

УДК 578.245:57.083.1:579.243:519.24

# ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ОЧИЩЕННОЙ СУБСТАНЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО АЛЬФА-2В ИНТЕРФЕРОНА ЧЕЛОВЕКА ИЗ ФРАКЦИИ РАСТВОРИМОГО ПРОТЕИНА, ЭКСПРЕССИРУЕМОГО В БАКТЕРИЯХ *Escherichia coli*

Л. Н. Коршун<sup>1</sup>  
И. В. Орловская<sup>1</sup>  
Л. Н. Мойса<sup>1</sup>  
М. И. Вудмаска<sup>1</sup>  
А. И. Мельник<sup>1</sup>  
А. Ю. Горлов<sup>1</sup>  
С. В. Михалач<sup>1</sup>  
Н. Я. Спивак<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ЧАО НПК «Диапроф-Мед», Киев

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии  
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

E-mail: KL2004@ukr.net

Получено 17.10.2011

Полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о важной контрольно-регуляторной функции интерферонов в сохранении гомеостаза, о наличии прямых и обратных связей между интерферонами, иммунной и нейроэндокринной системами, которые в совокупности составляют основу биологической защиты организма.

Применение интерферона в терапии ряда заболеваний базируется главным образом на его антивирусных, антипролиферативных, иммуномодулирующих и радиопротекторных свойствах. Однако широкое внедрение этих препаратов, получаемых из лейкоцитов периферической крови доноров, ограничивается их высокой стоимостью и дефицитом биологически безопасного сырья. Важным достижением в области изучения биологических свойств лейкоцитарного интерферона человека было определение его аминокислотной последовательности, что с помощью ДНК-технологий позволило получить первые искусственные аналоги, пригодные для применения в клинической практике.

В современном биотехнологическом производстве рекомбинантных протеинов используют клетки различных микроорганизмов. Цель работы заключалась в подборе оптимальных условий индукции биосинтеза растворимой формы альфа-2b интерферона человека в клетках бактерий *Escherichia coli* и разработке эффективной технологии получения очищенной субстанции, пригодной для изготовления препаратов интерферона терапевтического назначения.

В ходе исследований применяли плазмидный вектор pET32a, содержащий вставку гена, продуктом экспрессии которого в клетках *E. coli* штамма *Origami(DE3)* был рекомбинантный аналог природного лейкоцитарного альфа-2b интерферона человека. Подобраны оптимальные параметры культивирования продуцента для максимального выхода растворимой формы заданного протеина.

Разработана трехступенчатая схема хроматографической очистки альфа-2b интерферона, включающая катионо- и анионообменную хроматографию с применением сорбентов: CM-toyorearl и DEAE-toyorearl, а также гель-фильтрацию. При этом степень очистки полученной субстанции альфа-2b интерферона составляла 96–98%, а выход протеина — 2,31 мг в расчете на 1 л питательной среды.

**Ключевые слова:** рекомбинантный альфа-2b интерферон человека, бактерии *Escherichia coli*, культивирование продуцентов, хроматографическая очистка протеинов.

Интерфероны (ИФН) представляют группу биологически активных протеинов или гликопротеинов, синтезируемых иммунокомпетентными клетками в ответ на вирусную инфекцию, при антигенном или митогенном воздействии [1]. Полученные к настоящему времени научные данные свидетельствуют о важной контрольно-регуляторной функции ИФН в сохранении гомеостаза, о наличии

прямых и обратных связей между системами ИФН, иммунной и нейроэндокринной системами, которые в целом составляют основу биологической защиты организма [2].

Применение интерферона в терапии ряда заболеваний основывается главным образом на его антивирусных, антипролиферативных, иммуномодулирующих и радиопротекторных свойствах [3]. Однако широкое внед-

рение этих препаратов, полученных из лейкоцитов периферической крови доноров, ограничивается их высокой стоимостью и дефицитом биологически безопасного сырья [2]. Важным достижением в области изучения биологических свойств лейкоцитарного интерферона человека стало определение его аминокислотной последовательности, что с помощью ДНК-технологий позволило получить первые искусственные аналоги, пригодные для применения в клинической практике.

Одним из направлений в биотехнологическом производстве рекомбинантных протеинов является использование экспрессирующих систем клеток различных микроорганизмов. Современные молекулярно-генетические подходы позволяют разрабатывать наиболее оптимальные варианты структурного гена и его регуляторных элементов. При этом у некоторых штаммов-продуцентов уровень биосинтеза целевого продукта может составлять десятки процентов от общего количества протеинов. Следует отметить, что в процессе микробного синтеза чужеродных протеинов важное значение имеет не только достаточный выход, но и сохранение структурно-функциональных характеристик этих полипептидов [4].

