

БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 577.112.083+663.18

Т. Н. Луценко¹, А. Ю. Галкин²

¹ООО «УНИВЕРСАЛЬНОЕ АГЕНСТВО «ПРО-ФАРМА»

²Национальный технический университет Украины
«Киевский Политехнический Институт»

ОБОСНОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-7 ЧЕЛОВЕКА РЕКОМБИНАНТНОГО

Статья посвящена вопросу выбора биотехнологических подходов получения интерлейкина-7 (ИЛ-7) человека рекомбинантного. Учитывая перспективы терапевтического применения ИЛ-7 человека в лечении инфекционных заболеваний, в онкологии и трансплантологии, важной задачей является разработка промышленной технологии получения биологически активного рекомбинантного ИЛ-7. В результате проведенного анализа обоснованы основные этапы в технологии получения целевого белка.

В работе проведен анализ различных систем экспрессии на основании прокариотических и эукариотических клеток, которые возможно использовать с целью создания продуцента рекомбинантного ИЛ-7 человека. На основании которого, с точки зрения технико-экономических показателей и безопасности конечного продукта, предложено использование прокариотических клеток *Escherichia coli* и системы экспрессии, сконструированной с помощью плазмидного вектора. В качестве альтернативы использования химического индуктора экспрессии целевого белка рассмотрена процедура аутоиндукции, что позволит значительно снизить себестоимость целевого белка. Также детально проанализированы технологические подходы к выделению и очистке целевого белка с нерастворимой фракции бактериальной цитоплазмы, с так называемых телец включения. Это позволяет приступить к дальнейшему этапу работы – отработке технологии получения рекомбинантного ИЛ-7 человека на практике.

Ключевые слова: система экспрессии, вектор, рекомбинантный, продуцент, аутоиндукция, рефолдинг.

T. N. Lutsenko¹, A. Yu. Galkin²

¹ООО “UNIVERSAL’NOE AGENSTVO “PRO-FARMA”,

²National Technical University of Ukraine “Kiev Polytechnic Institute”

SUBSTANTIATION OF BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES OF PRODUCING INTERLEUKIN-7 RECOMBINANT HUMAN

The article focuses on the selection of biotechnological approaches to produce interleukin-7 (IL-7) human recombinant. Considering the prospects for therapeutic use of IL-7 in the treatment of human infectious diseases, the important task of oncology and transplantation is the development of industrial technology for producing biologically active recombinant IL-7. The analysis proved the main stages in the technology of the target protein production.

The paper analyzes the different expression systems based on prokaryotic and eukaryotic cells, which may be used to create producer recombinant human IL-7. On its basis, in terms of technical feasibility and safety of the final product, it is proposed to use prokaryotic *Escherichia coli* and expression systems constructed using a plasmid vector. Instead of using a chemical inducer of expression of the target protein, the procedure of auto-induction is considered to be an alternative, which will greatly reduce the target cost. It is also analyzed in detail the technological approaches to the isolation and purification of target protein from the insoluble fraction of the bacterial cytoplasm with the so-called inclusion bodies. This allows you to proceed to the next stage of work, it is developing the technology for producing recombinant human IL-7 in practice.

Key words: expression system, vector, recombinant, producer, auto-induction, refolding.

Введение. Интерлейкин-7 (ИЛ-7) – это иммунный цитокин, играющий центральную роль в развитии и гомеостазе Т- и В-лимфоцитов, он принимает участие в развитии дендритных клеток, натуральных киллеров и клеток-индукторов лимфоидной ткани, которые тоже являются важными звеньями иммунитета.

На сегодняшний день ведутся исследования ИЛ-7 как средства для восстановления иммунной системы людей, перенесших трансплантацию костного мозга, высокоактивную антиретровирусную терапию и химиотерапию [1, 2].

ИЛ-7 был впервые обнаружен в Immunex Research and Development corporation в 1988 г. [3, 4]. Комплементарная ДНК гена ИЛ-7 человека впервые была клонирована в 1989 г. [5, 6].

С точки зрения терапевтического потенциала существует значительная заинтересованность в развитии технологий для производства биологически активного полипептида ИЛ-7. Есть много способов получения биологически активных протеинов. Возможен метод выделения ИЛ-7 человека с лимфоидных органов, но это очень дорогостоящий метод, благодаря которому возможно получать микроскопические количества протеина, что нерентабельно для крупномасштабного производства. Исходя из современных достижений молекулярной биологии, генетики и биотехнологии можно сделать вывод, что оптимальным решением при разработке технологии получения человеческого ИЛ-7 является создание рекомбинантного продуцента для синтеза описанного цитокина. Последующие этапы работы включают в себя подбор оптимальных параметров технологических стадий получения рекомбинантного ИЛ-7, таких как: ферментация, индукция синтеза целевого белка, выделение, очистка и концентрирование целевого белка.

Учитывая перспективы широкого терапевтического использования ИЛ-7 целью настоящей работы было обоснование биотехнологических подходов к получению биологически активного и высокоочищенного ИЛ-7, пригодного для создания лекарственных форм.

