



На правах рукописи

ГАВРИКОВ АЛЕКСЕЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

**Оптимизация биотехнологического производства
субстанций рекомбинантных интерферонов человека для
создания на их основе препаратов ветеринарного
назначения**

03.00.23. – биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Москва
2006 год

Работа выполнена в производственной лаборатории Закрытого Акционерного Общества «Мосагротен» (ЗАО «Мосагротен»).

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

С.В. Машко

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

А.С. Миронов

кандидат технических наук, доцент

А.Е. Кузнецов

Ведущая организация:

Факультет Биоинженерии и Биоинформатики
МГУ им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «19» декабря 2006 года в 14 часов на заседании Диссертационного совета ДМ212.204.13 при Российском химико-технологическом Университете имени Д.И. Менделеева по адресу: 125047 Москва, Миусская пл. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре Российского химико-технологического Университета имени Д.И. Менделеева.

Автореферат разослан «17» ноября 2006 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета ДМ212.204.13

кандидат технических наук

И.В. Шакир

И.В. Шакир

Актуальность проблемы

С развитием методов молекулярной биологии, биохимии и биотехнологии повышаются требования качества к практически важным продуктам, получаемым в данных областях. Одним из примеров подобных тенденций является повышение чистоты фармакологических субстанций, полученных с использованием технологий «рекомбинантных ДНК». Это, в частности, относится к белку, лекарственные препараты которого существуют уже более 20-и лет, – белковому рекомбинантному интерферону α -2b.

Наиболее выгодным экономически является использование штаммов-продуцентов, в которых уровень биосинтеза целевого белка составляет десятки процентов от суммарных клеточных полипептидов (в этих случаях, как правило, гетерологичный белок накапливается в бактериальной клетке в виде нерастворимых конгломератов – тельца включения).

Создание подобных бактериальных штаммов-продуцентов возможно только при соблюдении ряда условий, один из которых – стабильность мРНК при экспрессии целевого гена. Основным фактором стабильности мРНК и эффективности ее трансляции, является кодоновая композиция гетерологичного рекомбинантного гена. При наличии редко встречающихся аминокислотных кодонов, в гене, клонированном в составе мультикопийного экспрессионного вектора, подобная генетическая конструкция будет нежизнеспособна, или же, уровень синтеза целевого белка будет крайне низким. Другим фактором неэффективной экспрессии гетерологичного гена может являться интерференция процесса транскрипции гена (особенно, с сильного бактериального или фагового промотора) с процессом репликации рекомбинантной плазмида, что возможно даже при наличии теминатора транскрипции в 3'-концевой нетранслируемой области целевого гена.

Повышение требований к чистоте препаратов на основе рекомбинантных белков, выделяемых из бактериальных штаммов-продуцентов, потребовало развитие новых биохимических методов анализа белков. Появились такие анализы на чистоту, как анализ ВЭЖХ, тесты на остаточную ДНК и на остаточные белки штамма-хозяина и вектора. Тест на пирогенную постепенно вытесняется тестом на бактериальные эндотоксины (ЛАЛ-тест). Усложнение аналитического контроля привело к принципиальным изменениям технологий производства субстанции рекомбинантных белков, т.к. применение старых технологических путей являлось не удовлетворительным по качеству конечного продукта, или же, экономически невыгодным.

При суперсинтезе гетерологичных белков в клетках *E. coli* (в таких количествах, что целевой белок начинает образовывать тельца включения), бактериальные клетки находятся в состоянии стресса. Во многих случаях бактериальная культура практически не растет после индукции синтеза целевого белка. Кроме того, в условиях стресса, накапливающиеся в тельцах включения белки могут иметь нежелательные модификации, начиная с неоцепленного N-концевого метионина, и заканчивая ацетилированием или окислением некоторых аминокислотных остатков белка. Подобные модифицированные варианты

могут не отделяться от целевого белка при его очистке с помощью различных видов гидрофобной и ионообменной жидкостной хроматографий (не говоря уже про аффинную и гель-фильтрационную), так как при модификации изменение конформации белка не происходит, а изменение массы и заряда ничтожно мало по сравнению немодифицированной молекулой. Но при правильном подборе условий модифицированный белок можно детектировать ОФ-ВЭЖХ, а, следовательно, при большом количестве таких молекул в препарате, он не удовлетворяет критериям необходимой чистоты.

Было замечено, что количество и характер подобных примесей в препаратах рекомбинантных белков зависит от условий ферментации штамма-продуцента, а не только от использованной технологии выделения и очистки целевого продукта.

Таким образом, процесс получения высокоочищенной субстанции рекомбинантного белка для ее дальнейшего практического использования при создании медицинских или ветеринарных препаратов представляет собой комплексную задачу, изменения одного из этапов которой, значительно влияет на остальные этапы.

Цели и задачи работы.

Целями работы являлись:

- 1) увеличение эффективности биосинтеза рекомбинантного интерферона бактериальными продуцентами (на примере лейкоцитарного интерферона α -F человека);
- 2) исследование влияния условий ферментации рекомбинантных штаммов *E. coli* на образование модифицированных примесей целевого белка (на примере штамма-продуцента интерферона α -2b человека);
- 3) исследование возможности создания технологии выделения и очистки интерферона α -2b биомассы штамма-продуцента с оптимальным соотношением «цена-качество».

В ходе работы были решены следующие задачи:

- Созданы и клонированы варианты гена человеческого α -F интерферона с различными заменами редко встречающихся эукариотических кодонов.
- Создан штамм-суперпродуцент человеческого рекомбинантного интерферона α -2b.
- Разработаны несколько вариантов регламента ферментации штамма-продуцента человеческого рекомбинантного интерферона α -2b.
- Созданы несколько вариантов технологии выделения и очистки человеческого рекомбинантного интерферона α -2b.

Научная новизна и практическая ценность работы.

В ходе работы было подробно рассмотрено влияние редко встречающихся в *E. coli* аминокислотных кодонов на экспрессию гетерологичного гена, расположенного на мультикопийном экспрессионном векторе, под контролем регуляторных элементов транскрипции бактериофага T7.

Разработан протокол ферментации штамма-продуцента интерферона α -2b, в котором индукция синтеза интерферона осуществляется лактозой, вместо добавления ИПТГ. Подобный подход значительно снижает себестоимость процесса ферментации. А также позволяет получать большие количества целевого продукта.

Показано, что за счет оптимизации процесса ферментации можно получать полуфабрикат более высокого качества, что позволяет упростить дальнейший процесс очистки интерферона, уменьшив количество хроматографических стадий, т.е. понизить себестоимость продукта.

Разработанные технологии позволили увеличить рентабельность производства субстанции интерферона α -2b на базе предприятия ЗАО «Мосагроген», Москва. Получаемая субстанция интерферона α -2b используется для приготовления ветеринарных лекарственных препаратов «Миксоферон®» и «Кинорон®».