Известно, что при высоком уровне экспрессии клонируемых генов их продукты могут накапливаться в клетках микроорганизмов в виде нерастворимых агрегатов, так называемых телец включений, в которых рекомбинантный протеин находится в инактивированном состоянии. Это весьма усложняет процесс получения целевого протеина в биологически активной форме, поскольку возникает необходимость применять специальные физико-химические методы рефолдирования [5]. Для решения проблем, связанных с накоплением рекомбинантных протеинов в нерастворимом виде, наряду с оптимизацией методов их выделения и очистки из телец включений разрабатываются стратегии, обеспечивающие биосинтез таких протеинов в функционально активной растворимой форме.

Цель нашей работы заключалась в подборе оптимальных условий индукции синтеза растворимой формы альфа-2b ИФН человека в клетках бактерий *Escherichia coli* с последующей разработкой эффективной технологии получения очищенной субстанции, пригодной для изготовления препаратов ИФН терапевтического назначения.

## Материалы и методы

*Бактериальные штаммы, плазмиды и условия культивирования*

Штамм *Escherichia coli* pMC-IFN $\alpha$ 2b/*Origami*(DE3) был создан на основе протеин-экспрессирующей системы реципиента *E. coli Origami*(DE3) [*E. coli*  $\Delta$ ara-leu7697  $\Delta$ lacX74  $\Delta$ phoAPvuII *pho R araD139 ahpC galK rpsL F<sup>-</sup> [lac<sup>+</sup> (lacI<sup>q</sup>)pro] gor522:: Tn10 (Tc<sup>R</sup>) trxB::kan(DE3)*] путем трансформации бактериальных клеток плазмидным вектором pET32a (Novagen) с клонированной полноразмерной последовательностью гена альфа-2b ИФН человека. В этой конструкции продуцента биосинтез целевого протеина находится под транскрипционным контролем промотора фага T7 и индуцируется с помощью изопропил- $\beta$ -тиогалактопиранозид (ИПТГ).

Приготовление компетентных клеток *E. coli Origami*(DE3) и их трансформацию рекомбинантной плазмидой проводили согласно стандартным протоколам [6]. Смесь бактериальных клеток высевали на агаризованную среду LB (1% бактотриптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl, 1,5% агара «Дифко», pH 7,2), содержащую антибиотики: 100 мкг/мл ампициллина, 25 мкг/мл канамицина и 12,5 мкг/мл тетрациклина. Для отбора наиболее продуктивного клона образцы биомасс анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях в 15% ПААГ в присутствии 1% SDS с последующим окрашиванием геля раствором Ку-масси R-250 по методу Лэммли [7]. Содержание целевого протеина в бактериальных клетках оценивали денситометрией электрофорезных гелей с использованием программного обеспечения TotalLab (Nonlinear Dynamics LTD, США).

Ночную культуру в объеме 25 мл, выращенную на среде LB (1% бактотриптона, 0,5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl, pH 7,2) при 30 °C в присутствии 100 мкг/мл ампициллина, 25 мкг/мл канамицина и 12,5 мкг/мл тетрациклина пересевали в колбы, содержащие 2 л среды LB или ТВ (1,2% бактотриптона, 2,4% дрожжевого экстракта, 55 мМ глицерола, 17 мМ КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 72 мМ К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>, pH 7,2) с добавлением соответствующих антибиотиков. Дальнейшую инкубацию проводили при 37 °C в условиях непрерывного перемешивания (180 об/мин) и аэрации, контролируя рост бактерий путем измерения оптической плотности культуры (ОП) при длине волны 600 нм. При достижении ОП бактерий значения ОП<sub>600</sub> = 0,8 о. е. в питательную среду добавляли ИПТГ в конечной концентрации

0,1 мМ, 0,25 мМ, 0,5 мМ или 1 мМ. Дальнейшее культивирование продолжали в течение 3,5–4 ч в этих же условиях. После завершения культивирования клеточную биомассу осаждали центрифугированием при 4 000 g в течение 15 мин.

*Математическое моделирование кривых роста бактериальной популяции*

Экспериментальные кривые роста аппроксимировали с помощью логистической функции Ферхюльста [8]:

$$x = \frac{A - C}{1 + 10^{a + bt}} + C, \quad (1)$$

где  $x$  — оптическая плотность бактерий, ОП<sub>600</sub>;  $t$  — время роста культуры, ч;  $A$  — верхняя асимптота функции (максимальное значение ОП<sub>600</sub>);  $C$  — нижний предел, с которого начинается рост функции (начальное значение ОП<sub>600</sub>);  $a$  и  $b$  — кинетические параметры, определяющие наклон, точку перегиба и форму логистической кривой.

