8.

31. Bujard H, Gentz R., Lanzer M., Stueber D., Mueller M., Ibrahim I., Haeuptle M.T., Dobberstein B. A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. // *Methods in enzymology*. 1987; 155: 416–33.
32. Chen J, Surendran R, Lee JC, Matthews KS. Construction of a dimeric repressor: dissection of subunit interfaces in Lac repressor. // *Biochemistry* 1994; 33(5): 1234-41.
33. Lee N, Francklyn C, Hamilton EP. Arabinose-induced binding of AraC protein to ara2 activates the araBAD operon promoter. // *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1987; 84, 8814–8818.
34. Carra J.H., Schleif R.F. Variation of half-site organization and DNA looping by AraC protein. // *The EMBO journal*. 1993; 12(1): 35–44.
35. Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. // *Journal of bacteriology*. 1995; 177(14): 4121–30.
36. Egan S.M., Schleif R.F. A regulatory cascade in the induction of rhaBAD. // *Journal of molecular biology*. 1993; 234(1): 87–98.
37. Brautaset T, Lale R, Valla S. Positively regulated bacterial expression systems. // *Microb Biotechnol*. 2009; 2(1):15-30.
38. Giacalone MJ, Gentile AM, Lovitt BT, Berkley NL, Gunderson CW, Surber MW. Toxic protein expression in Escherichia coli using a rhamnose-based tightly regulated and tunable promoter system.// *Biotechniques*. 2006; 40(3): 355–364
39. Skerra A. A general vector, pASK84, for cloning, bacterial production, and single-step purification of antibody Fab fragments.// *Gene*. 1994; 141(1): 79-84.
40. Masri SA1, Rast H, Hu WG, Nagata LP, Chau D, Jager S, Mah D. Cloning and expression in E. coli of a functional Fab fragment obtained from single human lymphocyte against anthrax toxin. // *Mol Immunol*. 2007; 44(8):2101-6.
41. Elvin CM, Thompson PR, Argall ME, Hendry P, Stamford NP, Lilley PE, Dixon NE. Modified bacteriophage lambda promoter vectors for overproduction of proteins in Escherichia coli. // *Gene*. 1990; 87(1):123-6.
42. Love CA, Lilley PE, Dixon NE. Stable high-copy-number bacteriophage lambda promoter vectors for overproduction of proteins in Escherichia coli. // *Gene*. 1996; 176(1-2): 49-53
43. NormaValdez-Cruz, Luis Caspeta, Néstor Pérez, Octavio Ramírez, and Mauricio Trujillo-Roldán. Production of recombinant proteins in E. coli by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. // *Microb Cell Fact*. 2010; 9: 18.
44. Menart V, Jevsevar S, Vilar M, Trobis A, Pavko A. Constitutive versus thermoinducible expression of heterologous proteins in Escherichia coli based on strong PR,PL promoters from phage lambda. // *Biotechnol Bioeng*. 2003; 83(2):181-90.

45. Poindexter K., Gayle R.B. Induction of recombinant gene expression in *Escherichia coli* using an alkaline pH shift. // *Gene*. 1991; 97(1): 125–30.
46. Schauder B, Blöcker H, Frank R, McCarthy JE. Inducible expression vectors incorporating the *Escherichia coli* *atpE* translational initiation region. // *Gene*. 1987; 52(2-3):279-83.
47. Lim HK, Jung KH. Improvement of heterologous protein productivity by controlling postinduction specific growth rate in recombinant *Escherichia coli* under control of the PL promoter. // *Biotechnol Prog*. 1998; 14(4): 548-53.
48. Schmidt M, Babu KR, Khanna N, Marten S, Rinas U. Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. // *J Biotechnol*. 1999; 68(1):71–83.
49. Tabandeh F, Shojaosadati SA, Zomorodipour A, Khodabandeh M, Sanati MH, Yakhchali B. Heat induced production of human growth hormone by high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. // *Biotechnol Lett*. 2004; 26: 245–250
50. Mohammed Y, El-Baky NA, Redwan EM. Expression, purification, and characterization of recombinant human consensus interferon-alpha in *Escherichia coli* under λ P(L) promoter. // *Prep Biochem Biotechnol*. 2012; 42(5):426-47.
51. Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. // *Appl.Microbiol.Biotechnol*. 2003; 60(5):523-33.
52. Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. // *Nature*. 1975; 258(5536): 598–9.
53. Block H, Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, Labahn J, Schäfer F. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. // *Methods Enzymol*. 2009; 463:439-73.
54. Chaga G., Hopp J., Nelson P. Immobilized metal ion affinity chromatography on Co²⁺-carboxymethylaspartate-agarose Superflow, as demonstrated by one-step purification of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle. // *Biotechnology and applied biochemistry*. 1999; 29 (pt 1): 19–24.
55. Schmidt T.G.M., Skerra A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. // *Nature protocols*. 2007; 2(6): 1528–35.
56. Skerra A, Schmidt TG. Applications of a peptide ligand for streptavidin: the Strep-tag.// *Biomol Eng*. 1999; 16(1-4):79-86
57. Korndörfer I.P., Skerra A. Improved affinity of engineered streptavidin for the Strep-tag II peptide is due to a fixed open conformation of the lid-like loop at the binding site. // *Protein science: a publication of the Protein Society*. 2002; 11(4): 883–93.

58. Lamla T., Erdmann V.A. The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins. // *Protein Expr Purif.* 2004; 33(1): 39–47.
59. Zheng K, Makagiansar IT, Wang M, Urbauer JL, Kuczera K, Siahaan TJ. Expression, purification, and structural study of the EC4 domain of E-cadherin. // *Protein Expr Purif.* 2004; 33(1):72-9
60. Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 1988; 67(1):31-40.
61. Sandra Harper, David W. Speicher Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. // *Methods Mol Biol.* 2011; 681: 259–280.
62. Haun RS, Moss J. Ligation-independent cloning of glutathione S-transferase fusion genes for expression in *Escherichia coli*. // *Gene.* 1992; 112(1): 37-43.
63. Davies AH, Jowett JB, Jones IM. Recombinant baculovirus vectors expressing glutathione-S-transferase fusion proteins. // *Biotechnology (N Y)* 1993; 11: 933–936
64. Mitchell DA, Marshall TK, Deschenes RJ. Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. // *Yeast.* 1993;9:715–722
65. Vikis HG, Guan KL. Glutathione-S-transferase-fusion based assays for studying protein-protein interactions. // *Methods Mol Biol.* 2004; 261: 175–186.
66. Leto TL, Pleasic S, Forget BG, Benz EJ Jr, Marchesi VT. Characterization of the calmodulin-binding site of nonerythroid alpha-spectrin. Recombinant protein and model peptide studies. // *J Biol Chem.* 1989; 264(10):5826-30.
67. Stofko-Hahn RE, Carr DW, Scott JD. A single step purification for recombinant proteins. Characterization of a microtubule associated protein (MAP 2) fragment which associates with the type II cAMP-dependent protein kinase. // *FEBS Lett.* 1992; 302(3):274-8.
68. Hosfield T., Lu Q. Influence of the amino acid residue downstream of (Asp)4Lys on enterokinase cleavage of a fusion protein. // *Analytical biochemistry.* 1999; 269(1): 10–6.
69. Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003; 60(5):523-33
70. Hopp T.P. Prickett, K.S., Virginia L.P., Randell T.L., March, Carl J.M., Cerretti, D.P., David L.U., Paul J.C. A Short Polypeptide Marker Sequence Useful for Recombinant Protein Identification and Purification // *Bio/Technology.* 1988; 6(10): 1204–1210.
71. Fong BA, Wu WY, Wood DW. The potential role of self-cleaving purification tags in commercial-scale processes. // *Trends Biotechnol.* 2010; 28(5):272-9.
72. Collins-Racie LA, McColgan JM, Grant KL, DiBlasio-Smith EA, McCoy JM, LaVallie ER. Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA. // *Biotechnology.* 1995; 13(9):982-7.

73. Gloeckner CJ, Boldt K, Schumacher A, Ueffing M. Tandem affinity purification of protein complexes from mammalian cells by the Strep/FLAG (SF)-TAP tag. // *Methods Mol Biol.* 2009; 564: 359-72
74. Smith JC, Derbyshire RB, Cook E, Dunthorne L, Viney J, Brewer SJ, Sassenfeld HM, Bell LD. Chemical synthesis and cloning of a poly(arginine)-coding gene fragment designed to aid polypeptide purification. // *Gene.* 1984; 32(3): 321–7.
75. Fuchs SM, Raines RT. Pathway for polyarginine entry into mammalian cells. // *Biochemistry.* 2004; 43(9):2438-44.
76. Fuchs S.M., Raines R.T. Polyarginine as a multifunctional fusion tag. // *Protein science: a publication of the Protein Society.* 2005; 14(6): 1538–44.
77. Watanabe, T., Kobori, K., Miyashita, K., Fujii, T., Sakai, H., Uchida, M., and Tanaka, H., Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. // *J. Biol. Chem.*, 1993; 268, 18567–18572.
78. Coolbaugh MJ, Wood DW. Purification of *E. coli* proteins using a self-cleaving chitin-binding affinity tag. // *Methods Mol Biol.* 2014; 1177:47-58
79. Mitchell SF, Lorsch JR. Protein Affinity Purification using Intein/Chitin Binding Protein Tags. // *Methods Enzymol.* 2015; 559:111-25
80. Lehtio J, Sugiyama J, Gustavsson M, Fransson L, Linder M, et al. The binding specificity and affinity determinants of family 1 and family 3 cellulose binding modules. // *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100:484–489
81. Li M, Iang J, Qu H, Zhang Q, Bai F, Bai G. Novel immobilization of arginase I via cellulose-binding domain and its application in producing of L-ornitine. // *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 2014; 50(1):52-8.
82. Duplay P, Bedouelle H, Fowler A, Zabin I, Saurin W, Hofnung M. Sequences of the malE gene and of its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. // *J Biol Chem.* 1984; 259(16):10606-13.
83. Schwartz M, Kellermann O, Szmelcman S, Hazelbauer GL. Further studies on the binding of maltose to the maltose-binding protein of *Escherichia coli*. // *Eur J Biochem.* 1976; 71(1):167-70.
84. Bedouelle H, Duplay P. Production in *Escherichia coli* and one-step purification of bifunctional hybrid proteins which bind maltose. Export of the Klenow polymerase into the periplasmic space. // *Eur J Biochem.* 1988; 171(3):541-9.