Апробация работы

Материалы диссертации докладывались на: Международной конференции «Молекулярные механизмы генетических процессов» (Москва-Минск, ноябрь 2001 г.); конференции, посвященной 60-тилетию МИФИ, (Москва, январь 2002); научно-производственных семинарах ЗАО «Мосагроген» (Москва, 2004-2006); семинаре отдела молекулярной биологии и биотехнологии ФГУП ГосНИИгенетика (Москва, октябрь 2006).

Публикации

По теме диссертации опубликовано четыре статьи в отечественных журналах и одно тезисное сообщение в материалах научных конференций.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов и обсуждения, Выводов и Списка литературы. Работа изложена на 102 страницах, включая 12 рисунков и 18 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 128 источников, в том числе 12 на русском языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

1. Исследования влияния различных факторов на уровень экспрессии гена интерферона α -F человека в системе транскрипции бактериофага T7.

1.1. Создание вариантов гена интерферона α -F человека с различными заменами редко встречающихся в *E.coli* аминокислотных кодонов.

Человеческий интерферон α -F является одним из лейкоцитарных интерферонов. В своем природном варианте ген интерферона α -F содержит редко встречающиеся для *E. coli* аминокислотные кодоны – Arg – 6 кодонов AGA и 4

Рис. 1. Природный ген человеческого лейкоцитарного интерферона α -F. Жирным шрифтом в рамках отмечены редко встречающиеся в *E. coli* кодоны.

1	11	21	31	41	51	61															
M	C	D	L	P	Q	T	H	S	L	G	N	R	R	A	L	I	L	L	A		20
atgtgtatctgcctcagaccacagccggtaat <u>aggagg</u> gcctt <u>ata</u> cctcggca																					
61	71	81	91	101	111	121															
Q	M	G	R	I	S	P	F	S	C	L	K	D	R	H	D	F	G	F	P		40
caaatgg <u>aaaga</u> atctctccccc <u>ttctcctggtaaggag</u> ac <u>aga</u> catgactt <u>tgattccccc</u>																					
121	131	141	151	161	171	181															
Q	E	E	F	D	G	N	Q	F	Q	K	A	Q	A	I	S	V	L	H	E		60
caggaggagttt <u>atggcaaccaggat</u> ttcc <u>aggctcaagccat</u> tctgtcc <u>ccatgag</u>																					
181	191	201	211	221	231	241															
M	I	Q	Q	T	F	N	L	F	S	T	K	D	S	S	A	T	W	E	Q		80
atgatcc <u>cagcagacc</u> tt <u>caatcttc</u> tc <u>agcacaaaaggact</u> cat <u>ctgtacttggaa</u> acag																					
241	251	261	271	281	291	301															
S	L	L	E	K	F	S	T	E	L	N	Q	Q	L	N	D	L	E	A	C		100
agcc <u>tc</u> <u>taaaaaatttccactgaacttaaccaggcagactgaatgac</u> ctggaa <u>gacctgc</u>																					
301	311	321	331	341	351	361															
V	I	Q	E	V	G	V	E	E	T	P	L	M	N	V	D	S	I	L	A		120
gt <u>gtatcaggagg</u> tt <u>gggtgtggaa</u> ag <u>actcc</u> ctgtat <u>gaatgtggactccat</u> ctgg <u>ct</u>																					
361	371	381	391	401	411	421															
V	K	K	Y	F	Q	R	I	T	L	Y	L	T	E	K	K	Y	S	P	C		140
gt <u>gaagaaaatactccaa</u> <u>agat</u> act <u>cittatctgacagaga</u> aaa <u>atacagcc</u> ttgt																					
421	431	441	451	461	471	481															
A	W	E	V	V	R	A	E	I	M	R	S	F	S	L	S	K	I	F	Q		160
gc <u>ctggggagggtgtc</u> <u>agagc</u> aaaa <u>atcatg</u> g <u>atc</u> ct <u>ttctcttttatcaaaaattttcaa</u>																					
481	491	501																		169	
E	R	L	R	R	K	E	&														
ga <u>aaatggaggaggaa</u> agg <u>aaataa</u>																					

кодона AGG, а также относительно редко встречающиеся Pro (2 – CCC), Ile (2 – AUA), Leu (1 – CUA) и Gly (2 – GGA) кодоны (См. рис 1). Одним из факторов стабильности мРНК и эффективности ее трансляции, является кодоновая композиция гетерологичного гена.

Существует большое количество данных, когда замена редко встречающихся в *E. coli* Arg-кодонов AGA/AGG на синонимичные прокариотические в гене, кодирующем гетерологичный белок, приводила к многократному увеличению его продукции (до 20 – 50% от суммарного клеточного белка). В *E. coli* эти кодоны встречаются со следующими частотами – AGA – 2,8 на тысячу кодонов, AGG – 1,7 на тысячу, при максимальной встречаемости Arg-кодонов – CGU, CGC – 20,6. В то время, как, например, у человека – 11,5 и 11,3 соответственно (максимальное – CGG – 11,6). В природном гене IFN- α F находится 10 таких кодонов (2% от всех кодонов в гене). Наличие tandemов AGA или AGG кодонов, с большой вероятностью приводит к «сдвигу рамки считывания» при трансляции соответствующего гена в *E. coli* (Spanjaard, R.A., et al. (1990). Nucleic Acids Res. 18(17): 5031-6). Подобных tandemов в гене интерферона α -F два

– AGGAGGG – 37-42 пар оснований и 490-495 п.о., при общем размере гена – 500 п.о. Одиночные Arg-кодоны встречаются исключительно как AGA (см., Рис. 1).

Методом ПЦР в природном гене интерферона были заменены редко встречающиеся для *E. coli* кодоны, на часто встречающиеся. В ходе работы были созданы пять вариантов гена интерферона α -F. Гены клонированы на pET22b(+). Полученными плазмидными ДНК был трансформирован штамм TG1. После отбора клонов методом рестрикционного анализа, соответствие последовательности генов запланированной было подтверждено сиквенированием ДНК методом Сэнгера. Характер нуклеотидных замен и их количество для разных генов интерферона α -F, представлены в Таблице 1.

Полученными плазмидами с различными вариантами гена (кроме варианта №1), были трансформированы клетки штамма *E. coli* BL21(DE3). Трансформанты культивировали в пробирках, в V = 5 мл жидкой среды LB // 100 мкг/мл ампциллина, при 37°C и 240 грм, до значений оптической плотности 0,5-0,6 и индуцировали добавлением ИППГ до 1 mM, после чего культивировали еще 2 часа, и определяли количество интерферона методом белкового SDS электрофореза и методом биологического тестирования. Результаты представлены в Таблице 2.

Вариант № 1 представлял собой природный ген интерферона α -F, без изменения кодонов, клонированный на pET22b(+) с плазмиды pPR-TGATG-CI-IFN-F. Проверка клонов показала очень низкий процент вставки. Последующее сиквенирование генов отобранных клонов выявило наличие мутаций, приводящих к сдвигу рамки считывания, т.е. клонировать природный ген в экспрессионную систему под контролем регуляторных элементов фага T7 не удалось.

Рекомбинантные плазмиды с вариантами генов № 3 и № 4 не давали клонов после трансформации штамма BL21(DE3).