Расчет кинетических показателей  $a$  и  $b$ , а также вычисление абсолютной ( $dx/dt$ ) и удельной ( $\mu$ ) скоростей роста бактериальной культуры производили согласно ранее опубликованной методике [9]. Достоверность результатов оценивали в соответствии с общепринятыми статистическими подходами с вычислением  $t$ -критерия Стьюдента, а адекватность математической модели определяли на основе критерия Фишера ( $F$ -тест) с использованием методов регрессионного и дисперсионного анализов [10].

*Хроматографическая очистка рекомбинантных протеинов*

Для очистки рекомбинантного протеина осадок бактериальных клеток ресуспендировали в лизирующем буфере, содержащем 50 мМ трис-цитрата, 10 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 0,1% Triton X-100, 1 мМ ФМСФ, 0,04 мг/мл лизоцима, рН 8,0. Клеточную суспензию трижды замораживали-оттаивали, а затем добавляли ДНК-азу (Sigma, США) в конечной концентрации 6 ед/мл в присутствии 20 мМ MgSO<sub>4</sub>. Надосадочную жидкость осветляли центрифугированием при 11 000 g в течение 25 мин при температуре 10 °С.

Хроматографическую очистку целевого протеина осуществляли с помощью хроматографической системы Bio-Rad (США), применяя катионо- и анионообменные сорбенты: CM- и DEAE-тоуорpearl 650-С, соответственно (TOSOH Co, Япония). Гель-фильтрацию проводили методом колоночной хроматографии на носителе TSK-гель Тоуорpearl HW-50 (ТоуоSoda, Япония). Концентрацию протеина измеряли биуретовым методом.

Количественное содержание протеинов в отдельных фракциях оценивали денситометрией полученных электрофореграмм с использованием программного обеспечения TotalLab.

## Результаты и обсуждение

Человеческий альфа-2b ИФН представляет собой протеин с молекулярной массой 19,4 кДа, состоящий из 166 аминокислотных остатков. Его молекула содержит четыре остатка цистеина и формирует две дисульфидные связи (Cys-1 — Cys-98 и Cys-29 — Cys-138), последняя из которых играет важную роль в проявлении антивирусной активности [11]. Эта особенность структуры молекулы обуславливает сложность при получении функционально активных форм интерферона в случае накопления целевого протеина в цитоплазме клеток в виде телец включений. Поэтому наша задача состояла в получении растворимой формы рекомбинантного протеина, которая в большей степени сохраняет биологическую активность ИФН.

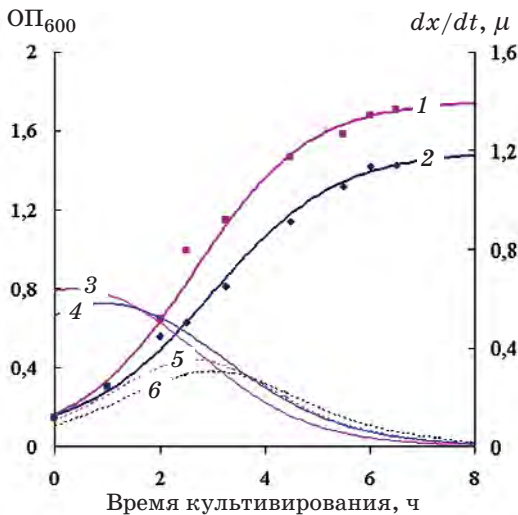
Существует ряд биотехнологических подходов, используемых для получения целевых протеинов в растворимом виде: применение соответствующего штамма-реципиента [12], экспрессирующих векторов, позволяющих получать слитные гибридные полипептиды с аффинными тагами, значительно повышающими растворимость заданных продуктов [13], оптимизация состава питательных сред [14], снижение температуры культивирования [15] и определение концентрации химического индуктора для биосинтеза [16].

В наших исследованиях выбор штамма-хозяина *E. coli Origami(DE3)* для экспрессии рекомбинантного протеина альфа-2b ИФН был обусловлен тем, что в бактериальной хромосоме присутствуют мутации по генам двух энзимов — тиоредоксинредуктазы (*trxB*) и глутатионредуктазы (*gor*), что значительно повышает вероятность образования дисульфидных связей в цитоплазме клетки и способствует правильной сборке чужеродного протеина [17, 18].