85. Maina CV1, Riggs PD, Grandea AG 3rd, Slatko BE, Moran LS, Tagliamonte JA, McReynolds LA, Guan CD. An Escherichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. // *Gene*. 1988; 74(2):365-73.
86. Pryor KD, Leiting B. High-level expression of soluble protein in Escherichia coli using a His6-tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system. // *Protein Expr Purif*. 1997; 10(3):309-19.
87. Hamilton SR, O'Donnell JB Jr, Hammet A, Stapleton D, Habinowski SA, Means AR, Kemp BE, Witters LA. AMP-activated protein kinase kinase: detection with recombinant AMPK alpha1 subunit. // *Biochemical and biophysical research communications*. 2002; 293(3): 892–8.
88. Podmore A.H., Reynolds P.E. Purification and characterization of VanXY(C), a D,D-dipeptidase/D,D-carboxypeptidase in vancomycin-resistant Enterococcus gallinarum BM4174. // *Eur. J. Bbiochem*. 2002; 269(11): 2740–6.
89. Young C.L., Britton Z.T., Robinson A.S. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. // *Biotechnology journal*. 2012; 7(5): 620–34.
90. Sachdev D., Chirgwin J.M. Properties of soluble fusions between mammalian aspartic proteinases and bacterial maltose-binding protein. // *Journal of protein chemistry*. 1999; 18(1): 127–36.
91. Kapust R.B., Waugh D.S. Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. // *Protein science : a publication of the Protein Society*. 1999; 8(8): 1668–74.
92. Chatterjee DK, Esposito D. Enhanced soluble protein expression using two new fusion tags. // *Protein Expr Purif*. 2006; 46(1):122-9.
93. Wollman EE, d'Auriol L, Rimsky L, Shaw A, Jacquot JP, Wingfield P, Graber P, Dessarps F, Robin P, Galibert F, Bertoglio J, Fradeli D. Cloning and expression of a cDNA for human thioredoxin. // *J Biol Chem*. 1988; 263(30):15506-12.
94. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems.// *J Biol Chem* 1989; 264(24): 13963–6.
95. LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF, McCoy JM. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. // *Biotechnology (N Y)*. 1993; 11(2):187-93.
96. LaVallie ER, DiBlasio-Smith EA, Collins-Racie LA, Lu Z, McCoy JM. Thioredoxin and related proteins as multifunctional fusion tags for soluble expression in E. coli. // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2003; 205: 119–40.
97. Sachdev D, Chirgwin JM. Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to maltose-binding protein or thioredoxin.// *Protein Expr Purif*. 1998; 12(1):122-32.

98. LaVallie ER, DiBlasio EA, Kovacic S, Grant KL, Schendel PF, McCoy JM. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. // *Biotechnology* (Nature Publishing Company). 1993; 11(2): 187–93.
99. McCoy J, La Ville E. Expression and purification of thioredoxin fusion proteins.// *Curr Protoc Protein Sci*. 2001; Chapter 6:Unit 6.7.
100. Bayer M.E. Bayer M.H., Lunn C.A., Pigie V. Association of thioredoxin with the inner membrane and adhesion sites in *Escherichia coli*. // *Journal of bacteriology*. 1987; 169(6): 2659–66.
101. Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, Schlesinger DH, Niall HD, Boyse EA. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1975; 72 (1): 11–5.
102. Sharp PM, Li WH. Ubiquitin genes as a paradigm of concerted evolution of tandem repeats.// *J Mol Evol*. 1987; 25(1):58–64
103. Ecker DJ, Butt TR, Marsh J, Sternberg EJ, Margolis N, Monia BP, Jonnalagadda S, Khan MI, Weber PL, Mueller L, et al. Gene synthesis, expression, structures, and functional activities of site-specific mutants of ubiquitin. // *J Biol Chem*. 1987; 262(29):14213–14221.
104. Butt TR, Jonnalagadda S, Monia BP, Sternberg EJ, Marsh JA, Stadel JM, Ecker DJ, Croke ST. Ubiquitin fusion augments the yield of cloned gene products in *Escherichia coli*. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(8):2540-4.
105. Baker RT, Smith SA, Marano R, McKee J, Board PG. Protein expression using cotranslational fusion and cleavage of ubiquitin. Mutagenesis of the glutathione-binding site of human Pi class glutathione S-transferase. // *J Biol Chem*. 1994; 269(41):25381-6.
106. Varshavsky A. Ubiquitin fusion technique and related methods.// *Methods Enzymol*. 2005; 399:777-99.
107. Catanzariti A.M., Soboleva T.A., Jans D.A., Board P.G., Baker R.T. An efficient system for high-level expression and easy purification of authentic recombinant proteins. // *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2004; 13(5): 1331–9.
108. Ronau JA, Beckmann JF, Hochstrasser M. Substrate specificity of the ubiquitin and Ubl proteases.// *Cell Res*. 2016; 26(4): 441–456
109. Burroughs AM, Iyer LM, Aravind L. Structure and evolution of ubiquitin and ubiquitin-related domains. // *Methods Mol Biol*. 2012; 832:15-63.
110. Van der Veen AG, Ploegh HL. Ubiquitin-like proteins. // *Annu Rev Biochem*. 2012; 81:323-57.
111. Streich FC Jr, Lima CD. Structural and functional insights to ubiquitin-like protein conjugation. // *Annu Rev Biophys*. 2014; 43:357-79.

112. Satakarni M., Curtis R. Production of recombinant peptides as fusions with SUMO. // *Protein Expr Purif.* 2011; 78(2): 113–9.
113. Lee CD, Sun HC, Hu SM, Chiu CF, Homhuan A, Liang SM, Leng CH, Wang TF. An improved SUMO fusion protein system for effective production of native proteins.// *Protein Sci.* 2008; 17(7):1241-8.
114. Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, Mattern MR. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. // *Protein Expr Purif.* 2005; 43(1): 1–9.
115. Johnson E.S., Blobel G. Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. // *The Journal of cell biology.* 1999; 147(5): 981–94.
116. Panavas T., Sanders C., Butt T.R. SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems. // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.).* 2009; 497: 303–17.
117. Bayer P., Arndt A., Metzger S., Mahajan R., Melchior F., Jaenicke R., Becker J. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. // *Journal of molecular biology.* 1998; 280(2): 275–86.
118. Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, Drinker M, Weeks SD, Butt TR. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. // *Journal of structural and functional genomics.* 2004; 5(1-2): 75–86.
119. Zuo X, Li S, Hall J, Mattern MR, Tran H, Shoo J, Tan R, Weiss SR, Butt TR. Enhanced expression and purification of membrane proteins by SUMO fusion in *Escherichia coli*. // *J Struct Funct Genomics.* 2005; 6(2-3):103-11.
120. Peroutka Iii RJ, Orcutt SJ, Strickler JE, Butt TR. SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in prokaryotes and eukaryotes. // *Methods Mol Biol.* 2011; 705:15-30.
121. Dassa B, Yanai I, Pietrokovski S. New type of polyubiquitin-like genes with intein-like autoprocessing domains. // *Trends Genet.* 2004; 20(11):538-42.
122. Randall LL, Hardy SJ, Thom JR. Export of protein: a biochemical view.// *Annu Rev Microbiol.* 1987; 41:507–541.
123. Oliver D. Protein secretion in *Escherichia coli*. // *Annual review of microbiology.* 1985; 39: 615–48.
124. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. // *Current opinion in biotechnology.* 1999; 10(5): 411–21.
125. Mergulhão F.J.M., Summers D.K., Monteiro G. a. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. // *Biotechnology advances.* 2005; 23(3): 177–202.