Характеристики роста индуцированных штаммов с вариантами гена № 2 и № 5 были примерно одинаковыми, но у штамма с вариантом гена № 6 (у которого заменены все редко встречающиеся кодоны) OD_{конечная} была в 3 раза выше.

Как видно из Таблицы 1, жизнеспособными оказались варианты гена с заменами Arg-кодонов в 3'-области (R, 484-486: AGA → CGT и tandem R-R, 490-495: AGGAGGG → CGTCGT), что, похоже, является обязательным условием «выживаемости» генетической конструкции. Количество остальных редко встречающихся кодонов в гене интерферона влияет на выход продукта и характеристики роста культуры. Чем их остается больше в структуре гена, тем хуже рост рекомбинантного штамма и меньше нарабатывается целевого белка.

Таблица 1. Нуклеотидные замены для разных вариантов синтетического гена интерферона α -F. Вариант №1 – природный ген интерферона α -F, без замен.

Замены, A.k., положение кодона, замена	Варианты генов, наличие замены					
	1	2	3	4	5	6
R-R, 37-42 : AGGAGG → CGTCGT	-	-	+	+	-	+
I, 49-51 : ATA → ATT	-	-	+	+	-	+
G, 67-69 : GGA → GGC	-	+	+	+	-	+
R, 70-72 : AGA → CGT	-	+	+	+	-	+
R, 100-102 : AGA → CGT	-	+	-	+	+	+
G, 112-114 : GGA → GGC	-	+	-	+	+	+
P, 118-120 : CCC → CCG	-	+	-	+	+	+
L, 247-249 : CTA → CTG	-	+	-	-	-	+
I, 304-306 : ATA → ATT	-	+	-	-	-	+
G, 316-318 : GGG → GGC	-	+	-	-	-	+
P, 331-333 : CCC → CCG	-	+	-	-	-	+
R, 379-381 : AGA → CGT	-	+	-	-	-	+
R, 436-438 : AGA → CGT	-	+	-	-	-	+
R, 451-453 : AGA → CGT	-	+	-	-	-	+
R, 484-486 : AGA → CGT	-	+	-	-	+	+
R-R, 490-495 : AGGAGG → CGTCGT	-	+	-	-	+	+

Таблица 2. Данные белкового электрофореза и биотеста штаммов BL21(DE3)[pET22b(+)-IFN- α F-*i*]. Где *i* – варианты гена. Данные биотеста нормированы на OD культуры.

Номер варианта	1	2	3	4	5	6
Накопление продукта, Биотест, МЕ/мл / о.е.	-	(8,0±1,5)· 10^4	-	-	(4,5±1,0)· 10^4	(8,5±1,0)· 10^5
Накопление продукта, электрофорез, % от суммарного клеточного белка	-	ND	-	-	ND	7-10

1.2. Влияние терминаторов транскрипции в 3'-нетранслируемой области гена на уровень биосинтеза интерферона α -F.

Хорошо известно, что терминация транскрипции, осуществляемая РНК полимеразой фага T7 (РПГ7), недостаточно эффективна. Она, как правило, не происходит в участках эффективной ρ -независимой терминации РНК полимеразой *E.coli*, более того, даже строго специфический терминатор транскрипции фага T7 – Тф, обеспечивает терминацию фаговой полимеразы *in vivo* с эффективностью не более 60% (*McAllister, W.T., Morris, C., Rosenberg, A.H., et al.*// *J. Mol. Biol.* – 1981 – V. 153 – P. 527 – 544). Для предотвращения циклической

транскрипции, инициированной в составе векторной плазмида с фагового промотора, а возможно также и для потенциальной стабилизации 3'-концевого участка мРНК целевого гена, в состав экспрессионных векторов, как правило, вводят терминатор транскрипции Тф.

Было сделано предположение, что наличие одной копии терминатора транскрипции в 3'-концевой не транслируемой области гена недостаточно для максимизации уровня биосинтеза белка и стабилизации всего штамма в целом.

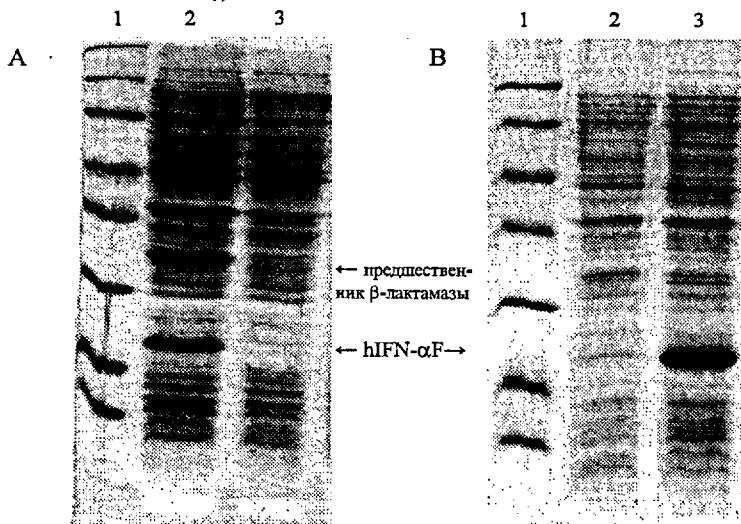
Используя технику ПЦР в плазмиду pET22b(+)-IFN-alpha-F (вариант гена № 6, в котором заменены все редко встречающиеся для *E. coli* кодоны) была клонирована вторая копия терминатора транскрипции Тф. Отбор клонов методом рестрикционного анализа осуществлялся с штамме TG1. Полученной плазмидной ДНК, был трансформирован штамм BL21(DE3). Трансформанты культивировали на жидкой среде до значений оптической плотности 0,5-0,6 и индуцировали 1 mM ИПТГ, после чего культивировали еще 2 часа.

В результате, по данным биологического тестирования и результатам белкового SDS электрофореза, накопление продукта в штамме, имеющем в рекомбинантной плазмиде два терминатора транскрипции, увеличилось в три раза, (см., Рис. 2).

Также, из Рис. 2А видно, что одновременно с накоплением hIFN- α F в условиях индукции достаточно эффективно синтезируется еще один полипептид с молекулярной массой примерно 32 kDa, при этом уровень его накопления также, как и уровень накопления интерферона, достигает около 7-10% от суммарных клеточных белков. Среди полипептидов, кодируемых векторной частью рекомбинантной плазмиды хорошим кандидатом на потенциальную индуцибельную экспрессию в системе транскрипции фага T7 является предшественник β -лактамазы, ген которой расположен по ходу транскрипции с промотора ϕ 10 за терминатором Тф. Образующийся в этом случае белок, с неудаленной в результате недостаточно эффективной секреции в периплазму сигнальной последовательностью, должен был бы обладать молекулярной массой как раз примерно 32 kDa.