На первом этапе работы были получены плазмидосодержащие трансформанты и проведен их скрининг с целью отбора наиболее продуктивного клона. В дальнейшем они были проверены на плазмидную стабильность и величину уровня экспрессии в процессе нескольких пассажей культуры.

В ходе изучения динамики роста продуцента *E. coli pMC-IFN $\alpha$ 2b/Origami(DE3)*

в зависимости от состава питательной среды (LB или ТВ) было установлено, что экспериментальные кривые (рис. 1) имели характерную для роста микроорганизмов S-образную (сигмоидную) форму. Для их аппроксимации использовали логистическую функцию Ферхюльста (1).



**Рис. 1. Кривые роста штамма *E. coli* pMC-IFNα2b/Origami(DE3) — продуцента рекомбинантного альфа-2b ИФН в зависимости от типа питательной среды.**

На основной оси ординат (слева) — значение оптической плотности культуры ОП<sub>600</sub> (жирные сплошные линии 1 — на среде ТВ и 2 — на среде LB); на вспомогательной оси (справа) — показатели удельной  $\mu$  — тонкие сплошные линии 3 и 4 и абсолютной скорости роста  $dx/dt$  — пунктирные линии 5 и 6 для питательных сред ТВ и LB, соответственно.

Экспериментальные данные (точки) аппроксимированы по модели логистической функции Ферхюльста (1):

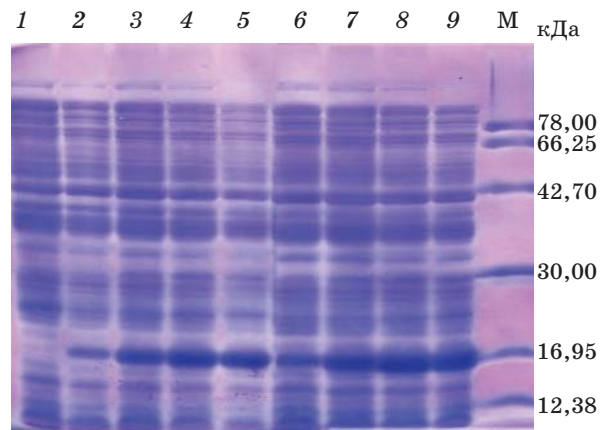
$$x = \frac{A - C}{1 + 10^{\alpha + \beta \cdot t}} + C,$$

где  $C$  и  $A$  — нижняя и верхняя асимптоты функции, соответственно;  $\alpha$  и  $\beta$  — показатели, определяющие поведение функции. Значение кинетических параметров для кривых: 1 —  $A = 1,55$ ,  $C = 0,05$ ,  $\alpha = 1,74$ ,  $\beta = -0,57$ ; 2 —  $A = 1,75$ ,  $C = 0,05$ ,  $\alpha = 1,67$ ,  $\beta = -0,50$ .

Применение метода математического моделирования для описания динамики роста продуцента в цикле периодического культивирования дало возможность определить кинетические показатели, характеризующие физиологическое состояние клеток в зависимости от типа питательной среды. Так, при выращивании бактерий на среде ТВ их рост

характеризовался более коротким подготовительным периодом, включающим лаг-фазу и фазу ускорения роста (2,08 ч), в то время как длительность этого периода на среде LB составляла 2,41 ч. Значение величины максимальной удельной скорости роста ( $\mu_{max}$ ) при культивировании на питательной среде ТВ, составляющее  $0,35 \text{ ч}^{-1}$ , было выше относительно более бедной среды LB, где оно равнялось  $0,30 \text{ ч}^{-1}$ . Интервал значений оптической плотности культуры ОП<sub>600</sub> = 0,60–0,82 о. е. для питательной среды LB и ОП<sub>600</sub> = 0,67–0,87 о. е. для среды ТВ соответствовал экспоненциальной фазе роста микробной популяции, т. е. наиболее благоприятному периоду для индукции механизма биосинтеза целевого продукта. Поэтому на этой фазе роста бактериальных клеток (ОП<sub>600</sub> = 0,80 о. е.) в питательную среду вносили индуктор ИПТГ.

Из электрофореграммы, отражающей динамику биосинтеза целевого протеина, следует, что максимальное накопление альфа-2b ИФН в клетках *E. coli* штамма *Origami(DE3)* наблюдалось через 4 ч после внесения ИПТГ независимо от типа питательной среды (рис. 2). При этом удельное содержание рекомбинантного протеина в клетках продуцента было примерно одинаковым и составляло 18,07% и 20,55% для питательных сред LB и ТВ, соответственно.