126. Saïda F, Uzan M, Odaert B, Bontems F. Expression of highly toxic genes in *E. coli*: special strategies and genetic tools. // *Curr Protein Pept Sci.* 2006; 7(1): 47-56.
127. Anderson, L E, Walsh, KA, Neurath H. Bovine enterokinase. Purification, specificity, and some molecular properties. // *Biochemistry* 1977; 16: 3354-3360
128. Liepnieks, J. J., and Light, A. The preparation and properties of bovine enterokinase. // *J. Biol. Chem.* 1979; 254:1677-1683
129. Choi SI, Song HW, Moon JW, Seong BL. Recombinant enterokinase light chain with affinity tag: expression from *Saccharomyces cerevisiae* and its utilities in fusion protein technology.// *Biotechnol Bioeng.* 2001; 75:718–724
130. Hosfield T., Lu Q. Influence of the amino acid residue downstream of (Asp)4Lys on enterokinase cleavage of a fusion protein. // *Analytical biochemistry.* 1999; 269(1):. 10–6.
131. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, Powers P. Development of the human coagulation system in the full-term infant.// *Blood.* 1987; 70(1):165-72
132. Vergis J.M., Wiener M.C. The variable detergent sensitivity of proteases that are utilized for recombinant protein affinity tag removal. // *Protein Expr Purif.* 2011; 78(2):. 139–42.
133. Baubichon-Cortay H, Baggetto LG, Dayan G, Di Pietro A. Overexpression and purification of the carboxyl-terminal nucleotide-binding domain from mouse P-glycoprotein. Strategic location of a tryptophan residue.// *J Biol Chem.* 1994; 269(37):22983-9.
134. Huber WJ 3rd, Backes WL. Expression and characterization of full-length human heme oxygenase-1: the presence of intact membrane-binding region leads to increased binding affinity for NADPH cytochrome P450 reductase.// *Biochemistry.* 2007; 46(43):12212-9.
135. Mertens K, Bertina RM. Pathways in the activation of human coagulation factor X. // *Biochem J.* 1980; 185(3):647-58.
136. Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase.// *Gene.* 1988;67:31–40.
137. Jenny RJ, Mann KG, Lundblad RL. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. // *Protein Expr Purif.* 2003; 31(1):1-11.
138. W.G. Dougherty, J.C. Carrington, S.M. Cary, T.D. Parks. Biochemical and mutational analysis of a plant virus polyprotein cleavage site. // *EMBO J.* 1988; 7: 1281-1287
139. W.G. Dougherty, T.D. Parks. Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains.// *Virology* 1991; 183: 449-456,
140. Cesaratto F, López-Requena A, Burrone OR, Petris G. Engineered tobacco etch virus (TEV) protease active in the secretory pathway of mammalian cells. // *J Biotechnol.* 2015; 212:159-66.

141. Cesaratto F, Burrone OR, Petris G. Tobacco Etch Virus protease: A shortcut across biotechnologies. // *J Biotechnol.* 2016; 231:239-49
142. Mohanty A.K., Simmons C.R., Wiener M.C. Inhibition of tobacco etch virus protease activity by detergents. // *Protein Expr Purif.* 2003. T. 27. № 1. C. 109–14.
143. Sun C, Liang J, Shi R, Gao X, Zhang R, Hong F, Yuan Q, Wang S. Tobacco etch virus protease retains its activity in various buffers and in the presence of diverse additives.// *Protein Expr Purif.* 2012; 82(1):226-31.
144. Carr S, Miller J, Leary SE, Bennett AM, Ho A, Williamson ED. Expression of a recombinant form of the V antigen of *Yersinia pestis*, using three different expression systems.// *Vaccine.* 1999; 18:153–159.
145. Cordingley MG, Callahan PL, Sardana VV, Garsky VM, Colonno RJ. Substrate requirements of human rhinovirus 3C protease for peptide cleavage in vitro. // *J Biol Chem.* 1990; 265(16):9062-5.
146. Raheem Ullah, Majid Ali Shah, Soban Tufail, Fouzia Ismat, Muhammad Imran, Mazhar Iqbal, Osman Mirza, Moazur Rhaman. Activity of the Human Rhinovirus 3C Protease Studied in Various Buffers, Additives and Detergents Solutions for Recombinant Protein Production. // *PLoS One.* 2016; 11(4): e0153436
147. Panavas T., Sanders C., Butt T.R. SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems. // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.).* 2009; 497: 303–17
148. Jonathan N. Pruneda, Charlotte H. Durkin, Paul P. Geurink, Huib Ovaas, Balaji Santhanam, David W. Holden, David Komander. The Molecular Basis for Ubiquitin and Ubiquitin-like Specificities in Bacterial Effector Proteases.// *Mol Cell.* 2016; 63(2): 261–276.
149. Catic A., Misaghi S., Korbel G.A., Ploegh H.L. ElaD, a Deubiquitinating protease expressed by *E. coli*. // *PloS one.* 2007; 2(4): e381
150. Saitoh H, Uwada J, Azusa K. Strategies for the expression of SUMO-modified target proteins in *Escherichia coli*. // *Methods Mol Biol.* 2009; 497:211-21.
151. Kane PM, Yamashiro CT, Wolczyk DF, Neff N, Goebel M, Stevens TH. Protein splicing converts the yeast TFP1 gene product to the 69-kD subunit of the vacuolar H(+)-adenosine triphosphatase. // *Science.* 1990; 250(4981):651–657.
152. Perler F. B., Davis E. O., Dean G. E., Gimble F. S., Jack W. E., Neff N., Noren C. J., Thorner J., and Belfort M. Protein splicing elements: inteins and exteins — a definition of terms and recommended nomenclature. // *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22(7), 1125–1127

153. Xu M., Southworth M. W., Mersha F. B., Hornstra L. J., and Perler F.B. In vitro protein splicing of purified precursor and the identification of a branched intermediate. // *Cell Press*, 1993, 75(7), 1371–77.
154. Kawasaki, M., Nogami, S., Satow, Y., Ohya, Y., and Anraku, Y. Identification of three core regions essential for protein splicing of the yeast Vma1 Protozyme. // *J. of Biol. Chem.*, 1997; 272(25): 15668-74.
155. Pietrokovski, S. Modular organization of inteins and C-terminal autocatalytic domains. // *Protein Science*, 1998; 7(1), 64–71.
156. Ding, Y., Xu, M.-Q., Ghosh, I., Chen, X., Ferrandon, S., Lesage, G. and Rao, Z. Crystal structure of a mini-intein reveals a conserved catalytic module involved in side chain cyclization of asparagine during protein splicing. // *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(40), 39133-39142.
157. Perler, F.B. InBase: the Intein Database. // *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30(1), 383-384
158. Chong, S., and Xu, M. Q. Protein splicing of the *Saccharomyces cerevisiae* VMA intein without the endonuclease motifs. // *J. Biol. Chem.* 1997; 272(25), 15587-90.
159. Noren, C.J., Wang, J. and Perler, F. B. Dissecting the Chemistry of Protein Splicing and its Applications. // *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 2000, 39(3), 450-466.
160. Perler FB, Olsen GJ, Adam E. Compilation and analysis of intein sequences.// *Nucleic Acids Res.*, 1997; 25(6),1087-93.
161. Clarke N. A proposed mechanism for the self-splicing of proteins.// *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91(23), 11084-8.
162. Mizutani, R., Nogami, S., Kawasaki, M., Ohya, Y., Anraku, Y. and Satow, Y. Protein-splicing Reaction via a Thiazolidine Intermediate: Crystal Structure of the VMA1-derived Endonuclease Bearing the N and C-terminal Propeptides. // *J. Mol. Biol.* 2002, 316(4), 919-929.
163. Poland, B.W., Xu, M.Q., Quioco, F.A. Structural Insights into the Protein Splicing Mechanism of PI-SceI. // *J. Biol. Chem.*, 2000, 275(22), 16408-16413
164. Cooper, A.A., Stevens, T.H. Protein splicing: Excision of intervening sequences at the protein level. // *BioEssays.*, 1993; 15(10), 667-674.
165. Shao, Y., Xu, M.-Q. and Paulus, H. Protein splicing: Characterization of the aminosuccinimide residue at the carboxyl terminus of the excised intervening sequence. // *Biochemistry*, 1995; 34(34), 10844-10850.
166. Gorbalenya, A. E. Non-canonical inteins. // *Nucleic Acids Res.*, 1998, 26(7), 1741-8.
167. Pietrokovski, S. Identification of a virus intein and a possible variation in the protein-splicing reaction. // *Curr. Biol.*, 1998, 8(18), 634-635.

168. Southworth, M.W., Benner, J., Perler, F.B. An Alternative Protein Splicing Mechanism for Inteins Lacking an N-terminal Nucleophile. // *EMBO J.*, 2000; 19(18), 5019-5026.
169. Xu M., Comb D. G., Paulus H., Noren C. J., Shao Y., and Perler F. B. Protein splicing: an analysis of the branched intermediate and its resolution by succinimide formation. // *EMBO J.*, 1994; 13(23): 5517-22.
170. Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M.E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Kucera, R.B., Hirvonen, C.A., Pelletier, J.J., Paulus, H., and Xu, M. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. // *Gene* 1997; 192(2):271-281
171. Chong S., Williams K. S., Wotkowicz C., Xu M.Q. Modulation of protein splicing of the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar membrane ATPase intein. // *J. Biol Chem.*, 1998; 273(17), 10567-77.
172. Ghosh I., Sun L., Xu M. Zinc inhibition of protein trans-splicing and identification of regions essential for splicing and association of a split inteins. // *J. Biol Chem.*, 2001, 276(26), 24051-8.
173. Nichols N.M., Benner J.S., Martin D.D., Evans T.C. Jr. Zinc Ion Effects on Individual Ssp DnaE Intein Splicing Steps: Regulating Pathway Progression. // *Biochemistry*, 2003; 42(18), 5301-5311.
174. Chong S, Montello GE, Zhang A, Cantor EJ, Liao W, Xu MQ, Benner J. Utilizing the C-terminal cleavage activity of a protein splicing element to purify recombinant proteins in a single chromatographic step. // *Nucleic Acids Res.* 1998; 26(22):5109-15.
175. IMPACT™-CN. Protein Purification System Now Featuring Fusion to C- or N- Terminus of the Target Protein (Instruction Manual. Version 1.9.) // New England Biolabs., 2001.
176. IMPACT™-TWIN. Purification, Ligation and Cyclization of Recombinant Proteins (Instruction Manual. Version 1.2.) New England Biolabs, 2002.
177. Morassutti C., De Amicis F., Bandiera A., Marchetti S. Expression of SMAP-29 cathelicidin-like peptide in bacterial cells by intein-mediated system. // *Protein Expr. Purif.* 2005; 39(2): 160-168.
178. Zhang A., Gonzalez S.M., Cantor E.J., Chong S. Construction of a mini-intein fusion system to allow both direct monitoring of soluble protein expression and rapid purification of target proteins. // *Gene*, 2001; 275(2): 241-252.
179. Humphries H.E., Christodoulides M., Heckels J.E. Expression of the class 1 outer-membrane protein of *Neisseria meningitidis* in *Escherichia coli* and purification using a self-cleavable affinity tag. // *Protein Expr. Purif.*, 2002; 26(2): 243-248.