Из Рис. 2В видно, что уровень синтеза целевого белка значительно возрос и составил более 22% от суммарных клеточных белков. Ранее тестируемый уровень индуцибельного синтеза белка с массой около 32 kDa в клетках с новой плазмидой значительно снизился и практически не отличался от его содержания в условиях репрессии РПГ7. Таким образом, введение второй копии терминатора транскрипции Тф в 3'-нетранслируемую часть клонированного гена hIFN- α F не только уменьшило «сквозную» транскрипцию, иницииированную с промотора ϕ 10, что в свою очередь привело к снижению уровня экспрессии дистально расположенных по отношению к терминаторам генов, но и значительно повысило эффективность накопления целевого белкового продукта.

Рис. 2. Электрофореграмма суммарных клеточных белков штаммов BL21 (DE3)(pET22b(+)-IFN- α F) и BL21(DE3)(pET22b(+)-IFN- α F-2T ϕ).



А. Накопление целевого продукта в штамме BL21(DE3)(pET22b(+)-IFN-alphaF).

№1 – белки-стандарты молекулярных масс (сверху вниз – 116 кДа, 66 кДа, 45 кДа, 35 кДа, 25 кДа, 18,4 кДа, 14,4 кДа).

№2 – через 2 часа после индукции 1мМ ИПТГ.

№3 – без индукции ИПТГ

Б. Накопление целевого продукта в штамме BL21(DE3)(pET22b(+)-IFN-alphaF-2T ϕ).

№1 – белки-стандарты молекулярных масс (сверху вниз – 116 кДа, 66 кДа, 45 кДа, 35 кДа, 25 кДа, 18,4 кДа, 14,4 кДа).

№2 – без индукции ИПТГ.

№3 – через 2 часа после индукции 1мМ ИПТГ.

2. Создание штамма-продуцента интерферона α -2b и оптимизация условий его регулируемой ферментации.

2.1. Создание штамма-продуцента.

Человеческий интерферон α -2b представляет белковую молекулу из 165 аминокислотных остатков и размером около 19 кДа. Он имеет четыре остатка цистеина и, соответственно, две дисульфидные связи (Cys-1 – Cys-98 и Cys-29 – Cys-138), одна из которых (Cys-29 – Cys-138) существенна для антивирусной активности интерферона (Morehead, H., et al. //Biochemistry – 1984 – V. 23 – P. 2500 – 2507). Человеческие интерфероны α -F и α -2 имеют 83 % гомологии.

Ген интерферона альфа-2b был собран из олигонуклеотидов методом ПЦР по теоретической последовательности, описанной ранее (Колосов, М.Н., и др./ Авторское свидетельство СССР № 1092176 – 1984 - Бюл. Изобр. № 18), и клонирован по сайтам *Bam*H I и *Nde*I в экспрессионный вектор pET22(b+)-2T ϕ , имеющий две копии терминатора транскрипции. Штамм TG1 был трансформирован полученной плазмидой pET22(b+)-IFN-2T ϕ . После отбора клонов содер-

жащих вставку гена интерферона методом рестрикционного анализа, соответствие полученной последовательности гена теоретической, была подтверждена постановкой сиквенса ДНК методом Сэнгера. Полученной плазмидной ДНК, был трансформирован штамм BL21(DE3). Трансформанты культивировали на жидкой среде до значений оптической плотности 0,5-0,6 и индуцировали ИПТГ, после чего культивировали еще 2 часа, и определяли количество интерферона методом белкового SDS электрофореза. Идентичность синтезированного бактериями полипептида человеческому лейкоцитарному интерферону α -2b была подтверждена методами биологического тестирования и ИФА. Количество интерферона α -2b, определенное методом белкового SDS электрофореза, составило около 30 % от суммарного клеточного белка.

2.2. Оптимизация условий культивирования штамма-продуцента IFN- α 2b на лабораторном (2-х л) ферментере Multigen.

Как показано ниже, ключевым моментом, как на стадии культивирования, так и в технологии выделения и очистки интерферона, является выбор индуктора синтеза интерферона. Были рассмотрены различные параметры условий культивирования и два индуктора – синтетический аналог лактозы, ИПТГ, и сама лактоза.

Единичная колония штамма BL21(DE3)[pET22(b+)-IFN-2T₄] пересевалась в колбу с 30 мл среды Лурия-Бергтани (для дозы посевного материала 1:100 – две пробирки по 5 мл; для дозы посевного материала 1:10 – три колбы по 50 мл) с 100 мкг/мл ампициллина и культивировалась в течении 7-и часов при 37°C и 240 грт. Далее содержимым колбы засевали лабораторный ферментер Multigen (1,5 л рабочий объем), используя синтетическую среду M9 с триптоном (10 г/л), дрожжевым экстрактом (5 г/л), глюкозой (3 %) и ампициллином (200 мкг/мл). Клетки культивировали до плотности индукции, после чего в культуру добавляли ИПТГ или лактозу. И далее культивировали до тех пор пока изменение оптической плотности культуры не упадет до 1 о.е./час. pH-стабилизование процесса в обоих случаях поддерживалось на pH = 6,8 12% раствором аммония. Аэрация – 25 % растворенного кислорода от насыщения до и после индукции ИПТГ, а после индукции лактозой – 50 %. После окончания ферментации клетки собирали центрифугированием 20 минут, 7000 об/мин при 4°C.

Были подобраны такие параметры как доза посевного материала, оптимальные концентрации индукторов, определены точки индукции. Выходными параметрами для каждого эксперимента являлись: % интерферона от суммарного клеточного белка, (определялось электрофорезом), выход влажной биомассы после окончания процесса, г на 1 л к.ж., общее время роста культуры в ферментере, часы.

Инокулят вносили в количестве 1/50 от конечного объема ферментационной среды. ИПТГ добавлялось при достижении оптической плотности культуры 10 о.е. При «позднем» добавлении ИПТГ (15 – 20 о.е.) образовывались меньшие количества интерферона, чем при более раннем. Возможно, данного количества ИПТГ не хватало имеющимся, на тот момент, количествам клеток для максимальной индукции. Но и очень раннее добавление (5 о.е.) не было оптимальным, так как сильно ингибировало дальнейший рост культуры. ИПТГ

вносили до конечной концентрации 1 мМ, т.к. меньшие количества (менее 0,5 мМ) не позволяли достичь необходимого уровня накопления продукта, а большие количества (более 2 мМ) значительно ингибировали рост культуры при том же уровне продукта.

Для лактозы точка индукции специально не подбиралась, так как пока в культуральной среде содержится глюкоза, лактоза не утилизируется. При значениях OD₅₄₀ культуры около 30 о.е. достигается падение концентрации глюкозы в среде ниже значений 0,5 %. При этих оптических плотностях культуры добавлялась лактоза. Был проведен ряд экспериментов, в которых лактоза добавлялась при более низких значениях OD₅₄₀ (от 10 до 20 о.е.), при этом, количество синтезированного интерферона было значительно меньше (ниже 15 %) обычного.