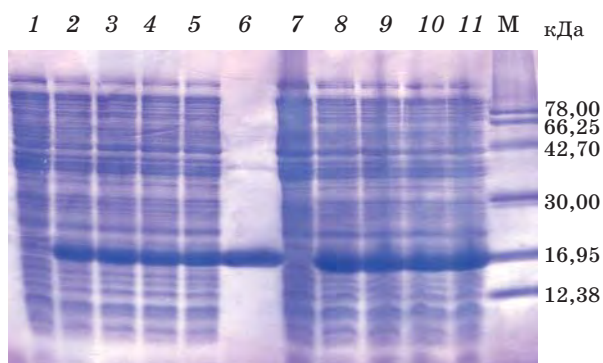


**Рис. 2. Электрофореграмма динамики биосинтеза рекомбинантного аналога лейкоцитарного альфа-2b ИФН в клетках продуцента *E. coli* pMC-IFNα2b/Origami(DE3) в зависимости от типа питательной среды:**

LB (треки 2–5) и ТВ (6–9) в течение 1 ч (2 и 6), 2 ч (3 и 7), 3 ч (4 и 8) и 4 ч культивирования (5 и 9); 1 — лизат клеток штамма-продуцента без добавления индуктора; M — маркеры молекулярных масс (Merck, Германия).

Как уже отмечалось выше, существует ряд факторов, влияющих на эффективность экспрессии рекомбинантных протеинов.

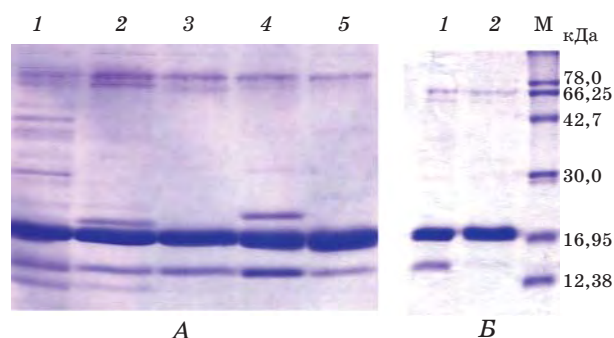
Для обработки оптимальных условий биосинтеза альфа-2b ИФН культивирование продуцента проводили в присутствии различных концентраций ИПТГ в течение 4 ч при температуре 37 °С с последующим определением содержания протеина в лизированных образцах биомасс. Как следует из рис. 3, концентрация ИПТГ в исследуемом диапазоне (0,1 мМ, 0,25 мМ, 0,5 мМ и 1 мМ) не оказывала влияния на удельный выход целевого протеина в клетке и не зависела от типа питательной среды.



**Рис. 3. Накопление рекомбинантного альфа-2b ИФН в бактериальных клетках в зависимости от концентрации индуктора ИПТГ в питательных средах LB (треки 2–5) и ТВ (треки 8–11):** 0,1 мМ (2 и 8), 0,25 мМ (3 и 9), 0,5 мМ (4 и 10), 1 мМ (5 и 11); 1 и 7 — лизаты клеток штамма-продуцента при отсутствии ИПТГ в питательных средах LB и ТВ, соответственно; 6 — хроматографически очищенный рекомбинантный альфа-2b ИФН, M — маркеры молекулярных масс (Merck, Германия)

На начальном этапе очистки рекомбинантного альфа-2b ИФН был использован метод ионообменной хроматографии с применением катионо- и анионообменных сорбентов: CM-toyorearl и DEAE-toyorearl, соответственно. Элюцию целевого продукта с колонки, содержащей носитель CM-toyorearl, осуществляли ступенчатым способом с применением различной концентрации хлорида натрия (от 50 мМ до 400 мМ). Электрофоретический анализ образцов протеиновых фракций, полученных в ходе хроматографической очистки альфа-2b ИФН на катионообменном сорбенте, представлен на рис. 4, А, где хорошо видно, что чужеродный протеин в бактериальных клетках накапливается в растворимом виде и присутствует в супернатанте после лизиса биомассы.

Предварительно очищенную на CM-toyorearl протеиновую фракцию диализовали против буфера, содержащего 20 мМ трис-



**Рис. 4. А — Электрофореграмма протеиновых фракций, полученных в процессе очистки рекомбинантного альфа-2b ИФН с использованием катионообменного сорбента CM-toyorearl:** 1 — супернатант после лизиса биомассы; 2 — протеины, не связавшиеся с носителем; 3–5 — хроматографические фракции протеина после элюции в присутствии различных концентраций NaCl.