Структура и физико-химические свойства ИЛ-7. Ген ИЛ-7 человека (33 т. п. н.) находится в длинном плече 8-й хромосомы в локусе q12-q13, включает в себя 6 экзонов и 5 интронов и имеет открытую рамку считывания 534 пар оснований. На этом гене транскрибируются молекулы мРНК размером 1,8 и 2,4 т. п. н. Кодировать 177 аминокислот, в том числе и сигнальный пептид, состоящий из 25 аминокислот [7, 8].

ИЛ-7 человека – это одноцепочечный гликопротеин, аминокислотная последовательность которого предусматривает молекулярную массу (ММ) 17,4 кДа, но в результате гликозилирования

образуется активная форма ММ 25 кДа [9, 10]. Молекула ИЛ-7 содержит 4 альфа-спирали (А, В, С, D), упорядоченные в пространстве с помощью дисульфидных мостиков, а также одну мини-спираль (mini-helix 1) (рис. 1). Гидрофобное ядро ИЛ-7 образовано аминокислотами Leu16 Met17 Ile20 Leu23 Leu24 (спираль А), Phe55, Leu56, Ala59, Leu63, Phe66 (спираль В), Leu79, Val82, Thr86, Leu89, Thr93 (спираль С), Leu128, Leu131, Leu135, Ile138 и Trp142 (спираль D). Некоторые остатки, не относящиеся к спиральным участкам, добавляют свои латеральные цепи к ядру, что является характерной особенностью большинства гематопоэтинов. В случае ИЛ-7 этими остатками являются Met27 Phe39, Phe41, Phe42 (петля АВ) и Phe75 (петля ВС) [11–13].

Аминокислотная последовательность ИЛ-7 содержит 6 остатков цистеина, которые способны образовывать три внутримолекулярные дисульфидные связи. Первая связь соединяет N-конец цепи и спираль С Cys1-4 (Cys2-Cys92), вторая формируется между петлей АВ и началом спирали D Cys3-6 (Cys47-Cys141). Третья дисульфидная связь находится между петлей АВ и нижней частью спирали D Cys2-5 (Cys34-Cys129). Молекула содержит также 3 сайта N-гликозилирования в положениях Asn95, Asn116 и Asn141 [12].

Коэффициент молекулярной экстинкции ИЛ-7 – 7690, изоэлектрическая точка – 8,52, заряд при рН 7,0 составляет 3,51 [14].

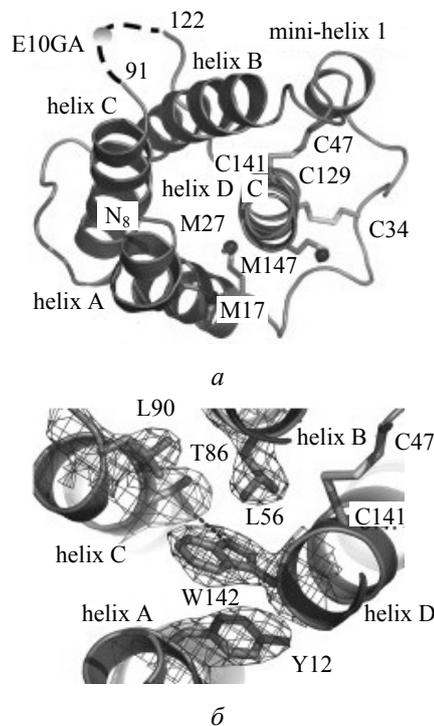


Рис. 1. Структурная модель негликозилированного ИЛ-7 [12]:

а – трехмерная модель молекулы ИЛ-7;
б – гидрофобное ядро ИЛ-7

Молекулярно-биологические аспекты создания продуцента рекомбинантного ИЛ-7. За более чем 20 лет с момента открытия и описания человеческого ИЛ-7 учеными создано множество рекомбинантных систем экспрессии на основе прокариотических и эукариотических продуцентов, примеры которых, подробно описаны в таблице [14–23]. Для переноса генетической последовательности, кодирующей синтез ИЛ-7, используют векторную ДНК. Вектором может быть плазида, вирус, фаг, космиды или эписома. Вектор обычно содержит регуляторные элементы или последовательности для контроля экспрессии рекомбинантного человеческого интерлейкина-7 (рЧИЛ-7). Регуляторная последовательность может быть выбрана среди промоторов, энхансеров, сайленсеров, тканеспецифичных и пептидных сигналов, интронов, терминаторов или их комбинаций.

Эти регуляторные элементы могут быть получены из животного, растительного, бактериального, дрожжевого, бактериофагового или вирусного генетического материала. Вектор должен содержать сайт начала репликации и маркерный ген [12].

Исходя из приведенных данных, для синтеза рекомбинантного ИЛ-7 человека, по нашему мнению, наиболее технологичным и экономически выгодным является создание продуцента на основе прокариотического организма *E. coli* и системы экспрессии, сконструированной с помощью плазмидного вектора. Этот микроорганизм является детально изученным, не требует малодоступных питательных сред для культивирования, и такая система экспрессии позволяет получать высокие выходы целевого белка [15, 16]. В качестве примера можно рассмотреть систему экспрессии, сконструированную с помощью плазмидного вектора рАСУС184 и штамма *E. coli* BL21(DE3) (рис. 2).