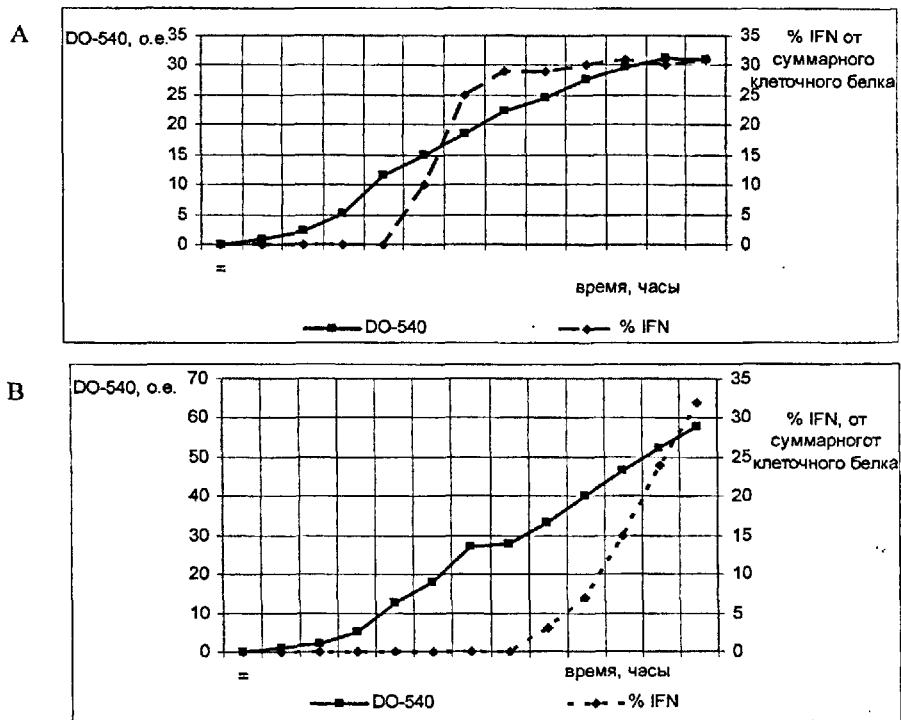
Одного процента лактозы было не достаточно для полной индукции того количества бактериальной культуры, которое накапливалось на момент индукции. Кроме того, лактоза для клеток является не только индуктором, но и источником углерода, что видно из характеристик роста (выхода биомассы, времени роста после индукции и общего времени роста культуры). С другой стороны, ни по количеству продукта, ни по характеристикам роста культуры добавление трех процентов лактозы ничем не отличается от добавления двух процентов.

На Рис. 3 представлены кривые роста и накопления продукта в ходе ферментационных процессов, с оптимальными параметрами для каждого индуктора. Для процесса, индуцируемого лактозой, появление «ступеньки» на графике кривой роста связано не только с хорошо известным ростом бактериальной культуры на двух субстратах, но и с разбавлением культуры за счет внесения лактозы (разбавление на 10 % по объему).

Как видно из Рис. 3, OD₅₄₀ процессов с индукцией лактозой выше почти в два раза по сравнению с индукцией ИПТГ, что также подтверждается выходами влажной биомассы с литра культуральной жидкости – 30 ± 5 г/л – для процессов с индукцией ИПТГ и 55 ± 5 г/л – для процессов с индукцией лактозой. При одинаковом количестве интерферона (в % от суммарного клеточного белка) наработка белка при индукции лактозой шла более плавно, в отличие от индукции ИПТГ. При этом в бактериальных клетках индуцируется синтез ферментов утилизации лактозы и, как бы, «побочно» происходит синтез интерферона. Бактериальная культура начинает активно расти после перехода на новый субстрат,. Клетки не находятся в стрессе резкого «мегасинтеза» гетерологичного белка, что происходит при индукции ИПТГ.

В результате, при сравнении этих двух условий культивирования штамма-продуцента интерферона, получается, что при использовании лактозы в качестве индуктора, выход бактериальной биомассы в два раза выше, а себестоимость процесса ниже (за счет отказа от использования ИПТГ).

**Рис. 3. Кривые роста и накопления интерферона, при использовании двух индукторов – лактозы (2 %) и ИПТГ (1 мМ).
А – индукция культуры ИПТГ. В – индукция культуры лактозой.**



2.3. Масштабирование ферментационного процесса на промышленном (30 л) ферментере Marubishi.

Процесс культивирования штамма-продуцента интерферона α -2b был масштабирован с лабораторного фермента Multigen на промышленный 30 л ферментер Marubishi. Часть параметров осталась без изменений – ферментационная среда, доза посевного материала, аэрация (подача воздуха) 1:1, точка подачи индуктора, концентрация индуктора, pH-статирование. Некоторые параметры пришлось модифицировать. Подача глюкозы осуществлялась не разово, 3% при засеве, а по 1% на каждые 10 о.е. роста культуры, начиная с момента засева. Подача лактозы, также осуществлялась дробно, по 1% в точке индукции и на следующий час. Посевной материал приготавлялся в две стадии.

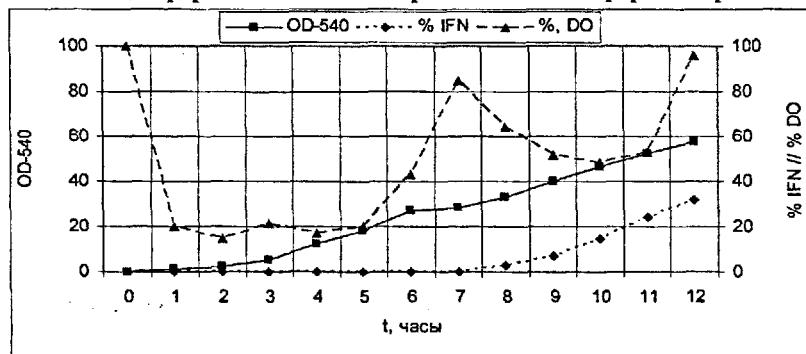
Подобный подход позволил выйти на те же параметры, что и при культивировании в лабораторном ферментере. При подаче сахаров разово (3% глюкозы при засеве и 2% лактозы в точке индукции) рост культуры отличался в худшую сторону от лабораторного варианта.

Также был изменен параметр аэрации. Скорость вращения мешалки являлась функцией от % растворенного в среде кислорода (DO). Во время интенсивного роста до добавления лактозы, аэрация является лимитирующим фактором, мешалка работала на максимальных возможных оборотах, но % растворенного кислорода не превышал 20 %. С падением концентрации глюкозы в среде до лимитирующих рост значений (около 6-го часа), % DO повышался, т.к. останавливался рост культуры. В этот момент добавляли индуктор и источник углерода – лактозу. Бактериальные клетки перестраивают метаболизм для возможности утилизировать лактозу, на кривой роста культуры образуется ступенька.

С 7-го часа промышленной ферментации начинается рост клеток штамма-продуцента интерферона на лактозе, % растворенного кислорода опять падает, индуцируется биосинтез интерферона. На этой стадии % DO поддерживали постоянным (около 50 %). К 12-14 часу рост культуры прекращался, DO поднималось до 95 %, количество синтезированного интерферона в клетках достигало 30 % от суммарного белка.

Усредненные данные по десяти ферментационным процессам представлены на Рис. 4.