180. Zhang A., Gonzalez S.M., Cantor E.J., Chong S. Construction of a mini-intein fusion system to allow both direct monitoring of soluble protein expression and rapid purification of target proteins. // *Gene*, 2001; 275(2): 241-252.
181. Humphries HE, Williams JN, Christodoulides M, Heckels JE. Recombinant meningococcal PorA protein, expressed using a vector system with potential for human vaccination, induces a bactericidal immune response. // *Vaccine*. 2004; 22(11-12):1564-9.
182. Yan SS, Yan J, Shi G, Xu Q, Chen SC, Tian YW. Production of native protein by using *Synechocystis* sp. PCC6803 DnaB mini-intein in *Escherichia coli*. // *Protein Expr. Purif.* 2005; 40(2): 340-345.
183. Li Z-Yu, Fan J-H, Yuan J-M. Single-column purification of recombinant human neurotrophin-3 (hNT3) by using the intein mediated self-cleaving system. // *Biotechnology Letters*. 2002; 24(20): 1723-1727.
184. Z Sun Z1, Chen J, Yao H, Liu L, Wang J, Zhang J, Liu JN. Use of Ssp dnaB derived mini-intein as a fusion partner for production of recombinant human brain natriuretic peptide in *Escherichia coli*. // *Protein Expr. Purif.* 2005; 43: 26-32.
185. Manconi B, Cabras T, Vitali A, Fanali C, Fiorita A, Inzitari R, Castagnola M, Messina I, Sanna MT. Expression, purification, phosphorylation and characterization of recombinant human statherin. // *Protein Expr Purif.* 2010; 69(2): 219-25.
186. Xing L, Xu W, Zhou B, Chen Y, Lin Z. Facile expression and purification of the antimicrobial peptide histatin 1 with a cleavable self-aggregating tag (cSAT) in *Escherichia coli*. // *Protein Expr Purif.* 2013; 88(2): 248-53
187. Esipov RS, Stepanenko VN, Gurevich AI, Chupova LA, Miroshnikov AI. Production and purification of recombinant glucagon overexpressed as Intein fusion protein in *Escherichia coli*. // *Protein&Peptide letters*. 2006; 13(4): 343-347.
188. Esipov RS, Stepanenko VN, Chupova LA, Boyarskikh UA, Filipenko ML, Miroshnikov AI. Production of recombinant human epidermal growth factor using Ssp dnaB mini-intein system. // *Protein Expr Purif.* 2008; 61(1): 1-6.
189. Степаненко В.Н., Есипов Р.С., Гуревич А.И., Чупова Л.А., Мирошников А.И. Рекомбинантный оксинтомодулин. // *Биоорганическая химия*. 2007; 33(2): 245-250.
190. Есипов Р.С., Гуревич А.И., Степаненко В.Н., Чупова Л.А., Чувиковский Д.В., Мирошников А.И. Рекомбинантный тимозин $\alpha 1$. // *Биоорганическая химия*. 2004; 30(5): 481-486.
191. Esipov R.S., Makarov D.A., Stepanenko V.N, Miroshnikov A.I. Development of the Intein-mediated method for production of recombinant Thymosin $\beta 4$ from the acetylated in vivo fusion protein. // *Journal of Biotechnology*. 2016; 228: 73-81

192. Wood DW. New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification. // *Curr Opin Struct Biol.* 2014; 26: 54-61.
193. Evans TC Jr, Xu MQ. Intein-mediated protein ligation: harnessing nature's escape artists. // *Biopolymers.* 1999; 51(5): 333-42.
194. Thomas C. Evans, Jr., Deana Martin, Reto Kolly, Daniel Panne, Luo Sun, Inca Ghosh, Lixin Chen, Jack Benner, Xiang-Qin Liu, Ming-Qun Xu. Protein trans-Splicing and Cyclization by a Naturally Split Intein from the *dnaE* Gene of *Synechocystis* Species PCC6803. // *J. Biol. Chem.*, 2000; 275(13), 9091–9094.
195. Evans TC, Benner JJ, Xu MQ. The Cyclization and Polymerization of Bacterially Expressed Proteins Using Modified Self-splicing Inteins. // *J. Biol. Chem.*, 1999; 274(26), 18359-18363
196. Tavassoli A. SICLOPPS cyclic peptide libraries in drug discovery. // *Curr Opin Chem Biol.* 2017; 38:30-35
197. Scott Ch., Wall M., Wahnou D., Benkovic SJ. Production of cyclic peptides and proteins in vivo. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(24): 13638–13643.
198. Iwai H., Lingel A., Pluckthun A. Cyclic Green Fluorescent Protein Produced *in Vivo* Using an Artificially Split PI-*PfuI* Intein from *Pyrococcus furiosus*. // *J. Biol. Chem.*, 2001; 276(19): 16548–16554
199. Gillies AR, Hsii JF, Oak S, Wood DW. Rapid cloning and purification of proteins: gateway vectors for protein purification by self-cleaving tags. // *Biotechnol Bioeng.* 2008; 101(2):229-40.
200. Slater S, Gallaher T, Dennis D. Production of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. // *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58:1089–1094.
201. Wieczorek R, Pries A, Steinbuchel A, Mayer F. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol.* //1995; 177:2425–2435
202. Banki M.R., Gerngross T.U., Wood D.W. Novel and economical purification of recombinant proteins: intein-mediated protein purification using in vivo polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association.” // *Protein Sci.* 2005; 14(6):1385-6.
203. Barnard G.C., McCool J.D., Wood D.W., Gerngross T.U. Integrated recombinant protein expression and purification platform based on *Ralstonia eutropha*. // *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(10): 5735-42.
204. Zhou X, Song Z, Liu X, Jia F, Wang Y. Production of recombinant porcine interferon alpha using PHB-intein-mediated protein purification strategy. // *Appl Biochem Biotechnol.* 2011; 163(8): 981-93.

205. Meyer DE, Chilkoti A. Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides. // *Nature Biotechnology*. 1999; 17: 1112–1115
206. Hassouneh W, Christensen T, Chilkoti A. Elastin-like polypeptides as a purification tag for recombinant proteins. // *Curr Protoc Protein Sci*. 2010; Chapter 6: Unit 6.11
207. Banki M.R., Feng L. Wood D.W., Simple bioseparations using self-cleaving elastin-like polypeptide tags. // *Nat Methods*., 2005, 2(9): 659-61
208. Bellucci JJ, Amiram M, Bhattacharyya J, McCafferty D, Chilkoti A. Three-in-one chromatography-free purification, tag removal, and site-specific modification of recombinant fusion proteins using sortase A and elastin-like polypeptides.// *Angewandte Chemie*. 2013; 52: 3703–3708.
209. Shi C, Meng Q, Wood DW. A dual ELP-tagged split intein system for non-chromatographic recombinant protein purification. // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013; 97(2): 829-35.
210. Ge X, Trabbic-Carlson K, Chilkoti A, Filipe CD. Purification of an elastin-like fusion protein by microfiltration. // *Biotechnol Bioeng*. 2006; 95(3): 424-32.
211. Kang HJ, Kim JH, Chang WJ, Kim ES, Koo YM. Heterologous expression and optimized one-step separation of levansucrase via elastin-like polypeptides tagging system. // *J Microbiol Biotechnol*. 2007; 17(11): 1751-7.
212. Berman HM, Henrick K, Nakamura H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. // *Nature Structural Biology*. 2003; 10(12): 980.
213. Young CL, Britton ZT, Robinson AS. Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. // *Biotechnol J*. 2012; 7(5): 620-34.
214. Arya R, Sabir JS, Bora RS, Saini KS. Optimization of culture parameters and novel strategies to improve protein solubility.// *Methods Mol Biol*. 2015; 1258: 45-63.
215. Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*.// *Protein J*. 2013; 32(6):419-25
216. Kane JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. // *Curr Opin Biotechnol* 1995; 6:494–500,
217. Sequeira AF, Turchetto J, Saez NJ, Peysson F, Ramond L, Duhoo Y, Blémont M, Fernandes VO, Gama LT, Ferreira LM, Guerreiro C, Gilles H, Darbon H, Fontes CM, Vincentelli R. Gene design, fusion technology and TEV cleavage conditions influence the purification of oxidized disulphide-rich venom peptides in *Escherichia coli*. // *Microb Cell Fact*. 2017; 16(1): 4.