**Б — Электрофоретический анализ образцов протеиновых фракций в ходе проведения гель-фильтрации на носителе HW-50:**

1 — исходный препарат; 2 — очищенная субстанция рекомбинантного альфа-2b ИФН; M — маркеры молекулярных масс (Merck, Германия)

HCl с pH 8,0. Полученный препарат альфа-2b ИФН наносили на колонку с носителем DEAE-toyorearl. Элюцию осуществляли так же, как при очистке на CM-toyorearl. На заключительном этапе очистки применяли метод гель-фильтрации, основанный на фракционировании исходной смеси молекул альфа-2b ИФН в зависимости от их размеров. Этот метод очистки позволяет отделить мономерные молекулы от димерных и более крупных примесей. Гель-фильтрацию альфа-2b ИФН проводили с использованием носителя TSK-гель «Toyorearl» HW-50. Электрофореграмма очищенного целевого продукта представлена на рис. 4, Б. Степень чистоты полученного препарата составила 96–98% по данным денситометрического анализа с использованием программного обеспечения TotalLab.

Из данных, представленных в таблице, следует, что подобранные условия культивирования продуцента *E. coli pMC-IFN $\alpha$ 2b/ Origami(DE3)* с использованием среды ТВ достаточно эффективны. Так, на среде LB общее количество биомассы было 1,75 г, а на среде ТВ — в 1,65 раза выше и составляло 2,88 г в пересчете на 1 л питательной среды. При этом выход очищенного альфа-2b ИФН на среде ТВ практически в 2 раза превышал его выход на питательной среде LB и составлял 0,8 мг с 1 г биомассы, или 2,31 мг целевого протеина в пересчете на 1 литр питательной среды.

Таблиця. Общий выход биомассы и хроматографически очищенного альфа-2b ИФН в зависимости от состава питательной среды, используемой для культивирования продуцента *E. coli* pMC-IFN $\alpha$ 2b/*Origami*(DE3)

| Тип питательной среды | Общий выход биомассы, г/л | Выход очищенного протеина           |       |                                     |      |                 |      |
|-----------------------|---------------------------|-------------------------------------|-------|-------------------------------------|------|-----------------|------|
|                       |                           | 1-й этап хроматографической очистки |       | 2-й этап хроматографической очистки |      | Гель-фильтрация |      |
|                       |                           | мг/г                                | мг/л  | мг/г                                | мг/л | мг/г            | мг/л |
| LB                    | 1,75                      | 9,34                                | 16,35 | 1,12                                | 1,96 | 0,67            | 1,17 |
| TB                    | 2,88                      | 10,95                               | 31,54 | 1,34                                | 3,86 | 0,80            | 2,31 |

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы о преимуществах использования более богатых питательных сред [19]. Среда ТВ содержит большее количество дрожжевого экстракта в качестве источника углерода и азота, чем питательная среда LB [20]. Кроме того, по мнению некоторых авторов, в среде ТВ присутствуют редкие элементы, снижающие клеточный стресс в ответ на образование протеаз в процессе синтеза рекомбинантных протеинов [21]. Фосфатные соли, входящие в состав этой среды, также необходимы для достижения высокой оптической плотности клеток, поскольку обеспечивают оптимальную емкость буфера и поддерживают постоянное значение pH среды в процессе культивирования [22]. Кроме того, присутствие глицерола в составе среды ТВ можно рассматривать как дополнительный фактор, способствующий накоплению рекомбинантных протеинов в растворимом виде [23].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Шабалина Н. В., Длин В. В., Малиновская В. В. и др. Интерфероновая система человека: биологическая роль и взаимосвязь с иммунной системой // Рос. вестн. педиатр. — 1995. — № 5. — С. 29–35.
2. Белоцкий С. М., Спивак Н. Я. Интерфероны: биологические и клинические эффекты. — К.: Фитосоциоцентр, 2006. — 288 с.
3. Воронцова А. Л. Лаферобіон. Рекомбінантний альфа-2b інтерферон. Довідковий посібник з питань клінічного застосування. — К., 2006. — 24 с.
4. Гусарова В. Д., Миронов А. Ф. Выделение рекомбинантных белков из тел включения бактериальных продуцентов // Биофарм. журн. — 2010. — Т. 2, № 1. — С. 14–29.
5. Гильчук П. В. Оценка методов ренатурации для промышленного получения рекомбинантных белков из тел включения *Escherichia coli* в биологически активной форме // Біополімери і клітина. — 2004. — Т. 20, № 3. — С. 182–192.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 479 с.
7. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. — 1970. — V. 227. — P. 680–685.
8. Плохинский Н. А. Биометрия. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1970. — 367 с.
9. Мойса Л. Н., Чилияков В. А. Математическое моделирование кривых роста штамма *Escherichia coli* — продуцента рекомбинантного белка  $\beta$ -галактозидазы // Біополімери і клітина. — 2004. — Т. 20, № 6. — С. 524–529.
10. Ланач С. Н., Губенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — К.: Морион, 2002. — 407 с.
11. Rabhi-Essaffi I., Sadok A., Khalaf N., Fathallah D. A strategy for high-level expression of soluble and functional human interferon  $\alpha$  as a GST-fusion protein in *E. coli*