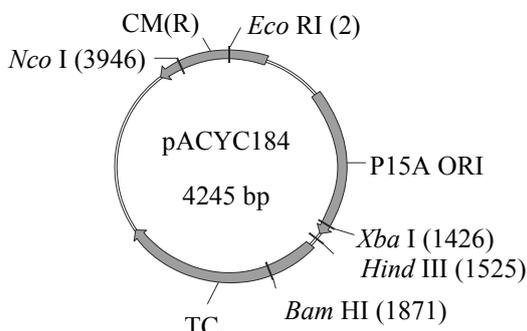


Рис. 2. Карта рАСУС184 вектора клонирования [18]:

- CM(R) – ген резистентности к хлорамфениколу;
- TCr – ген резистентности к тетрациклину;
- P15A ORI – сайт начала репликации;
- Bam HI, Hind III, Xba I, Eco RI, Nco I – сайты рестрикции соответствующими эндонуклеазами

Основные преимущества предлагаемой системы экспрессии заключаются в следующем: экономическая выгода, так как для культивирования необходимы доступные питательные среды простого состава; более глубокая изученность генетических, молекулярно-биологических, биохимических и физиологических свойств продуцента; транскрипция структурного гена в указанной системе регулируется *lacUV5* промотором β -галактозидазной оперона, что дает возможность использовать схему аутоиндукции для экспрессии белка, что делает процесс гораздо более привлекательным с технико-экономической точки зрения; отсутствие генов *Lon* и *OmpT*, ответственных за синтез клеточных протеаз, разрушающих чужеродный белок, синтезируемый клетками [16, 17].

Ферментация и методы индукции синтеза рекомбинантного ИЛ-7 человека. Процесс ферментации включает две стадии: получение инокулята и индукцию синтеза целевого белка. Инокулят получают путем выращивания продуцента на простой среде, которая является оптимальной для выращивания бактерий. Среда для выращивания *E. coli* должна содержать ионы Na^+ , K^+ , Mg^+ , NH_4^+ , Cl^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , микроэлементы и источник углерода (например, глюкоза) [17]. Для культивирования штамма *E. coli* продуцента рЧИЛ-7 возможно использование одной из сред стандартного состава, которые обычно используются для выращивания бактерий, например: среда Luria-Bertani (LB) (1% триптона, 0,5% дрожжевого экстракта и 1% NaCl); 2YT (1,7% бактотриптона, 1% дрожжевого экстракта и 0,5% MgSO_4); SOC (2% бактотриптона, 0,55% дрожжевого экстракта, 1% NaCl и 0,25% KCl).

В состав одной из стандартных сред обязательно добавляют источник углерода – глюкозу и хлорамфеникол для селекции трансформированного штамма [24].

Как свидетельствуют литературные источники, оптимальной средой для выращивания рекомбинантных штаммов *E. coli* является среда 2YT [24]. На данной среде обычно инкубируют продуцент при температуре 36–38°C, при скорости оборотов от 100 до 160 об/мин в течение 2–3 ч до достижения культурой середины экспоненциальной фазы роста, что определяется достижением культуральной жидкостью плотности 0,6–1,0 при длине волны 590 нм [25, 26].

Индукцию синтеза рЧИЛ-7 можно проводить двумя методами: добавлением химического индуктора изопропил- β -D-1 тиогалактопиранозид (ИПТГ) в концентрации от 0,1 до 2,0 mM; ферментацией на среде для аутоиндукции с лактозой.

Системы экспрессии, используемые для синтеза рекомбинантного ИЛ-7 человека

Продуцент	Вектор	Регуляторная последовательность	Маркерный ген	Преимущества данной системы	Недостатки данной системы
Прокариотические системы					
<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , виды родов <i>Streptomyces</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i>	Плазмида, вирус или фаг	Промотор T7 РНК поли-меразы (pT7), TAC промотор (pTAC), Ttr промотор, Lac промотор, Tte промотор, P _{hoA} промотор	Ген устойчивости к антибиотикам	Высокие технико-экономические показатели. Более глубокая изученность прокарриотических продуцентов. Высокие выходы целевого белка	В большинстве случаев целевой белок нарабатывается в виде телец включений в хаотично-развернутой форме, что требует проведения дополнительных технологических этапов. Требуется учета требований вирусной безопасности (для векторов в виде вирусов и фагов)
Эукарриотические системы					
Дрожжевые клетки <i>Pichia pastoris</i>	Линеризованный вектор pPICZαВ	Окислительный промотор I	Ген устойчивости к зеозину	Наработка белка в секретруемой форме	Целевой белок нарабатывается в гликозилированной форме, которая не соответствует человеческой
Культуры клеток насекомых <i>Trichoplusia ni</i> и <i>Spodoptera frugiperda</i>	Бакуловирусовая векторная система экспрессии	Активный промотор OrFЕ2	Ген устойчивости к зеозину	Наработка белка в секретруемой форме	Дорогостоящие среды для культивирования продуцента. Значительная продолжительность процесса наработки целевого белка
Культуры клеток млекопитающих: COS-7 (клетки почек фибробластов обезьян), C127 (клетки мышинной опухоли молочной железы), 3T3 (клетки мышинных эмбриональных фибробластов), CHO (клетки яичника китайского хомячка), HeLa (клетки раковой опухоли шейки матки человека), VHK (клетки почки хомяка), HEK-293 (человеческие эпидермальные кератиноциты)	Плазмидные векторы pCR, pCDNA-hPS, аденовирусные векторы	Вирусные промоторы, промоторы внутренних генов и гибридные промоторы	Селективный маркерный ген устойчивости к неомицину или зеозину	Целевой белок является гуманизированным. Степень чистоты полученного белка намного выше чем у белка, получаемого с помощью систем экспрессии на основе прокарриотических и дрожжевых клеток	Низкая эффективность с точки зрения технико-экономических показателей. Требуется учета требований вирусной безопасности