Рис. 4. Кривые роста, накопления продукта и % растворенного кислорода, в ходе ферментационного процесса на 30-л ферментере.



3. Создание технологий выделения и очистки субстанции человеческого рекомбинантного интерферона α -2b.

3.1. Получение грубого экстракта нативного мономера интерферона.

Биомассу, полученную после проведения ферментации сразу, без замораживания, ресуспендировали в дезинтеграционном буфере и разрушали на проточном дезинтеграторе (франч-пресс).

Однократная дезинтеграция клеточной биомассы приводила к разрушению 93 – 95% клеток (данные микроскопии). После повторной дезинтеграции оставалось менее 0,5% целых клеток. При недостаточной дезинтеграции клеточной биомассы, оставшиеся целыми бактериальные клетки, осаждаются вме-

сте с тельцами включения интерферона (ТВ) при процедурах отмывок и лизируют при растворении осадка телац включения в GuHCl. Таким образом, нуклеиновые кислоты (ДНК) этих клеток дополнительно загрязняют раствор денатурированного белка и способствуют выпадению интерферона в осадок в последующем процессе ренатурации, что уменьшает выходы интерферона на этом этапе.

По этой же причине, были рассмотрены несколько различных буферов для отмычки телац включения. Этап отмычки ТВ, сам по себе, сильно увеличивает выходы мономера интерферона после этапа ренатурации, по сравнению с не отмывавшимися ТВ. Применение солевых растворов в высокой концентрации (0,5 – 2 М) не отличалось от отмычки дистиллятом. Применение детергентов (мочевина – от 1 до 7 М, GuHCl – от 0,3 до 3 М, Тритон X-100, Твин-20, Твин-80, Бридж, Нонидет – от 0,1 до 1 %) приводило к увеличению чистоты интерферона после этапа отмычки, но не увеличивало эффекта ренатурации, и было причиной значительных потерь продукта в процессе этапа отмычки. Увеличение соотношения ТВ : Буфер, соответственно, увеличивало объемы, и, следовательно, снижало рентабельность и увеличивало трудоемкость процесса. Наиболее оптимальные результаты были получены при использовании двухкратной отмычки ТВ дистиллятом (с промежуточными ресуспендированиями).

Отмытые ТВ интерферона сразу пускали в дальнейшую работу или хранили в замороженном виде при -20°C до 6 месяцев. При увеличении срока хранения ТВ снижался выход мономера интерферона после этапа ренатурации.

Растворение осадка ТВ проводили в растворе 7М GuHCl, смешивая сухую навеску гуанидин гидрохлорида, осадок отмытых телац включения и 10-и кратный буферный раствор Tris-HCl, pH = 8,0, доводя конечный объем до расчетного. При этом концентрация суммарного белка в растворе составляла 30-35 г/л.

Более полное растворение, а также деполимеризация интерферона достигалась проведением реакции окислительного сульфитолиза, с использованием сульфита натрия. Эта реакция более полно расщепляла хаотично замкнутые S-S связи полимеров интерферона, чем восстановление дитиотреитолом или 2-меркаптоэтанолом, и позволяла работать при очень высоких концентрациях белка, значительно уменьшая расход GuHCl.

После проведения диафильтрации для удаления GuHCl и сульфита, и дополнительным восстановлением 2-меркаптоэтанолом, интерферон ренатурирует в течение двух суток, без перемешивания, при температуре около 4-8°C в 50 mM фосфатном буфере.

На характер прохождения ренатурации могут влиять наличие в ренатурационном буфере солей, детергентов, а также исходная чистота и концентрация целевого белка. Были рассмотрены несколько вариантов ренатурационного буфера, но их влияние на выходы интерферона после ренатурации, и конечную чистоту грубого экстракта (и по данным белкового электрофореза и по данным ВЭЖХ) было незначительно.

По окончании ренатурации pH раствора переводят с 8,0 до 4,5 ледяной уксусной кислотой. На данном этапе образуется осадок, который убирают фильтрацией. В осадок выпадает часть бактериальных белков, часть непра-

вильно и правильно собранных интерферонов.

Возможны существенные потери интерферона. Это связано с условиями хранения телец включения (замораживались ли они и на какой срок, или же сразу после получения растворялись в GuHCl), а также с содержанием примесей в ренатурационной смеси: нуклеиновых кислот, бактериальных белков, которые могут являться центрами коагуляции интерферона, из-за сильной гидрофобности последнего.

Выходы интерферона в процессе получения грубого экстракта даны в Таблице 3. Суммарный выход составляет около 70% и для полуфабриката интерферона, полученного из биомассы, индуцированной лактозой и для полуфабриката интерферона, полученного из биомассы, индуцированной ИПТГ.

Табл. 3. Выходы интерферона в процессе получения грубого экстракта, вычислялись по данным измерения концентраций белка и данным SDS-ПАА гель электрофореза в восстановленных условиях.

Этап	V, л	M _{белка} , г	M _{IFN} , г	Выход IFN, %
Биомасса после сепарации	1	90	27	100
Дезинтеграция, френч-пресс	5	60	26,7	99
Отмышка TB, H ₂ O	2 × 2	35	25,4	94
Растворение, GuHCl	2	35	25,4	94
Разведение, фосфатный буфер	20	35	25,4	94
Микрофильтрация, 0,45 мкм	19,5	28	22,9	85
Диафильтрация, 10кДа	10	25	21,8	81
Ренатурация	50	25	21,8	81
Микрофильтрация, 0,45 мкм	49	22	19,6	73
Концентрирование/Диафильтрация, 10кДа	10	20	18,6	69

В отличие от чистоты грубого экстракта по SDS-ПАА гель электрофорезу (93% в восстановленных условиях и около 90% – в невосстановленных), чистота полуфабриката по ВЭЖХ составляла 45 – 70%, в зависимости от биомассы. На Рис.5 хорошо видно, что использование лактозы, вместо ИПТГ в качестве индуктора при проведении ферментации значительно снижает количество модифицированного интерферона. Пики № 4 и 5 на Рис. 5 В (индуктор - ИПТГ), полностью отсутствуют на Рис. 5 С (индуктор - Лактоза), и, кроме того, пики № 6,7 (Рис. 5 В) стали значительно меньше (на Рис. 5 С это пики № 4,5).

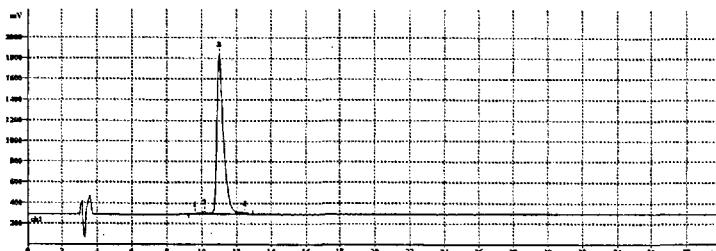
3.2. Хроматография на катионите SP-Toyopearl 550-C.