- // Prot. Eng. Design Select. — 2007. — V. 20, N 5. — P. 201–209.
12. Xiong Sh., Wang Y.-F., Ren X.-R. et al. Solubility of disulfide-bonded proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* and its «oxidizing» mutant // World J. Gastroenterol. — 2005. — V. 11, N 7. — P. 1077–1082.
  13. Esposito D., Chatterjee D. K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags // Cur. Opin. Biotechnol. — 2006. — V. 17, N 4. — P. 353–358.
  14. Broedel S. E., Papciak S. J., Jones W. R. The selection of optimum media formulations for improved expression of recombinant proteins in *E. coli* // Technic. Bulletin. — 2001. — V. 2. — P. 1–8.
  15. Zhang D., Wei P., Fan L., Lian J. High-level soluble expression of HIGF-1 fusion protein in recombinant *Escherichia coli* // Proc. Biochem. — 2010. — V. 45, N 9. — P. 1401–1405.
  16. Славченко И. Ю., Борейко Е. В., Воробей Н. В. Изучение влияния различных концентраций индуктора на выход альфа-2b интерферона человека в системе экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7 в клетках *Escherichia coli* // Біополімери і клітина. — 2003. — Т. 19, № 5. — С. 457–462.
  17. pET System Manual. — Novagen, 2003. — 68 p.
  18. Bessete P. H., Aslund F., Beckwith J., Georgiou G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1999. — V. 96, N 24. — P. 13703–13708.
  19. Khoo T. K., Santhanam A., Noordin R., Arifin N. Production of *Brugia malayi* BmSXP recombinant protein expressed in *Escherichia coli* // Malaysian J. Microbiol. — 2010. — V. 6, N 2. — P. 115–122.
  20. Manderson D., Dempster R., Chisti Y. A recombinant vaccine against hydatidosis: Production of the antigen in *Escherichia coli* // J. Indust. Microbiol. Biothechnol. — 2006. — V. 6, N 2. — P. 173–182.
  21. Lim H.-K., Jung K.-H., Park D. H., Chung S. I. Production characteristics of interferon- $\alpha$  using an L-arabinose promoter system in a higt-cell-density culture // Appl. Microbiol. Biothechnol. — 2000. — V. 53, N 2. — P. 201–208.
  22. Korz D. J., Rinas U., Hellmuth K. et al. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli* // J. Biothechnol. — 1995. — V. 39, N 1. — P. 59–65.
  23. Leandro P., Lechner M. C., Tavares de Almedia I., Konecki D. Glycerol increases the yield and activity of human phenyl-alanine hydroxylase mutant enzymes produced in a prokaryotic expression system // Mol. Genet. Metab. — 2001. — V. 73, N 2. — P. 173–178.

**ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ОТРИМАННЯ  
ОЧИЩЕНОЇ СУБСТАНЦІЇ  
РЕКОМБІНАНТНОГО АЛЬФА-2В  
ІНТЕРФЕРОНУ ЛЮДИНИ  
ІЗ ФРАКЦІЇ РОЗЧИННОГО ПРОТЕЇНУ,  
ЕКСПРЕСОВАНОГО У БАКТЕРІЯХ  
*Escherichia coli***

Л. М. Коршун<sup>1</sup>, І. В. Орловська<sup>1</sup>,  
Л. М. Мойса<sup>1</sup>, М. І. Вудмаска<sup>1</sup>,  
А. І. Мельник<sup>1</sup>, А. Ю. Горлов<sup>1</sup>,  
С. В. Міхалап<sup>1</sup>, М. Я. Співак<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ПрАТ НВК «Діапроф-Мед», Київ  
<sup>2</sup>Інститут мікробіології та вірусології  
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

E-mail: KL2004@ukr.net

Отримані на сьогодні дані свідчать про важливу контрольно-регуляторну функцію інтерферонів у збереженні гомеостазу, про наявність прямих і зворотних зв'язків між інтерферонами, імунною та нейроендокринною системами, що в сукупності становлять основу біологічного захисту організму.