218. Fakruddin M., Mohammad Mazumdar R, Bin Mannan KS, Chowdhury A, Hossain M.N. Critical Factors Affecting the Success of Cloning, Expression, and Mass Production of Enzymes by Recombinant *E. coli*. // ISRN Biotechnol. 2013; 2013: 587-590
219. Miroux B, Walker JE. Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. // J Mol Biol. 1996; 260: 289–298
220. Studier, W. F., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., Dubendorff, J. W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. // Methods Enzymol 1990; 185, 60–89
221. Lopez PJ, Marchand I, Joyce SA, Dreyfus M. The C-terminal half of RNase E, which organizes the Escherichia coli degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. // Mol Microbiol. 1999; 33(1): 188-99
222. Makino T, Skretas G, Georgiou G. Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. // Microb Cell Fact. 2011; 10:32
223. Wacker M, Linton D, Hitchen PG, Nita-Lazar M, Haslam SM, North SJ, Panico M, Morris HR, Dell A, Wren BW. N-linked glycosylation in Campylobacter jejuni and its functional transfer into E. coli. // Science. 2002;298(5599):1790–1793
224. Linton D, Dorrell N, Hitchen PG, Amber S, Karlyshev AV, Morris HR, Dell A, Valvano MA, Aebi M, Wren BW. Functional analysis of the Campylobacter jejuni N-linked protein glycosylation pathway. // Mol Microbiol. 2005; 55(6): 1695–1703
225. Pandhal J, Ow SY, Noirel J, Wright PC. Improving N-glycosylation efficiency in Escherichia coli using shotgun proteomics, metabolic network analysis, and selective reaction monitoring. // Biotechnol Bioeng. 2011; 108(4): 902-12
226. Feldman MF, Wacker M, Hernandez M, Hitchen PG, Marolda CL, Kowarik M, Morris HR, Dell A, Valvano MA, Aebi M. Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in Escherichia coli. // Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(8): 3016–3021
227. Ihssen J, Kowarik M, Dilettoso S, Tanner C, Wacker M, Thony-Meyer L. Production of glycoprotein vaccines in Escherichia coli. // Microb Cell Fact. 2010; 9: 61
228. Arnesen T, Van Damme P, Polevoda B, Helsen K, Evjenth R. Proteomics analyses reveal the evolutionary conservation and divergence of N-terminal acetyltransferases from yeast and humans. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106: 8157–8162
229. Gautschi M, Just S, Mun A, Ross S, Rucknagel P, Dubaquier Y, Ehrenhofer-Murray A, Rospert S. The yeast N(alpha)-acetyltransferase NatA is quantitatively anchored to the ribosome and interacts with nascent polypeptides. // Mol Cell Biol. 2003; 23(20): 7403–7414

230. Johnson M, Coulton AT, Geeves MA, Mulvihill DP. Targeted amino-terminal acetylation of recombinant proteins in *E. coli*. // PLoS One. 2010; 5(12):e15801
231. Gupta SK, Shukla P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. // Crit Rev Biotechnol. 2016; 36(6): 1089-1098
232. Massey-Gendel E, Zhao A, Boulting G, Kim HY, Balamotis MA, Seligman LM, Nakamoto RK, Bowie JU. Genetic selection system for improving recombinant membrane protein expression in *E. coli*. // Protein Sci. 2009; 18(2): 372–383.
233. Lee JY, Sung BH, Yu BJ, Lee JH, Lee SH, Kim MS, Koob MD, Kim SC. Phenotypic engineering by reprogramming gene transcription using novel artificial transcription factors in *Escherichia coli*. // Nucleic Acids Res. 2008; 36(16):e102.
234. Makino T, Skretas G, Georgiou G. Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. // Microb Cell Fact. 2011; 10: 32
235. Grosjean H, Fiers W. Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes. // Gene. 1982; 18(3): 199-209
236. Sharp PM, Li WH. The codon Adaptation Index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. // Nucleic Acids Res. 1987; 15(3): 1281-95
237. Wu G, Zheng Y, Qureshi I, Zin HT, Beck T. SGDB: a database of synthetic genes re-designed for optimizing protein over-expression. // Nucleic Acids Res. 2007; 35: D76–79
238. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. // Trends Biotechnol. 2004; 22:346–353
239. Fuglsang A. Codon optimizer: a freeware tool for codon optimization. // Protein Expr Purif. 2003; 31:247–249
240. Puigbò P, Guzmán E, Romeu A, Garcia-Vallvé S. OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. // Nucleic Acids Res. 2007; 35: W126–W131
241. Carlson R. The pace and proliferation of biological technologies. // Biosecur Bioterror. 2003; 1(3): 203-14
242. Wu G, Dress L, Freeland SJ. Optimal encoding rules for synthetic genes: the need for a community effort. Mol Syst Biol. 2007; 3: 134
243. Xiong A-S, Peng R-H, Zhuang J, Gao F, Li Y, Cheng Z-M. Chemical gene synthesis: strategies, softwares, error corrections, and applications. // FEMS Microbiol Rev. 2008; 32: 522–540

244. Wu X, Jornvall H, Berndt KD, Oppermann U. Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance. // *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 313(1): 89–96
245. Mahalik S, Sharma AK, Mukherjee KJ. Genome engineering for improved recombinant protein expression in *Escherichia coli*. // *Microb Cell Fact*. 2014; 13: 177.
246. Care S, Bignon C, Pelissier M, Blanc E, Canard B, Coutard B. The translation of recombinant proteins in *E. coli* can be improved by in silico generating and screening random libraries of a–70/+ 96 mRNA region with respect to the translation initiation codon. // *Nucleic Acids Res*. 2008; 36:e6–e6
247. Berg L, Lale R, Bakke I, Burroughs N, Valla S. The expression of recombinant genes in *Escherichia coli* can be strongly stimulated at the transcript production level by mutating the DNA region corresponding to the 5'-untranslated part of mRNA. // *J Microbial Biotechnol*. 2009; 2: 379–389
248. Reeve B, Hargest T, Gilbert C, Ellis T. Predicting translation initiation rates for designing synthetic biology. // *Synthetic Biol*. 2014; 2: 1
249. Sahdev S, Khattar SK, Saini KS Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. // *Mol Cell Biochem* 2008; 307: 249–264
250. Esposito D, Chatterjee DK. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. // *Curr Opin Biotechnol*. 2006; 17(4):353-8
251. Sorensen HP, Mortensen KK Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. // *Microb Cell Fact*. 2005; 4: 1
252. Hu J, Qin H, Gao FP, Cross TA. A systematic assessment of mature MBP in membrane protein production: overexpression, membrane targeting and purification. // *Protein Expr Purif*. 2011; 80(1):34-40.
253. Qin H, Hu J, Hua Y, Challa SV, Cross TA, Gao FP. Construction of a series of vectors for high throughput cloning and expression screening of membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis*. // *BMC Biotechnol*. 2008; 8:51
254. Collins-Racie LA1, McColgan JM, Grant KL, DiBlasio-Smith EA, McCoy JM, LaVallie ER. Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA. // *Biotechnology (N Y)*. 1995; 13(9): 982-987.
255. Davis GD, Elisee C, Newham DM, Harrison RG. New fusion protein systems designed to give soluble expression in *Escherichia coli*. // *Biotechnol Bioeng*. 1999; 65(4): 382-388.
256. Feng S, Tian E, Zhang L, Wang Q, Deng H. Development of the Fc-III tagged protein expression system for protein purification and detection. // *PLoS One*. 2012; 7(8): e44208.

257. Samuelson JC. Recent developments in difficult protein expression: guide to *E. coli* strains, promoters, and relevant host mutations. // *Methods Mol Biol.* 2011;705: 195-209
258. Derman, A. I., Prinz, W. A. Belin, D., Beckwith, J. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. // *Science* 1993; 262: 1744–1747
259. Stewart, E. J., Aslund, F., Beckwith, J. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. // *EMBO J* 1998; 17: 5543–5550
260. Lobstein J, Emrich C A, Jeans C, Faulkner M, Riggs P, Berkmen M SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. // *Microb Cell Fact.* 2012; 11: 56
261. Schwarz E, Lilie H, Rudolph R. The effect of molecular chaperones on in vivo and in vitro folding processes. // *Biol Chem.* 1996; 377(7-8): 411-6.
262. Thomas JG, Ayling A, Baneyx F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. // *Appl Biochem Biotechnol.* 1997; 66(3): 197-238.
263. Carrio MM, Villaverde A Role of molecular chaperones in inclusion body formation. // *FEBS Lett* 2003; 537: 215–221
264. Guzzo J Biotechnical applications of small heat shock proteins from bacteria. // *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44: 1698–1705
265. Ow DSW, Lim DYX, Nissom PM, Camattari A, Wong VV Co-expression of Skp and FkpA chaperones improves cell viability and alters the global expression of stress response genes during scFvD1.3 production.// *Microb Cell Fact* 2010; 9: 22
266. Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura T. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64:1694-9.
267. Lund PA Microbial molecular chaperones. // *Adv Microb Physiol.* 2001; 44: 93-140.
268. de Marco A. Molecular and chemical chaperones for improving the yields of soluble recombinant proteins. // *Methods Mol Biol.* 2011; 705: 31-51.
269. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. // *Science.* 2002; 295(5561): 1852-8
270. Schein CH. Production of soluble recombinant proteins in bacteria.// *BioTechnology.* 1989; 7: 1141–1148
271. Vasina JA, Baneyx F. Expression of aggregation prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter systems. // *Protein Expr Purif.* 1997; 9: 211–218.