Для дальнейшей очистки грубого экстракта интерферона необходимы хроматографические методы. При этом основным вопросом чистоты конечной субстанции интерферона является вопрос используемых методов анализа. Практически любым методом ионообменной хроматографии низкого давления можно получить субстанцию интерферона с чистотой выше 95 – 98% по данным SDS-ПАА гель электрофореза в восстановленных и невосстановленных условиях, так как отделить интерферон от примесных белков *Escherichia coli*, а также от полученных в ходе ренатурации ди-, три- и полимеров интерферона не представляет сложности.

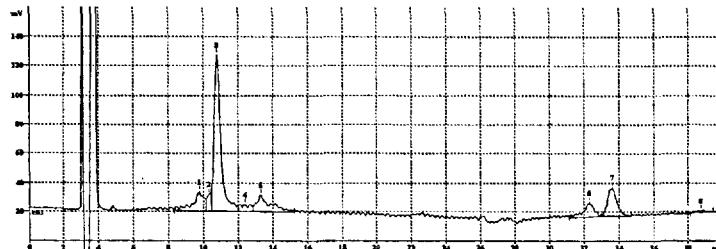
Рис. 5. Профили хроматограмм ВЭЖХ.

А – стандарт интерферона, Биотехна, Литва, содержание нативного интерферона альфа-2b – 97 %. В – грубый экстракт интерферона, полученный из биомассы индуцированной ИПТГ, содержание нативного интерферона альфа-2b – 48 %. С – грубый экстракт интерферона, полученный из биомассы индуцированной лактозой, содержание нативного интерферона альфа-2b – 72 %.

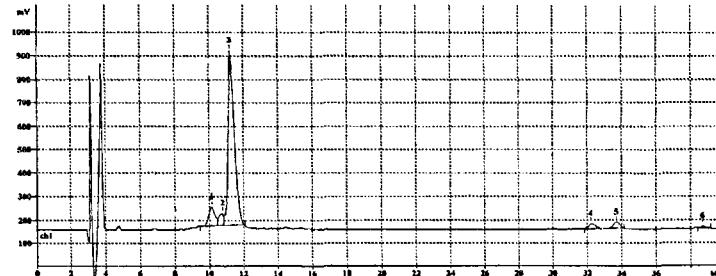
А



В



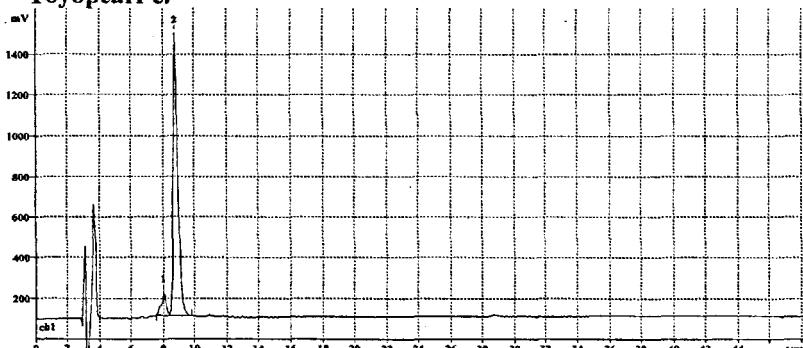
С



При использовании в качестве анализа на чистоту ОФ-ВЭЖХ становятся видны примеси интерфероновой природы, не доступные другим методам анализа. Результаты представленные на Рис. 6 получены для субстанции из биомассы индуцированной лактозой. Сходных результатов для субстанции из биомассы индуцированной ИПТГ удавалось достичь только за счет использования рехроматографии (и то не всегда), что естественно, снижало выходы конечного продукта и увеличивало себестоимость процесса.

Выход интерферона на этапе хроматографической очистки составляет от 75 до 92 %, в среднем – $(84 \pm 9)\%$. Общий выход технологии выделения и очистки интерферона, от биомассы до этапа очистки на SP-Toyopearl – $(58 \pm 6)\%$

Рис. 6. Анализ ВЭЖХ субстанции интерферона после очистки на SP-Toyopearl'e.



Как видно из Рис. 6, получаемый после очистки на сорбенте SP-Toyopearl интерферон имеет два пика. Первый пик, содержание которого зависит от свойств биомассы (т.е. не определенных пока характеристик процесса ферментации), составляет от 4 до 10% (от суммы «переднего» и «нативного» пиков) для биомассы, полученной в ферментационном процессе с использованием лактозы в качестве индуктора. Т.е. чистота по ВЭЖХ нативного интерферона составляет от 90 до 96%. Для биомассы, получаемой в ферментационном процессе с использованием ИПТГ в качестве индуктора, количество переднего пика составляло от 8 до 20%, т.е. ровно в два раза больше.

«Первый» пик на Рис. 6, также как и нативный интерферон, обладает биологической активностью (он был выделен с использованием полу-препартивного ВЭЖХ, и проверен на биологическую активность), его удельная активность равна удельной активности нативного интерферона. По данным N-концевого секвенирования белки в этом пике, также как и выделяемый интерферон, не содержат N-концевого метионина, и, по-видимому, представляют собой некий вариант пост-трансляционно-модифицированного интерферона.

3.3. Хроматография на полу-препартивном ОФ-ВЭЖХ, ODS.

Дальнейшая очистка продукта от данной примеси (пик № 1 на Рис. 6) осуществлялась методами препаративной ОФ-ВЭЖХ, с использованием стальной колонки ODS, 300 A, 5 мкм, 4,6x250 мм, Jupiter, Phenomenex. Субстанцию

интерферона (с исходной чистотой по ВЭЖХ – 93%) наносили через инжектор (1 мл), масса нанесения – 1,5 мг. Отбор фракций осуществляли с 10 по 15-ю минуты (25 фракций). Объединили фракции с 5 по 18-ю (см., Рис. 7).

Профиль препаративной хроматографии представлен на Рис. 7. Из рисунка видно, что при нанесении на ВЭЖХ колонку препартивных количеств белка (1,5 мг), становятся видимыми остаточные пики, которые не детектируются при нанесении аналитических количеств (около 10 мкг, см., Рис. 6). Несмотря на их кажущиеся большие количества, при аналитическом детектировании они составляют менее 0,01 % (пределы интегрирования). «Передний» пик, составляющий около 7%, при таких количествах нанесения, не разделялся, а выходил одним пиком с нативным интерфероном. Результаты анализов, полученных после препартивного ВЭЖХ субстанции интерферона (объединенные фракции 5–18) представлены на Рис. 8. Выход этапа препартивного ВЭЖХ по нативному интерферону составил около 87%. Таким образом, общий выход – $(50 \pm 5)\%$. Полученный интерферон имеет удельную активность $(2,4 \pm 0,2) \times 10^8$ МЕ/мг, (биологическая активность измерялась после удаления из субстанции ацетонитрила и ТХУ методом диафильтрации в натрий-ацетатный буфер) что соответствует данным других авторов для фармакологически чистого препарата интерферона.

Рис. 7. Профиль препаративной ВЭЖХ.