Для индукции синтеза рЧИЛ-7 с экономической стороны лучшим технологическим решением будет метод аутоиндукции, так как такой подход значительно снижает себестоимость процесса ферментации. Согласно литературным данным [27], для обеспечения процесса аутоиндукции, с выходом целевого продукта больше, чем в случае индукции ИПТГ, в среде для ферментации должны входить следующие дополнительные компоненты: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, или NH_4Cl , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Д-мальтоза, MgSO_4 , глицерол, глюкоза, α -лактоза, хлорамфеникол, NaHCO_3 , возможно также добавление следовых металлов (железо, марганец, кобальт, цинк, никель, медь и молибден в виде солей). Иннокулируют посевной материал на среду данного состава и выращивают при оптимальной температуре на шейкере при постоянном перемешивании в течение 16–22 ч, после чего центрифугируют, собирают биомассу и хранят при температуре минус 20°C [27–29].

Выделение и очистка рекомбинантного ИЛ-7 человека. Для проведения очистки рекомбинантного ИЛ-7 человека от белков клеточ-продуктов необходимо провести анализ локализации в них целевого белка, обычно в системах экспрессии такой конструкции, как описана в работе, целевой белок накапливается в нерастворимой фракции бактериальной цитоплазмы – в так называемых тельцах включения.

Если целевой белок синтезируется клеткой в виде телец включения, то дальнейший технологический процесс включает следующие этапы [30]: разрушение клеток и выделение телец включений; отмывка и центрифугирование телец включений; ренатурация (растворение телец включений); рефолдинг, сопровождающийся образованием правильно замкнутых дисульфидных связей, в ходе чего белок приобретает нативную конформацию; финальная очистка.

Для выделения телец включений, в которых находится синтезированный рЧИЛ-7, прежде всего необходимо разрушить клеточную стенку продуцента. Для разрушения клеток используют различные химические, биологические и физические методы. Все процедуры должны быть достаточно жесткими, чтобы разрушить клеточную стенку, и вместе с тем достаточно мягкими, чтобы исключить денатурацию белка.

Химические методы разрушения клеточных стенок включают обработку щелочью, органическими растворителями или детергентами. Если белковый продукт не разрушается при pH 10,5–12,5, то возможно достаточно эффективно лизировать большие количества бактериальных клеток.

Обработка органическими растворителями представляет собой простой и недорогой способ разрушения клеток, используемый для вы-

деления ферментов из микроорганизмов. Однако, чтобы убедиться в том, что в подобранных условиях, белковый продукт не денатурирует, обычно проводят предварительное тестирование. Под действием детергентов в мембранах бактериальных клеток образуются поры, через которые белки и другие молекулы выходят из клеток. К сожалению, применение детергентов ухудшает технико-экономические характеристики технологий, в большинстве случаев в их присутствии белки денатурируют, кроме того, они могут загрязнять конечный продукт [30].

Основным биологическим методом разрушения клеток микроорганизмов является лизис с помощью ферментов. Так лизоцим яичного белка легко гидролизует клеточные стенки грамположительных бактерий. Для разрушения клеточных стенок грамотрицательных бактерий используют лизоцим и этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА). Ферментативная обработка высокоспецифична, а лизис проходит в мягких условиях [31].

Бактериальные клетки возможно разрушать и физическими методами: немеханическими (например, с помощью осмотического шока или быстрого многократного замораживания и размораживания) или механическими (обработкой ультразвуком, с помощью шаровой мельницы, гомогенизации под давлением). Механическое разрушение высокоэффективное, что делает его более привлекательным [30, 31].

Такой физический немеханический метод, как метод многократного замораживания и размораживания, является недостаточно эффективным, так как после этой процедуры многие клетки остаются неразрушенными, и долговременным.

Методы с использованием ультразвука или шаровой мельницы достаточно эффективны в плане разрушения клеток, но обработка клеточной массы этими методами может приводить к нагреву массы, что может спровоцировать денатурацию белка. Организовать процедуру охлаждения клеточной суспензии при обработке ультразвуком в больших объемах достаточно проблематично, поэтому использование данных методов для промышленного производства нецелесообразно [31, 32].

Для промышленного производства, по нашему мнению, наиболее приемлемым в данном случае является биохимический метод разрушения клеток лизоцимом и ЭДТА с последующим добавлением ДНКзы для разрушения клеточной ДНК и отмывка в серии буферов с содержанием детергентов, таких как ЭДТА, тритон X-100 и дезоксихолат натрия, для улучшения очистки и дальнейшего растворения телец включений [14, 31].