272. Chesshyre JA, Hipkiss AR. Low temperatures stabilize interferon α -2 against proteolysis in *Methylophilus methylotrophus* and *Escherichia coli*. // *Appl Microbiol Biotechnol*. 1989; 31: 158–162
273. Kiefhaber T, Rudolph R, Kohler HH, Buchner J. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. // *Biotechnology (N Y)* 1991; 9: 825–829
274. Mogk A, Mayer MP, Deuerling E. Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology. // *Chembiochem*. 2002; 3: 807–814
275. Ferrer M, Chernikova TN, Yakimov MM, Golyshin PN, Timmis KN. Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperature. // *Nat Biotechnol*. 2003; 21:1266–1267
276. Shaw MK, Ingraham JL. Synthesis of macromolecules by *Escherichia coli* near the minimal temperature for growth. // *J Bacteriology*. 1967; 94: 157–164
277. Weickert MJ, Doherty DH, Best EA, Olins PO. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. // *Curr Opin Biotechnol*. 1996; 7: 494–499
278. Mujacic M, Cooper KW, Baneyx F. Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in *Escherichia coli*: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. // *Gene*. 1999; 238: 325–332
279. Luis BG, Pastor-Palacios G., Rodriguez-Rocha R., Azuara-Liceaga E. Cloning and initial characterization of a family A DNA polymerase from *Entamoeba histolytica*: A putative mitochondrial DNA Polymerase. *FASEB J* 21. 2007:A1039
280. Ferrer M, Chernikova TN, Timmis KN, Golyshin PN. Expression of a temperature sensitive esterase in a novel chaperone based *Escherichia coli* strain. // *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70: 4499–4504
281. Ferrer M, Chernikova TN, Yakimov MM, Golyshin PN, Timmis KN. Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperature. // *Nat Biotechnol*. 2003; 21: 1266–1267.
282. Sambrook J, Russell D.W., *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 3rd Edition ed. CSHL Press, Cold Spring Harbor (2001).
283. Maniatis T. et. al. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. V.2. 1989
284. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature*. 1970; 227(5259): 680–685.
285. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem*. 1951; 193(1): 265–275.
286. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. // *Analytical biochemistry*. 1976; 72(1-2): 248-254.

287. Skoblov MIu, Shibanova ED, Kovaleva EV, Baramashvili DI, Skoblov IuS, Miroshnikov AI DNA assay for genetically engineered pharmaceutical substances using the real-time PCR technique. // *Bioorg Khim.* 2010; 36(1):112-6.
288. Ghosh I., Sun L., Xu M. Q. Zinc Inhibition of Protein Trans-splicing and Identification of Regions Essential for Splicing and Association of a Split Intein. // *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 24051-24058
289. Lederis K. Vasopressin and oxytocin in the mammalian hypothalamus.// *Gen. Compar.Endokrinol* 1961; 1: 80-86.
290. Du Vigneaud V., Ressler Ch., Swan J.M., Roberts C.W., Katsoyannis P.G. / The synthesis of oxytocin. // *J.Amer.Chem.Soc.* 1954; 76: 3115-3121.
291. Esipov R.S., Stepanenko V.N., Chupova L.A., Miroshnikov A.I. Production of Recombinant Oxytocin through Sulfitolysis of Intein-containing Fusion Protein. // *Protein & peptide letters.* 2012; 19(5): 479-484.
292. Esipov RS, Chupova LA, Shvets SV, Chuvikovskiy DV, Gurevich AI, Muravyova TI, Miroshnikov AI. Production and purification of recombinant human oxytocin overexpressed as a hybrid protein in *Escherichia coli*. // *Protein Pept Lett.*, 2003; 10(4): 404-11.
293. Boonstra J, Rijken P, Humbel B, Cremers F, Verkleij A, van Bergen en Henegouwen P. The epidermal growth factor.// *Cell Biol. Int.* 1995; 19 (5): 413–30
294. Savage CR Jr., Inagami T., Cohen S. The primary structure of epidermal growth factor.// *J Biol Chem.* 1972 10; 247(23):7612-21
295. Allen G, Paynter CA, Winther MD Production of epidermal growth factor in *Escherichia coli* from a synthetic gene.// *J Cell Sci Suppl.* 1985; 3:29-38
296. Ptitsyn LR, Al'tman IB. Extracellular production of recombinant human epidermal growth factor (hEGF) in *Escherichia coli* cells]. *Bioorg Khim.* 1999; 25(12): 923-9.
297. Tong W.Y., Yao S.J., Zhu Z.Q. and Yu J. An improved procedure for production of human epidermal growth factor from recombinant *E. coli*.// *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001; 57: 674-679.
298. Tanaka R., Kosugi K., Mizukami M., Ishibashi M., Tokunaga H. and Tokunaga M. Expression and purification of thioredoxin (TrxA) and thioredoxin reductase (TrxB) from *Brevibacillus choshinensis*.// *Protein Expr. Purif.* 2004; 37: 385-391
299. Heo J.H., Won H.S., Kang H.A., Rhee S.K. and Chung B.H Purification of recombinant human epidermal growth factor secreted from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*.// *Protein Expr. Purif.* 2002; 24: 117-122.

300. Esipov RS, Stepanenko VN, Chupova LA, Boyarskikh UA, Filipenko ML, Miroshnikov AI. Production of recombinant human epidermal growth factor using Ssp dnaB mini-intein system. *Protein Expr Purif.* 2008; 61(1): 1-6.
301. Есипов Р.С., Степаненко В.Н., Чупова Л.А., Гуревич А.И., Мирошников А.И. Способ получения генно-инженерного эпидермального фактора роста человека, рекомбинантная плазмидная ДНК pER-hEGF, кодирующая гибридный белок, способный к автокаталитическому расщеплению с образованием эпидермального фактора человека, и штамм *Escherichia coli* ER2566/ pER-hEGF продуцент указанного белка. Патент РФ № 2323976 от 10.05.2008.
302. Van den Berg S, Löfdahl PA, Härd T, Berglund H. Improved solubility of TEV protease by directed evolution. // *J Biotechnol.* 2006; 121(3):291-8
303. Hamano Y., Kalluri R. Tumstatin, the NC1 domain of alpha3 chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 333(2):292–298.
304. Maeshima Y., Colorado P.C., Kalluri R. Two RGD-independent alpha v beta3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct antitumor properties // *J. Biol. Chem.* 2000; 275(31):23745–23750.
305. Maeshima Y., Yerramalla U.L., Dhanabal M., Holthaus K.A., Barbashov S., Kharbanda. S., Reimer C., Manfredi M., Dickerson W.M., Kalluri R. Extracellular matrix-derived peptide binds to avh3 integrin and inhibits angiogenesis // *J. Biol. Chem.* 2001; 276(34): 31959–31968
306. Walker J.R., Altman R.K., Warren J.W, Altman E. Using protein-based motifs to stabilize peptides // *J. Peptide. Res.* 2003; 62:214–226.
307. Eikesdal H.P., Sugimoto H., Birrane G., Maeshima Y., Cooke V.G., Kieran M., Kalluri R. Identification of amino acids essential for the antiangiogenic activity of tumstatin and its use in combination antitumor activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105(39): 15040–15045.
308. Esipov R.S., Beyrakhova K.A., Likhvantseva V., Stepanova E.S., Stepanenko V.N., Kostromina M.D., Abramchik Y.A., Miroshnikov A.I. Antiangiogenic and antivascular effects of a recombinant tumstatin-derived peptide in a corneal neovascularization model. // *Biochimie* 2012; 94: 1368-1375.
309. Есипов Р.С., Костромина М.А., Бейрахова К.А., Макаров Д.А., Мирошников А.И. Штамм *E. coli* BL21(DE3)/pTEV-TMS - продуцент гибридного белка TrxTEVrs-TMS, предназначенного для протеолитического расщепления с образованием антиангиогенного пептида тумстатина, производного фрагмента [L69K-95] тумстатина человека, и способ получения рекомбинантного антиангиогенного пептида. Патент РФ № 2625008 от 06.11.2015.