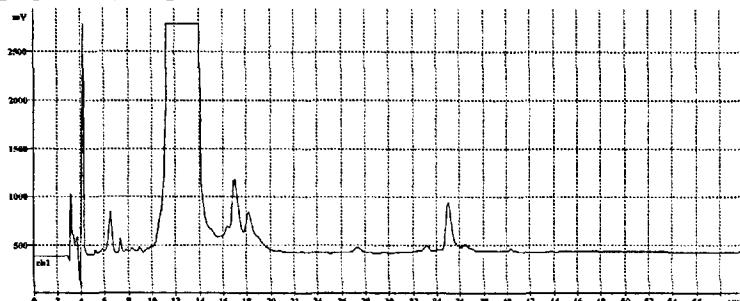
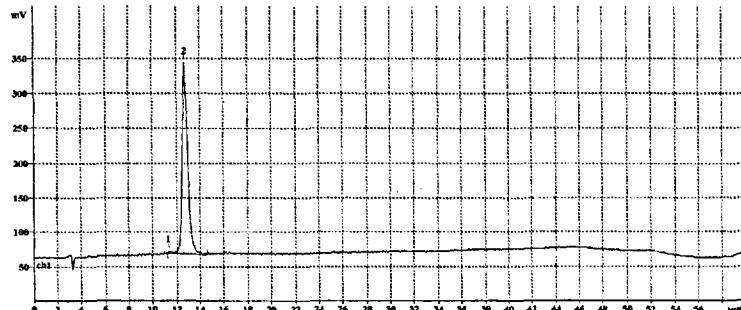


Рис. 8. Анализ ВЭЖХ субстанции интерферона, после очистки на препартивной ВЭЖХ.

Передний пик – 0,99 %, нативный интерферон – 99,01 %.



Таким образом, субстанции интерферона получаемые по разработанной технологии имеют следующие показатели чистоты:

Метод	После очистки ионообменной хроматографией	После очистки препаративной ОФ-ВЭЖХ
ОФ-ВЭЖХ, ODS, 4,6x250 мм, 5 мкм, 300 А	93 %	> 99 %
SDS электрофорез, восстановленные условия, окраска серебром	> 98 %	> 99 %
SDS электрофорез, не восстановленные условия, окраска серебром	> 98 %	> 99 %
Остаточные белки штамма-продуцента, ИФА	Около 50 пг на 1 мг белка (менее 50 ppm)	Менее 5 пг на 1 мг белка (менее 5 ppm)
Остаточная ДНК штамма-продуцента и вектора, метод молекулярной гибридизации	Менее 150 пг на 1 мг белка (менее 0,15 ppm)	Менее 150 пг на 1 мг белка (менее 0,15 ppm)
Бактериальные эндотоксины, ПАЛ-тест	Около 20 МЕ, в объеме, который содержит 1 мг белка	Менее 1 МЕ, в объеме, который содержит 1 мг белка
Удельная Активность	(2,4 ± 0,2) x 10 ⁸ МЕ/мг	(2,4 ± 0,2) x 10 ⁸ МЕ/мг

Не смотря на то, что препаративное ВЭЖХ является дорогостоящей процедурой, использование этого метода на конечной стадии очистки рекомбинантного интерферона от модифицированных вариантов этого белка, является одним из нескольких путей решения проблемы получения высокоочищенной фармакопийной субстанции интерферона.

Разработанная в процессе выполнения данной диссертационной работы технология выделения и очистки рекомбинантного интерферона α -2b человека из биомассы бактериальных продуцентов (с использованием одной хроматографической стадии – очистки на катионите SP-Toyopearl) успешно применяется с 2004 г. в ЗАО «Мосагроген» (Москва) для создания ветеринарных препаратов «Миксоферон®» и «Кинорон®».

ВЫВОДЫ

- Получен новый бактериальный штамм-продуцент рекомбинантного интерферона α -F человека с уровнем накопления целевого белка более 25 % от суммарных клеточных полипептидов. Этот уровень был достигнут благодаря модификации гена интерферона α -F включением в его состав часто встречающихся в *E.coli* синонимических аминокислотных кодонов и обеспечением транскрипции РНК полимеразой фага T7 целевого гена, входящего в состав экспрессионной кассеты с tandemом терминаторов транскрипции в 3'-нетранслируемой области.
- Создан также новый промышленный продуцент рекомбинантного интерферона α -2b человека с продуктивностью, составляющей более 30 % от суммарных клеточных полипептидов.

3. Разработаны варианты протокола промышленной ферментации бактериального штамма-продуцента человеческого рекомбинантного интерферона α -2b, позволяющие упростить дальнейшую очистку интерферона и уменьшить ее себестоимость.
4. Разработаны варианты технологии выделения и очистки интерферона α -2b, с общим выходом 50 – 60 %, позволяющие получать субстанцию интерферона ветеринарного и фармакопийного качества. Препаративный уровень соответствует получению порядка 150 тыс. ветеринарных терапевтических доз и 3 млн. медицинских терапевтических доз.
5. Созданные в работе новые штаммы-продуценты рекомбинантных интерферонов человека и промышленных способов их выделения и очистки с 2004 г. успешно используются в ЗАО «Мосагроген» для промышленного получения субстанций этих белков и создания на их основе эффективных препаратов «Миксоферон®» и «Кинорон®» ветеринарного назначения.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гавриков А.В., Киверо А.Д., Каташкина Ж.И., Дорошенко В.Г., Машко С.В. «Оптимизация экспрессии генов в бактериальных клетках в биотехнологических исследованиях XXI века» // В сб.:МИФИ, Москва, январь 2002, 125-139.
2. Машко С.В., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Мичурина Т.А., Гавриков А.В., Беневоленский М.С., Киверо А.Д., Каташкина Ж.И., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Дебабов В.Г. «Использование метаболической регуляции для оптимизации экспрессии генов в бактериальных клетках – новое направление биотехнологии XXI-века.» // Биотехнология №4 (2002), 3-14.
3. Гавриков А.В., Зименков Д.В., Машко С.В. «Введение тандема терминаторов транскрипции повышает эффективность накопления рекомбинантных белков в клетках *Escherichia coli* при использовании системы экспрессии на основе РНК-полимеразы фага T7» // Биотехнология №2 (2005), 18-25.
4. Зименков Д.В., Гавриков А.В., Машко С.В. «Замена редко встречающихся в *Escherichia coli* эукариотических аминокислотных кодонов на синонимические прокариотические увеличивает эффективность накопления рекомбинантных интерферона- α F и интерлейкина-1 β человека» // Биотехнология №3 (2006), 17-32.
5. Гавриков А.В., Рязанов И.А., Калужский В.Е., Машко С.В. «Зависимость процедуры выделения и очистки рекомбинантного интерферона- α 2b человека от условий его накопления в клетках штамма-продуцента в ходе регулируемого культивирования» // Биотехнология №5 (2006), 23-31.



Принято к исполнению 09/11/2006
Исполнено 10/11/2006

Заказ № 908
Тираж: 120 экз.

Типография «11-й ФОРМАТ»
ИИН 7726330900
115230, Москва, Варшавское ш., 36
(495) 975-78-56
www.autoreferat.ru