Следующим этапом технологии является процедура растворения телец включения, где рекомбинантные белки находятся в агрегированной, неактивной форме. Технологический процесс получения рекомбинантного ИЛ-7 человека может включать растворение телец включения в присутствии хаотропного агента (например, высоких концентраций мочевины, гуанидина гидрохлорида или тиоцианатных солей) и/или детергента (додецилсульфат натрия, бромид цетилтриетиламмония, N-лаурилсаркозин, твин-80). При необходимости в солюбилизирующий буфер добавляют восстанавливающие агенты (2-меркаптоэтанол, дитиотриетол или цистеин). Для удаления ионов металлов, которые приводят к нежелательному окислению тиольных групп белков, в состав солюбилизирующего буфера могут быть добавлены хелатирующие реагенты, такие как ЭДТА, в концентрации от 1 до 10 мМ. Кроме этого, для растворения телец включений используют щелочные или кислые буферные растворы, в комбинации с вышеперечисленными условиями [31, 32].

Согласно литературным данным, при использовании 8 М раствора мочевины в качестве хаотропного агента, большой процент посторонних примесей остается в нерастворенном виде, что облегчает дальнейшую очистку [31]. Следующий этап технологии – рефолдинг (удаление из солюбилизирующего буфера денатурирующего агента) полученного белка. Для этого возможно использование нескольких подходов, таких как разведение, диализ, диафильтрация, а также хроматографические методы.

При разведении ренатурирующий буфер обычно вносят прямо в раствор солюбилизованного белка. Этот метод, по нашему мнению, имеет много недостатков, которые заключаются в необходимости последующего концентрирования, а также в высоком выходе продуктов неправильного фолдинга, поэтому в промышленности этот метод имеет ограниченные перспективы использования [31].

Методики с применением диализа основаны на относительно медленном удалении солюбилизирующего реагента через мембрану с фиксированным размером пор. Так как равновесие в системе устанавливается довольно долго, этот процесс редко используют в промышленных масштабах. Кроме того, при достижении промежуточных концентраций денатурирующих агентов возможна агрегация белка [31].

Для промышленных целей более применим метод диафильтрации. При данном подходе удаления денатурирующего агента не лимитируется скоростью диффузионного процесса, но значительные уровни накопления денатуриро-

ванного белка на мембране ограничивают широкое использование этого метода [31].

В промышленных масштабах обычно используют хроматографические методы, такие как металхелатирующая, ионообменная, обратноразовая хроматография, а также гель-фильтрация. Преимущество хроматографических методов состоит в возможности проведения процесса в условиях, при которых белок находится в денатурированном состоянии [31, 33].

Гель-фильтрация является быстрым и эффективным методом, широко используемым в промышленности. Обычно для рефолдинга методом гель-фильтрации применяют буферные растворы с содержанием аминокислот (глицин, аргинин), детергентов в низких концентрациях (0,1–0,5% неионный полиоксэтилен-40, 0,100–0,005% твин-80), а также определенные анионы (фосфаты, сульфаты). Эти реагенты фактически не влияют на скорость рефолдинга, но значительно уменьшают вероятность образования агрегатов, принимая участие в дестабилизации межмолекулярных и гидрофобных взаимодействий [31, 34].

Исходя из всего вышесказанного, оптимальным по нашему мнению, вариантом для рефолдинга рекомбинантного ИЛ-7 человека является метод гель-фильтрации на колонке с сорбентом с использованием буферного раствора с содержанием L-аргинина гидрохлорида и твина-80. Этот быстрый и эффективный метод не приводит к значительному разведению белка, с успехом применяется для белков, которые не образуют нерастворимых промежуточных продуктов. Буферный раствор данного состава повышает эффективность прохождения процедуры и уменьшает вероятность образования агрегатов [31, 36].

На следующем этапе к полученному белковому раствору необходимо добавить окислительно/восстановительную пару низкомолекулярных тиолов для формирования дисульфидных связей, то есть проведения процедуры ренатурации (например: восстановленный/окисленный гутатионы, дитиотриетол/окисленный глутатион, дитиоэритритол/окисленный глутатион или цистеин/цистин). Рекомендуемая концентрация восстановленного тиола для формирования дисульфидных связей составляют от 1 до 10 мМ, соотношение восстановленной и окисленной форм от 10:1 до 3:1 [31, 36].

Дальнейшая процедура очистки заключается в последовательной хроматографической очистке с использованием анионо- и катионообменных сорбентов. Для первого этапа очистки возможно использование Q сефарозы (сильный анионообменник) в сочетании DEAE сефарозой (слабый анионообменник) – на этом этапе проводится

основная очистка от всех посторонних примесей, второй этап – очистка на колонке с сильным катионообменным сорбентом с целью замены буферного раствора на буферный раствор для готовой лекарственной формы [23, 36].

Заключение. Интерлейкин-7 является мощным пролиферативным цитокином для стимуляции адаптивной иммунной реакции, который можно использовать в комплексной терапии солидных опухолей, хронических вирусных инфекций и при трансплантационных процедурах, поэтому разработка биотехнологии получения препаратов рекомбинантного ИЛ-7 человека является актуальной задачей.