**OPTIMIZATION OF CONDITIONS FOR  
PRODUCTION OF PURIFIED SUBSTANCE OF  
RECOMBINANT HUMAN ALPHA-2B  
INTERFERON FROM SOLUBLE PROTEIN  
FRACTIONS EXPRESSED  
IN *Escherichia coli* BACTERIA**

L. M. Korshun<sup>1</sup>, I. V. Orlovskaya<sup>1</sup>,  
L. M. Moysa<sup>1</sup>, M. I. Vudmaska<sup>1</sup>,  
A. I. Melnik<sup>1</sup>, A. Yu. Gorlov<sup>1</sup>,  
S. V. Mikhailap<sup>1</sup>, M. Ya. Spivak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>RPC JSC «Diaproph-Med», Kyiv  
<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and  
Virology of National Academy of Sciences of  
Ukraine, Kyiv

E-mail: KL2004@ukr.net

The scientific data received to the present time suggest about an important regulatory function of interferon in maintaining homeostasis, the presence of forward and backward connection between interferon, immune and neuroendocrinous systems, which generally form the basis of biological defense.

Застосування інтерферону в терапії низки захворювань ґрунтується переважно на його антивірусних, антипроліферативних, імуномодулюючих та радіопротекторних властивостях. Проте широке впровадження цих препаратів, отриманих із лейкоцитів периферичної крові донорів, обмежується їх високою вартістю та дефіцитом біологічно безпечної сировини. Важливим досягненням у галузі вивчення біологічних властивостей лейкоцитарного інтерферону людини було визначення його амінокислотної послідовності, що за допомогою ДНК-технологій дало змогу отримати перші штучні аналоги, придатні для застосування у клінічній практиці.

У сучасному біотехнологічному виробництві рекомбінантних протеїнів використовують клітини різноманітних мікроорганізмів. Мета роботи полягала в підборі оптимальних умов індукції біосинтезу розчинної форми альфа-2b інтерферону людини у клітинах бактерій *Escherichia coli* та розробленні ефективної технології отримання очищеної субстанції, придатної для виготовлення препаратів інтерферону терапевтичного призначення.

У ході досліджень використовували плазмідний вектор pET32a, що містив вставку гена, продуктом експресії якого у клітинах *E. coli* штаму *Origami(DE3)* був рекомбінантний аналог природного лейкоцитарного альфа-2b інтерферону людини. Підібрано оптимальні параметри культивування продуцента для максимального виходу розчинної форми заданого протеїну.

Розроблено триступеневу схему хроматографічного очищення альфа-2b інтерферону з використанням катіоно- та аніонообмінних сорбентів CM-toyopearl та DEAE-toyopearl, а також гель-фільтрацію. При цьому ступінь очищення отриманої субстанції альфа-2b інтерферону була 96–98%, а вихід очищеного протеїну становив 2,31 мг у перерахунку на 1 л живильного середовища.

**Ключові слова:** рекомбінантний альфа-2b інтерферон людини, бактерії *Escherichia coli*, культивування продуцентів, хроматографічне очищення протеїнів.

The use of interferon in the treatment of some diseases is based mainly on its antiviral, antiproliferative, immunomodulatory and radioprotective properties. However, the widespread introduction of these drugs, obtained from peripheral blood leukocytes of donors is limited by their high cost and lack of biologically safe materials. An important achievement in the study of the biological properties of human leukocyte interferon was the determination of its amino acid sequence. Using DNA technology has allowed to obtain the first artificial analogs of interferon suitable for use in clinical practice.

Cells of different microorganisms are widely used in modern biotechnological production of recombinant proteins. Purpose of the work was to select optimal conditions for induction of the biosynthesis of the soluble form of interferon alpha-2b human in *Escherichia coli* cells and development an effective technology for production of purified substance, suitable for preparations of interferon therapy appointment.

By using of a bacterial expression system based on plasmid vector pET32a in *Escherichia coli* strain *Origami (DE3)* cells a recombinant analogue of the natural leukocyte human interferon alfa-2b was obtained. The optimal cultivation conditions for the maximum yield of soluble forms of a target protein were chosen.

The three-step chromatographic purification scheme of recombinant alpha-2b interferon was developed, including cation- and anion-exchange chromatography with sorbents CM-toyopearl and DEAE-toyopearl, and gel filtration. The degree of purity of the obtained substance interferon alfa-2b was 96–98% and the yield of protein was 2.31 mg per 1 liter of medium.

**Key words:** recombinant human alpha-2b interferon, *Escherichia coli* bacteria, cultivation of strains, chromatographic purification of proteins.