310. Goldstein A. L., Slater F. D., White A. Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1966; 56(3): 1010-1017.
311. J.A. Hooper, M.C. McDaniel, G.B. Thurman, G.H. Cohen, R.S. Schulof, A.L. Goldstein Purification and properties of bovine thymosin // *Ann. N. Y. Acad Sci*. 1975; 249: 125-44.
312. Piñeiro A., Cordero O. J., Nogueira M. Fifteen years of prothymosin alpha: contradictory past and new horizons // *Peptides*. 2000; 21: 1433–1446.
313. Segade F., Gómez-Márquez J. Molecules in focus: Prothymosin α // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1999; (31): 1243-1248.
314. Sarandeses C. S., Covelo G., Díaz-Jullien C., Freire M. Prothymosin α is processed to thymosin α_1 and thymosin α_{11} by a lysosomal asparaginyl endopeptidase // *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 13286–13293.
315. Wong T. W., Merrifield R. B. Solid-Phase Synthesis of Thymosin α_1 Using tert-Butyloxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)phenylacetamidomethyl-resin.// *Biochemistry*. 1980; 19: 3233-3238.
316. Esipov RS, Stepanenko VN, Beyrakhova KA, Muravjeva TI, Miroshnikov AI. Production of thymosin α_1 via non-enzymatic acetylation of the recombinant precursor. *Biotechnol Appl Biochem*. 2010; 56(1): 17-25.
317. T. L. K. Low, Su-Sun Wang, A. L. Goldstein. Solid-Phase Synthesis of Thymosin beta 4: Chemical and Biological Characterization of the Synthetic Peptide. // *Biochemistry*. 1983; 22(4): 733-740.
318. J.H. Ho, C.H. Chuang, C.Y. Ho, Y.R. Shih, O.K. Lee, Y. Su Internalization is essential for the antiapoptotic effects of exogenous thymosin β -4 on human corneal epithelial cells. // *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007; 48(1): 27-33.
319. X. Li, L. Zheng, F. Peng, C. Qi, X. Zhang, A. Zhou, Z. Liu, S. Wu Recombinant thymosin β 4 can promote full-thickness cutaneous wound healing // *Protein Expr. Purif*. 2007; 56(2): 229–36.
320. Li Teng, Ma Su-Yong, Tang Xiao-Chuang, Nie Li-Ya, Huang He. Production and characterization of highly purified recombinant thymosin beta 4 in *Escherichia coli* // *Protein Expr. Purif*. 2013; 90(2): 90-95.
321. Бейрахова К.А., Степаненко В.Н., Мирошников А.И., Есипов Р.С. Биотехнологический способ получения ацетилированного тимозина бета 4. // *Биоорган. химия*. 2011; 37(2): 223-232.
322. Evans D. A. P. N-acetyltransferase. // *Pharmacology & therapeutics*. 1989; 42(2): 157-234.

323. S. Ok-kyu, W. Xiaorong, H. W. Jakob and S. Rolf. An N^{α} -acetyltransferase responsible for acetylation of the N-terminal residues of histones H4 and H2A // The J. Biol. Chem. 2003; 278(40): 38109-38112.
324. D.T. Mackay, C.H. Botting, G.L. Taylor, M.F. White. An acetylase with relaxed specificity catalyses protein N-terminal acetylation in *Sulfolobus solfataricus*. // Molecular microbiology. 2007; 64(6): 1540-1548.
325. M.S. Howard, A.M. Ethan, A.V. Christopher. Automated design of synthetic ribosome binding site to control protein expression. // Nature biotechnology. 2009; 27(10): 946-950.
326. Lee H. C. Construction a RBS library with different translational activity. // BBF RFC. – 2010; 79: 1-8.
327. Esipov R.S., Makarov D.A., Stepanenko V.N, Miroschnikov A.I. Development of the Intein-mediated method for production of recombinant Thymosin β 4 from the acetylated in vivo fusion protein Journal of Biotechnology. 2016; 228: 73-81
328. Есипов Р.С., Степаненко В.Н., Макаров Д.А., Мирошников А.И. Рекombинантная плазмидная ДНК pER-TA1GyrA-AcSer, кодирующая сериновую ацетилтрансферазу, способную *in vivo* ацетилировать N-концевой серин дезацетилтимозина альфа-1 и гибридный белок, способный к автокаталитическому расщеплению с образованием тимозина альфа-1 человека, штамм-продуцент *Escherichia coli* C3030/pER-TA1GyrA-AcSer продуцент указанных белков и способ получения генно-инженерного тимозина альфа-1 человека. Патент РФ № 2593172 от 05.05.2015
329. Есипов Р.С., Макаров Д.А., Степаненко В.Н., Мирошников А.И. Рекombинантная плазмидная ДНК pER-TB4GyrA-AcSer, кодирующая сериновую ацетилтрансферазу, способную *in vivo* ацетилировать N-концевой серин дезацетилтимозина бета 4 и гибридный белок, способный к автокаталитическому расщеплению с образованием тимозина бета 4 человека, штамм-продуцент *Escherichia coli* C3030/pER-TB4GyrA-AcSer продуцент указанных белков и способ получения генно-инженерного тимозина бета 4 человека. Патент РФ № 2592860 от 05.05.2015.
330. Porshinsky B.S., Saha S., Grossman M.D., Beery P.R., Stawicki S.P. Clinical uses of the medicinal leech: a practical review. J Postgrad Med. 2011; 57(1):65-71
331. Scharf M., Engels J., Tripiier D. Primary structures of new 'iso-hirudins'. FEBS Lett. 1989; 255(1): 105-10.
332. Markwardt F. Hirudin as alternative anticoagulant--a historical review. Semin Thromb Hemost. 2002; 28(5): 405-14.

333. Clore G.M., Sukumaran D.K., Nilges M, Zarbock J., Gronenborn A.M.. The conformations of hirudin in solution: a study using nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics. *EMBO J.*1987; 6(2): 529-37.
334. Mengwasser K.E., Bush L.A., Shih P., Cantwell A.M., Di Cera E. Hirudin binding reveals key determinants of thrombin allostery.// *J Biol Chem.* 2005; 280(29): 26997-7003.
335. Witting J.I., Brezniak D.V., Hayes J.R., Fenton J.W.2nd. Human alpha- and zeta-thrombin inhibition by recombinant HV1 and HV2K47 hirudins.//*Thromb Res.* 1991; 63(4): 473-9.
336. Stone S.R., Hofsteenge J. Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin.// *Biochemistry.* 1986; 25(16): 4622-8.
337. Rydel T.J., Ravichandran K.G., Tulinsky A., Bode W., Huber R., Roitsch C., Fenton J.W. 2nd. The structure of a complex of recombinant hirudin and human alpha-thrombin.// *Science.* 1990; 249(4966): 277-80.
338. Rydel T.J., Tulinsky A., Bode W., Huber R. Refined structure of the hirudin-thrombin complex.// *J Mol Biol.* 1991; 221(2): 583-601.
339. Stone S.R., Braun P.J., Hofsteenge J. Identification of regions of alpha-thrombin involved in its interaction with hirudin.// *Biochemistry.* 1987; 26(15): 4617-24.
340. Knapp A, Degenhardt T, Dodt J. Hirudisins. Hirudin-derived thrombin inhibitors with disintegrin activity.// *J Biol Chem.* 1992; 267(34): 24230-4.
341. Mo W, Zhang YL, Chen HS, Wang LS, Song HY. A novel hirudin derivative characterized with anti-platelet aggregations and thrombin inhibition.// *J Thromb Thrombolysis.* 2009; 28(2): 230-7.
342. Szemraj J, Stankiewicz A, Rozmyslowicz-Szermińska W, Mogielnicki A, Gromotowicz A, Buczko W, Oszejca K, Bartkowiak J, Chabielska E. A new recombinant thrombolytic and antithrombotic agent with higher fibrin affinity - a staphylokinase variant. An in-vivo study.// *Thromb Haemost.* 2007; 97(6): 1037-45.
343. Zaneveld J, Hamady M, Sueoka N, Knight R. CodonExplorer: an interactive online database for the analysis of codon usage and sequence composition.// *Methods Mol. Biol.* 2009; 537: 207-32.
344. Mathys S, Evans TC, Chute IC, Wu H, Chong S, Benner J, Liu XQ, Xu MQ. Characterization of a self-splicing mini-intein and its conversion into autocatalytic N- and C-terminal cleavage elements: facile production of protein building blocks for protein ligation.// *Gene.* 1999; 231(1-2): 1-13.
345. Костромина М.А, Есипов Р.С., Мирошников А.И. Биотехнологический способ получения рекомбинантных аналогов гирудина-1 из *Hirudo medicinalis*. // *Биоорг.химия.* 2012; 38(2): 1-11.

346. Есипов Р.С., Степаненко В.Н., Костромина М.А., Мирошников А.И., Воробьев А.И., Юрьев А.С. Рекомбинантная плазмидная ДНК pER-Hir, кодирующая гибридный белок, способный к автокаталитическому расщеплению с образованием [Leu1, Thr2]-63-десульфатогирудина, штамм *Escherichia coli* ER2566/pER-Hir - продуцент указанного белка и способ получения генно-инженерного [Leu1, Thr2]-63-десульфатогирудина. Патент РФ № 2435858 от 10.12.11.
347. Tjin Tham Sjin R.M., Satchi-Fainaro R., Birsner A.E., Ramanujam V.M., Folkman J., Javaherian K. A 27-amino-acid synthetic peptide corresponding to the NH2-terminal zinc-binding domain of endostatin is responsible for its antitumor activity // *Cancer Res.* 2005; 65(9): 3656–3663.
348. Cattaneo M.G., Pola S., Francescato P., Chillemi F., Vicentini L.M., Human endostatin-derived synthetic peptides possess potent antiangiogenic properties in vitro and in vivo // *Exp. Cell Res.* 2003; 283(2): 230–236.
349. Tombran-Tink J., Chader G.G., Johnson L.V. PEDF: a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity // *Exp. Eye Res.* 1991; 53(3): 411–414.
350. Filleur S., Nelius T., de Riese W., Kennedy R.C. Characterization of PEDF: a multi-functional serpin family protein // *J. Cell. Biochem.* 2009; 106(5): 769–775.
351. Dawson D.W., Volpert O.V., Gillis P., Crawford S.E., Xu H., Benedict W., Bouck N.P. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis // *Science.* 1999; 285(5425): 245–248.
352. Zhang S.X., Wang J.J., Gao G., Parke K., Ma J.X. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy // *J. Mol. Endocrinol.* 2006; 37(1): 1–12.
353. Filleur S., Volz K., Nelius T., Mirochnik Y., Huang H., Zaichuk T.A., Aymerich M.S., Becerra S.P., Yap R., Veliceasa D., Shroff E.H., Volpert O.V. Two functional epitopes of pigment epithelial-derived factor block angiogenesis and induce differentiation in prostate cancer // *Cancer Res.* 2005; 65(12): 5144–5152.
354. Amaral J., Becerra S. P. Effects of Human Recombinant PEDF Protein and PEDF-Derived Peptide 34-mer on Choroidal Neovascularization // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51(3): 1318–1326.
355. Alberdi E., Aymerich M.S., Becerra S.P. Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons: evidence for a PEDF receptor // *J. Biol. Chem.* 1999; 274(44): 31605–31612.