Потенциальные направления применения препаратов, созданных на основе рЧИЛ-7, требуют крупномасштабных количеств очищенного рекомбинантного белка. Хотя в настоящее время создано и описано много систем экспрессии, которые могут быть использованы как продуценты рЧИЛ-7. В настоящее время большинство рекомбинантных протеинов получают в прокариотических системах экспрессии с использованием клеток продуцентов *E. coli*.

По нашему мнению, для синтеза рЧИЛ-7 оптимальным вариантом является создание системы экспрессии на основе продуцента *E. coli* BL21(DE3) и плазмидного вектора, которая продуцирует высокие выходы целевого белка. Индукция синтеза интерлейкина-7 в приведенном продуценте может производиться с по-

мощью ферментации на среде для аутоиндукции, что дает возможность высоких выходов целевого белка до 0,8 мг/мл. Основным недостатком использования *E. coli* является образование телец включения, требующих повторной укладки, что приводит к дополнительным потерям во время процедуры очистки. Кроме того, существует риск загрязнения полученного препарата компонентами клетки и генетическим материалом *E. coli*.

Эту проблему достаточно просто устранить с помощью постадийной процедуры очистки на катионообменных и анионообменных сорбентах.

Одной из основных проблем получения и соответствия и направлений для дальнейшего развития является подбор одной из существующих или разработка новой методики концентрирования рекомбинантного ИЛ-7 человека, так как во избежание риска агрегации белка все процедуры очистки необходимо проводить при низких концентрациях рЧИЛ-7.

Так как многие биотехнологические компании в мире уже долгое время проводят исследования по созданию препаратов на основе рЧИЛ-7, существует много публикаций о проведении клинических испытаний препаратов на основе этого цитокина, то одним из основных направлений дальнейших исследований должно быть создание качественного конкурентоспособного лекарственного средства и новых аспектов его применения.

Литература

1. B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors / A. E. Namen [et al.] // J. Exp. Med. 1988. Vol. 167. P. 988–1002.
2. Goodwin R. G., Lupton S., Schmierer A. Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells // A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. Vol. 86. P. 302–306.
3. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7 / A. E. Namen [et al.] // Nature. 1988. Vol. 333. P. 571–573.
4. Recombinant interleukin-7 supports the growth of normal B lymphocyte precursors / G. Lee [et al.] // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1988. Vol. 141. P. 16–18.
5. Takeda S., Gillis S., Palacios R. *In vitro* effects of recombinant interleukin-7 on growth and differentiation of bone marrow pro-B-and pro-T-lymphocyte clones and fetal thymocyte clones // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. Vol. 86. P. 1634–1638.
6. IL-7 is a growth and maintenance factor for mature and immature thymocyte subsets / R. Murray [et al.] // Int. Immunol. 1989. Vol. 1. P. 526–531.
7. Chantry D., Turner M., Feldmann M. Interleukin 7 (murine pre-B cell growth factor/lymphopoietin 1) stimulates thymocyte growth: regulation by transforming growth factor beta // Eur. J. Immunol. 1989. P. 783–786.
8. Sutherland G. R., Baker E., Fernandez K. E. The gene for human interleukin-7 (IL-7) is at 8q12–13 // Hum. Genet. 1989. P. 371–372.
9. Peschon J. J., Morrissey P. J., Grabstein K. H. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin-7 receptor-deficient mice // J. Exp. Med. 1994. P. 1955–1960.
10. Vudattu N. K. Expression analysis and functional activity of interleukin-7 splice variants // Genes and Immunity. 2009. Vol. 10. P. 132–140.
11. Fry, T. J., Connick E., Falloon J. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis // Blood. 2001. P. 2983–2990.

12. Structural and Biophysical Studies of the Human IL-7/IL-7Ra Complex / A. Craig [et al.] // Structure. 2009. Vol. 17. P. 54–65.
13. Prediction of the three-dimensional structure of human interleukin-7 by homology modeling / Romano T. Kroemer [et al.] // Protein Engineering. 1996. Vol. 9, no. 6. P. 493–498.
14. Morre M. C., Assouline B., Cortez P., Gregoire A. IL-7 Drug substance, composition, preparation and uses: pat. no. US 7585947B2; filed 06.08.2003, issued 08.09.2009.
15. Becker G. W., Hsiung H. M., Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli* Purification and characterization // Febs Letters. 1986. Vol. 204, no. 1. P. 145–150.
16. Sorensen H. P., Mortensen K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli* // J. of Biotechnology. 2005. P. 113–128.
17. Sivashanmugam A. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli* // Protein Science. 2009. Vol. 18. P. 936–948.
18. Chang C. Y., Cohen S. N. Construction and Characterization of Amplifiable Multicopy DNA Cloning Vehicles Derived from the P15A Cryptic Miniplasmid // J. of Bacteriology. 1978. P. 1141–1156.
19. Kamionka M. Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli* / Cur. Pharm. Biotechnology. 2011. Vol. 12. P. 268–274.
20. Nonviral Production of Human Interleukin-7 in Spodoptera Frugiperda Insect Cells as a Soluble Recombinant Protein / M. Mirzaei [et al.] // J. of Biomed. and Biotechnology. 2009. P. 1–8.
21. Expression and Production of Human Interleukin-7 in Insect Cells Using Baculovirus Expression Vector System (BEVS) / M. Mirzaei [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. 2008. P. 93–103.
22. Expression, purification, and functional characterization of recombinant human interleukin-7 / Y. Luo [et al.] // Protein Expr. and Purif. 2009. Vol. 63. P. 1–4.
23. Production and purification of refolded recombinant human IL-7 from inclusion bodies / T. Ouellette [et al.] // Protein Expr. and Purif. 2003. Vol. 30. P. 156–166.
24. A comparison of inoculation methods to simplify recombinant protein expression screening in *Escherichia coli* / D. Busso [et al.] // BioTechniques. 2008. P. 101–106.
25. Gopal G. J., Kumar A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli* // Springer Science + Business Media. New York. 2013.
26. Studier F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures // Protein Expr. Purif. 2005. Vol. 41, no. 1. P. 207–234.
27. Makrides S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. // Microbiol. Rev. 1996. Vol. 60. P. 512–538.
28. Sanchez de Groot N., Ventura S. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies // Febs Let. 2006. P. 6471–6476.
29. Thapa A. Purification of inclusion body-forming peptides and proteins in soluble form by fusion to *Escherichia coli* thermostable proteins // BioTechniques. 2008. Vol. 44. P. 787–796.
30. Глик, Б., Пастернак Д. Молекулярная биотехнология. Принципы и применения. М.: Мир, 2002. 589 с.
31. Гильчук П. В. Оценка методов ренатурации для промышленного получения рекомбинантных белков из телец включения *Escherichia coli* в биологически активной форме // Биополимеры и клетка. 2004. Т. 20, № 3. С. 182–191.
32. Martineau P., Jones P., Winter G. Expression of an antibody fragment at high-levels in bacterial cytoplasm // J. Mol. Biol. 1998. Vol. 280. P. 117–127.
33. Eiberle M. K., Jungbauer A. Technical Refolding of Proteins, Do we have Freedom to Operate? // Biotech. Journal. 2010. Vol. 5. Issue 6. P. 547–559.
34. Bernardez C. Protein refolding for industrial processes // Curr. Opin. Biotech. 2001. Vol. 12. P. 202–207.
35. Cabrita L. D., Bottomley S. P. Protein expression and refolding – A practical guide to getting the most out of inclusion bodies // Biotechnol. Annu. Rev. 2004. Vol. 10. P. 31–50.
36. Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation / B. M. Baynes [et al.] // Biochemistry. 2005. Vol. 44. P. 4919–4925.

References

1. Namen A. E., Schmierer A. E., March C. J., Overelli R. W., Park L. S., Urdal D. L., Mochizuki D. Y. B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors. *Journal of Experimental Medicine*, 1988, vol. 167, pp. 988–1002.
2. Goodwin R. G., Lupton S., Schmierer A. E., Hjerrild K. J., Jerzy R., Clevenger W., Gillis S., Cosman D., Namen A. E. Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and

murine B-lineage cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, vol. 86, pp. 302–306.

3. Namen A. E., Lupton S., Hjerrild K. J., Wignall J., Mochizuki D. Y., Schmierer A. E., Mosley B., March C. J., Urdal D. L., Gillis S., Cossman D., Goodwin, R. G. Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Letters to Nature*, 1988, vol. 333, pp. 571–573.

4. Lee G., Namen A. E., Gillis S., Kincade P. W. Recombinant interleukin-7 supports the growth of normal B lymphocyte precursors. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1988, vol. 141, pp. 16–18.

5. Takeda S., Gillis S., Palacios R. *In vitro* effects of recombinant interleukin-7 on growth and differentiation of bone marrow pro-B- and pro-T-lymphocyte clones and fetal thymocyte clones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, vol. 86, pp. 1634–1638.

6. Murray R., Suda T., Wrighton N., Lee F., Zlotnik A. IL-7 is a growth and maintenance factor for mature and immature thymocyte subsets. *International Immunology*, 1989, vol. 1, pp. 526–531.

7. Chantry D., Turner M., Feldmann M. Interleukin 7 (murine pre-B cell growth factor/lymphopoietin 1) stimulates thymocyte growth: regulation by transforming growth factor beta. *European Journal of Immunology*, 1989, pp. 783–786.

8. Sutherland G. R., Baker E., Fernandez K. E. The gene for human interleukin-7 (IL-7) is at 8q12–13. *Journal of Human Genetics*, 1989, pp. 371–372.

9. Peschon J. J., Morrissey P. J., Grabstein K. H. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Journal of Experimental Medicine*, 1994, pp. 1955–1960.

10. Vudattu N. K. Expression analysis and functional activity of interleukin-7 splice variants. *Genes and Immunity Journal*, 2009, vol. 10, pp. 132–140.

11. Fry T. J., Connick E., Falloon J. A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis. *Blood Journal*, 2001, pp. 2983–2990.

12. Craig A., Julie A., Scott T.R. Structural and Biophysical Studies of the Human IL-7/IL-7Ra Complex. *Structure*, 2009, vol. 17, pp. 54–65.

13. Kroemer R. T., Doughty S. W., Robinson A. J., Richards W. G. Prediction of the three-dimensional structure of human interleukin-7 by homology modeling. *Protein Engineering*, 1996, vol. 9, no. 6, pp. 493–498.