356. Amaral J., Vecerra S. P. Effects of Human Recombinant PEDF Protein and PEDF-Derived Peptide 34-mer on Choroidal Neovascularization // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51(3): 1318–1326.
357. Есипов Р.С., Бейрахова К.А., Чупова Л.А., Лихванцева В. Г., Степанова Е. В. , Мирошников А. И. Рекомбинантный фрагмент 44-77 фактора дифференцировки пигментного эпителия препятствует развитию патологической неоваскуляризации роговицы. // *Биоорган. Химия.* 2012; 38(1): 1-8.
358. Есипов Р.С., Костромина М.А., Бейрахова К.А., Макаров Д.А., Мирошников А.И. Рекомбинантная плазмидная ДНК рERIG-PGS, кодирующая гибридный белок, способный к автокаталитическому расщеплению с образованием антиангиогенного пептида пигастина - производного фрагмента [44-77] фактора роста пигментного эпителия человека, штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pERIG-PGS - продуцент указанного белка, и способ получения рекомбинантного антиангиогенного пептида. Патент РФ № 2664199 от 06.07.2017.
359. Dakun C., Gunn I., Small C.J., Edwards C.M., Hay D.L., Smith D.M., Ghattei M.A., Bloom S.R. Oxyntomodulin inhibits food intake in the rat. // *Endocrinology*, 2001; 42: 4244-4250.
360. Cohen M.A., Ellis S.M., Le Roux C.W., Batterham R.L., Park A., Patterson M., Frost G.S., Ghattei M.A., Bloom S.R. Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans. // *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 2003; 88: 4696-4701.
361. Holst J.J. Enteroglucagon // *Annu.Rev.Physiol.*, 1997; 59: 257-271.
362. Степаненко В.Н., Есипов Р.С., Гуревич А.И., Чупова Л.А., Мирошников А.И. Рекомбинантный оксинтомодулин. *Биоорган. химия* (2007), т. 33, № 2, 245-250.
363. Есипов Р.С., Степаненко В.Н., Бейрахова К.А., Мирошников А.И., Автушенко С.С., Сурков К.Г., Романов В.Д., Генкин Д.Д. Оксинтомодулин человека, его применение. Лекарственный препарат на его основе и способ применения препарата для лечения и профилактики гипергликемии. Патент РФ на изобретение № 2524204 от 27.07.2014
364. Fernandes A.I., Gregoriadis G. Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics. // *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1341(1): 26–34.
365. Fernandes I., Gregoriadis G. The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase: implication in its pharmacokinetics // *Int J Pharm.* 2001; 217(1): 215–22.
366. Макаров Д.А., Есипов Р.С. Разработка способов получения аналогов тимозина бета4, устойчивых к деградации в токе крови. // *Биотехнология.* 2016; 2: 57-71.
367. Есипов Р.С., Макаров Д.А., Степаненко В.Н., Мирошников А.И. Способ получения моноконъюгата полисиаловой кислоты с тимозином бета 4 и ковалентный моноконъюгат

- полисиаловой кислоты с тимозином бета 4, устойчивый к деградации в токе крови. Патент РФ № 2605385 от 20.12.2016.
368. Unger R. H., Orci L. Glucagon and the A cell: physiology and pathophysiology // *N. Engl. J. Med.* 1981; 304: 1518-1524.
369. Ishizaki J., Tamaki M., Shin M., Tsuzuki H., Yoshikawa K., Teraoka H., and Yoshida N. Production of recombinant human glucagon in the form of a fusion protein in *Escherichia coli*; recovery of glucagon by sequence-specific digestion // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992; 36: 483-486
370. Tikhonov RV, Pechenov SE, Belacheu IA, Yakimov SA, Klyushnichenko VE, Boldireva EF, Korobko VG, Tunes H, Thiemann JE, Vilela L, Wulfson AN. Recombinant human insulin. VIII. Isolation of fusion protein--S-sulfonate, biotechnological precursor of human insulin, from the biomass of transformed *Escherichia coli* cells. // *Protein Expr Purif.*, 2001, 21(1): 176-82.
371. Shin, C. S., Hong M. S., Kim D. Y., Shin H. C., and Lee J. Growth-associated synthesis of recombinant human glucagon and human growth hormone in high-cell-density cultures of *Escherichia coli* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998; 49: 364-370.
372. Okamoto H, Iwamoto H, Tsuzuki H, Teraoka H, Yoshida N. An improved method for large-scale purification of recombinant human glucagon.// *J Protein Chem.* 1995; 14(7): 521-6
373. Wen C., Gan R., Zhu S. Construction of secretory expression system suitable to express glucagon under the control of PL promoter // *Curr. Microbiol.* 2003; 47: 180-185.
374. Есипов Р.С., Степаненко В.Н., Чупова Л.А., Гуревич А.И., Мирошников А.И. Способ получения генно-инженерного глюкагона человека, рекомбинантная плазмидная ДНК рER-GI, кодирующая гибридный белок, способный к автокаталитическому расщеплению с образованием глюкагона человека, и штамм *Escherichia coli* ER2566/pER-GI. Патент РФ № 2302465 от 07.09.2005.
375. Pietrokovski S. Modular organization of inteins and C-terminal autocatalytic domains. // *Protein Sci.*, 1998; 7: 64–71.
376. Esipov RS, Stepanenko VN, Gurevich AI, Chupova LA, Miroshnikov AI. Production and purification of recombinant glucagon overexpressed as Intein fusion protein in *Escherichia coli*. // *Protein&Peptide letters.* 2006; 13(4): 343-347.
377. Grishin E.V., Savchenko G.A., Vassilevski A.A., Korolkova Y.V., Boychuk Y.A., Viatchenko-Karpinski V.Y., Nadezhdin K.D., Arseniev A.S., Pluzhnikov K.A., Kulyk V.B., Voitenko N.V., Krishtal O.O. Novel peptide from spider venom inhibits P2X3 receptors and inflammatory pain.// *Ann. Neurol.* 2010; 67(5): 680-683.

378. Kabanova N. V., Vassilevski A. A., Rogachevskaja O. A., Bystrova M. F., Korolkova Y. V., Pluzhnikov K. A., Romanov R. A., Grishin E. V., Kolesnikov S. S. Modulation of P2X3 receptors by spider toxins. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012; 1818: 2868-2875.
379. Василевский А.А., Савченко Г.А., Королькова Ю.В., Бойчук Я.А., Плужников К.А., Крышталь О.А., Гришин Е.В. Пептидный модулятор пуринаргических рецепторов. Патент РФ № 2422459 от 01.06.2010.
380. Есипов Р.С., Степаненко В.Н., Зверева И.О., Макаров Д.А., Костромина М.А., Костромина Т.И., Муравьева Т.И., Мирошников А.И. и Гришин Е.В. Биотехнологический способ получения рекомбинантного пептидного анальгетика – пуротоксина-1 из яда паука *Geolycosa* sp. *Биорг. химия* (2018), т.44, №1, 38-46.
381. Есипов Р.С., Степаненко В.Н., Василевский А.А., Королькова Ю.В., Гришин Е.В. Способ получения рекомбинантного анальгетического пептида. Патент РФ № 2571942 от 27.11.2015.
382. Kozlov SA, Andreev IaA, Murashev AN, Skobtsov DI, D'iachenko IA, Grishin EV. New polypeptide components from the *Heteractis crispa* sea anemone with analgesic activity. // *Bioorg Khim.* 2009; 35(6):789-98.
383. Ya. A. Andreev, S. A. Kozlov, Yu. V. Korolkova, I. A. Dyachenko, D. A. Bondarenko, D. I. Skobtsov, A. N. Murashev, P. D. Kotova, O. A. Rogachevskaja, N. V. Kabanova, S. S. Kolesnikov, Eu. V. Grishin. Polypeptide modulators of TRPV1 produce analgesia without hyperthermia.// *Mar Drugs.* 2013; 11(12): 5100–5115.
384. Esipov R.S., Makarov D.A., Stepanenko V.N., Kostromina M.A, Muravyova T.I, Andreev Y.A, Dyachenko I.A., Kozlov S.A. and Grishin E.V. Pilot Production of the Recombinant Peptide Toxin of *Heteractis Crispa* as a Potential Analgesic by Intein-Mediated Technology. // *Protein Expr. Purif.* 2018; 145: 71-76.
385. Есипов Р.С., Макаров Д. А., Степаненко В. Н., Андреев Я. А., Козлов С. А., Гришин Е. В. Рекомбинантная плазмидная ДНК рER-АРНСЗ, кодирующая гибридный белок, способный к автокаталитическому расщеплению с образованием АРНСЗ, штамм *Escherichia coli* C3030/рER-АРНСЗ продуцент указанных белков и способ получения рекомбинантного АРНСЗ. Патент РФ № 2619170 от 18.09.2015.