14. Morre M. C., Assouline B., Cortez P., Gregoire A., IL-7 Drug substance, composition, preparation and uses. Pat. US, no. 7585947B2; filed 06.08.2003; issued 08.09.2009.

15. Becker G. W., Hsiung H. M. Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli* Purification and characterization. *FEBS Letters*, 1986, vol. 204, no. 1, pp. 145–150.

16. Sorensen H. P., Mortensen K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 2005, pp. 113–128.

17. Sivashanmugam A. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Science*, 2009, vol. 18, pp. 936–948.

18. Chang C. Y., Cohen S. N. Construction and Characterization of Amplifiable Multicopy DNA Cloning Vehicles Derived from the P15A Cryptic Miniplasmid. *Journal of Bacteriology*, 1978, pp. 1141–1156

19. Kamionka M. Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli*. *Cur. Pharm. Biotechnology*, 2011, vol. 12, pp. 268–274.

20. Mirzaei M., Xu Y., Elias S. B., Prakash S. Nonviral Production of Human Interleukin-7 in Spodoptera Frugiperda Insect Cells as a Soluble Recombinant Protein. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, pp. 1–8.

21. Mirzaei M., Xu Y., Elias S. B., Prakash S. Expression and Production of Human Interleukin-7 in Insect Cells Using Baculovirus Expression Vector System (BEVS). *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2008, pp. 93–103.

22. Luo Y., Kong X., Xu A., Jin S., Wua D. Expression, purification, and functional characterization of recombinant human interleukin-7. *Protein Expression and Purification*, 2009, vol. 63, pp. 1–4.

23. Ouellette T., Destrau, S. Ouellette T., Zhu J., Roach J. M., Coffman D. J., Hecht T., Lynch J. E., Giardina S. L. Production and purification of refolded recombinant human IL-7 from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 2003, vol. 30, pp. 156–166.

24. Busso D., Stierlé M., Thierry J.C., Moras D. A comparison of inoculation methods to simplify recombinant protein expression screening in *Escherichia coli*. *BioTechniques*, 2008, pp. 101–106.

25. Gopal G. J., Kumar A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. *Springer Science + Business Media*, New York, 2013.

26. Studier F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 2005, vol. 41, no. 1, pp. 207–234.

27. Makrides S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.*, 1996, vol. 60, pp. 512–538.

28. Sanchez de Groot N., Ventura S. Effect of temperature on protein quality in bacterial inclusion bodies. *Febs Let*, 2006, pp. 6471–6476.
29. Thapa A. Purification of inclusion body-forming peptides and proteins in soluble form by fusion to *Escherichia coli* thermostable proteins. *BioTechniques*, 2008, vol. 44, pp. 787–796.
30. Glick B. R., Pasternak J. J. *Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA. Second Edition*. Department of Biology, University of Waterloo Waterloo, Ontario, Canada (Russ. ed.: Glik B., Pasternak D. *Molekulyarnaya biotekhnologiya. Printsipy i primeneniya*. Moscow, Mir Publ, 2002, 589 p.).
31. Gil'chuk P. V. Evaluation of renaturation methods for industrial obtaining of recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies in biologically active form. *Biopolymery i Ketka*, 2004, vol. 20, no. 3, pp. 182–191 (in Russian).
32. Martineau P., Jones P., Winter G. Expression of an antibody fragment at high-levels in bacterial cytoplasm. *J. Mol. Biol*, 1998, vol. 280, pp. 117–127.
33. Eiberle M. K., Jungbauer A. Technical Refolding of Proteins, Do we have Freedom to Operate? *Biotech. Journal*, 2010, vol. 5, issue 6, pp. 547–559.
34. Bernardez C. Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotech*, 2001, vol. 12, pp. 202–207.
35. Cabrita L. D., Bottomley S. P. Protein expression and refolding – A practical guide to getting the most out of inclusion bodies. *Biotechnol. Annu. Rev*, 2004, vol. 10, pp. 31–50.
36. Baynes B. M., Wang D. I., Trout B. L. Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry*, 2005, vol. 44, pp. 4919–4925.

Информация об авторах

Луценко Татьяна Николаевна – биотехнолог отдела регуляторных отношений, менеджмента качества и научных разработок. ООО «УНИВЕРСАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО «ПРО-ФАРМА» (03680, г. Киев, ул. Казацкая, 120/4, корпус «Ж», Украина). E-mail: biotech@pro-pharma.com.ua

Галкин Александр Юрьевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры промышленной биотехнологии. Киевский политехнический институт (03056, г. Киев, пр. Победы, 37, 4 корпус, Украина). E-mail: alexfbt@mail.ua

Information about the authors

Lutsenko Tatyana Nikolayevna – biotechnology of regulatory affairs, managment of the quality and scientific developments departments. ООО “Universal agency “Pro-Pharma”. E-mail: biotech@pro-pharma.com.ua

Galkin Aleksandr Yur'yevich – Ph. D. Biology, associate professor, Department of Industrial Biotechnology. National Technical University of Ukraine “Kiev Polytechnic Institute” (building 4, 34, Pobyedy Ave., 03056, Kyiv, Ukraine). E-mail: alexfbt@mail.ua

Поступила 21.11.14