

УДК 577.2

ПРЕПАРАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО ЦИКЛОФИЛИНА А ЧЕЛОВЕКА

© 2022 А.А. Калинина¹, А.В. Колесников², А.В. Козырь², Н.Л. Куликова³,
М.А. Замкова¹, Д.Б. Казанский¹, Л.М. Хромых^{1*}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения России, 115478 Москва, Россия; электронная почта: lkhromykh@list.ru

² Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», 142279 п. Оболensk, Московская обл., Россия

³ Открытое акционерное общество «Институт инженерной иммунологии», 142380 п. Любучаны, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 26.01.2022

После доработки 15.02.2022

Принята к публикации 15.02.2022

Данное исследование посвящено разработке метода получения препаративного количества рекомбинантного циклофилина А человека (рчЦФА) из *Escherichia coli*. С тотальной мРНК Т-клеточной лимфомы человека Jurkat методом ПЦР с обратной транскрипцией амплифицировали полноразмерную кДНК, кодирующую ген ЦФА человека (СУРА). Далее провели оптимизацию нуклеотидной последовательности гена СУРА для обеспечения его высокоэффективной трансляции в *E. coli*. Рекомбинантную ДНК СУРА клонировали в вектор рЕТ22b(+) и полученную экспрессионную плазмиду использовали для трансформации бактерий *E. coli* штамма BL21(DE3)Gold. Рекомбинантный клон-продуцент *E. coli* обеспечивал синтез рчЦФА в растворимом состоянии в цитоплазме бактерий. Эффективность синтеза рчЦФА составляла до 50% суммарного белка клетки, что позволяло получать рчЦФА в количестве до 1 г с литра культуры. Был отработан метод очистки рчЦФА, состоящий из одноэтапной тандемной анионообменной хроматографии на колонках DEAE- и Q-Sepharose. Чистота полученного белка составляла 95% по данным электрофореза (SDS-PAGE), а его контаминация эндотоксином не превышала 0,05 нг на 1 мг белка, что соответствует требованиям Европейской фармакопеи к инъекционным препаратам. Полученный рекомбинантный белок сохранял функциональные свойства нативного ЦФА, такие как изомеразная активность и хемокиновая активность, выявленная по усилению миграции стволовых кроветворных клеток костного мозга мыши *in vivo*. Полученный штамм *E. coli* является суперпродуцентом и может быть использован при проведении масштабных лабораторных исследований рчЦФА, а также для доклинических и клинических испытаний данного белка как лекарственного средства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: циклофилин А, оптимизация гена, штамм-продуцент, изомеразная активность, хемокиновая активность.

DOI: 10.31857/S032097252203006X

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большой спектр рекомбинантных белков, полученных с использованием *Escherichia coli* (*E. coli*) в качестве штамма-продуцента, имеет широкое применение в исследовательской и медицинской практике, и такие белки часто служат лекарственными средствами при различных патологиях. При проведении масштабных лабораторных исследований, доклинических и клинических испытаний исследователи

часто сталкиваются с проблемой наработки препаративного количества целевого белка и, как следствие, поиска методических подходов, обеспечивающих высокий уровень его очистки при минимальном содержании бактериального липополисахарида (ЛПС, эндотоксин) в качестве примеси. Для этой цели проводят разработку препаративного или промышленного способа получения, отвечающего требованиям, обеспечивающим необходимое количество и качество целевого белка. Данная работа посвящена разработке метода масштабного получения и очистки рекомбинантного циклофилина А человека (рчЦФА) для его дальнейшего использования в доклинических и клинических испытаниях.

Циклофилин А (ЦФА, 18 кДа) является цис-транс-изомеразой, существует во внутриклеточ-

Принятые сокращения: чЦФА – циклофилин А человека; рчЦФА – рекомбинантный циклофилин А человека; СУРА – ген ЦФА; ЛПС – липополисахарид; ЦСА – циклоспорин А; ИПТГ – изопропил-β-d-1-тиогактопираниозид; PMSF – фенилметилсульфонил фторид.

* Адресат для корреспонденции.

ной и секреторной формах [1] и обладает широким диапазоном различных функций. Внутриклеточный ЦФА участвует в фолдинге, транспорте и сборке белков [2], регуляции клеточной пролиферации [2], является лигандом для циклоспорина А (ЦсА), обуславливающим его иммуносупрессивное действие [3], обеспечивает передачу сигнала от Т-клеточного рецептора [4] и участвует в контроле баланса между Т-хелперами первого и второго типов, подавляя активность Т-хелперов типа 2 [4]. Секреторный ЦФА является провоспалительным фактором, обладает хемоаттрактивными свойствами, привлекая макрофаги [5], гранулоциты и активированные Т-лимфоциты [6] и формируя очаг воспаления. ЦФА, с одной стороны, участвует в иммунной защите организма [5], включая противораковую защиту [7, 8], а с другой стороны, является фактором патогенеза таких заболеваний, как ревматоидный артрит, диабет, онкологические заболевания и др. [1].

Многогранные свойства ЦФА лежат в основе возможности разработки различных лекарственных средств на его основе для дальнейшего клинического использования. В норме секреторный ЦФА присутствует в крови, молоке и тканевых жидкостях человека [9, 10] и является хемоаттрактантом для костномозговых предшественников различных ростков иммуногенеза и кроветворения (незрелых дендритных клеток, Т- и В-лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов) [11], участвуя в регенеративных процессах. ЦФА способствует привлечению стволовых клеток в очаг ишемии и может рассматриваться в качестве терапевтического средства при ишемии конечностей [12]. Способность ЦФА связываться с ЦсА предполагает его клиническое использование для устранения побочных эффектов, вызванных действием данного иммуносупрессанта. Нефротоксичность — один из самых серьезных побочных эффектов применения ЦсА. Было показано, что гиперэкспрессия ЦФА защищает от ЦсА-индуцированной нефротоксичности *in vivo* [3]. ЦФА может применяться при трансплантации аллогенных миобластов для предотвращения их апоптоза и блокировки дифференцировки, вызванной ЦсА [13]. Последний снижает минеральную плотность костей и способствует развитию остеопороза. ЦФА стимулирует дифференцировку остеобластов и подавляет активность остеокластов, что приводит к анаболическому эффекту, поэтому этот белок может найти перспективное применение как при нейтрализации эффектов ЦсА, так и при разработке новых лекарственных препаратов для лечения остеопороза [14]. Гиперэкспрессия ЦФА ингибирует репликацию вируса гриппа [15], что также потенциально может быть использовано в борьбе с данной инфекцией.

па [15], что также потенциально может быть использовано в борьбе с данной инфекцией.

Кроме того, ЦФА является одним из основных факторов патогенности при аутоиммунных заболеваниях (ревматоидный артрит), диабете и др., для лечения которых данный белок может выступать в качестве мишени.

Выявленное многообразие свойств ЦФА показывает, что данный белок требует самого пристального изучения в процессах, имеющих место как в норме, так и при патологиях, и в перспективе может найти применение в клинической практике либо в качестве лекарственного средства, либо в качестве мишени воздействия. Тем не менее для всестороннего изучения биологических свойств данного белка, для проведения масштабных лабораторных исследований *in vivo*, производства лекарственной субстанции для доклинических и клинических испытаний или иммунизации животных для получения антител к ЦФА требуются значительные количества (граммы) высокоочищенного апиrogenного белка.

Решению этой проблемы посвящена данная работа, в результате которой получен рекомбинантный штамм *E. coli*, являющийся высокоэффективным продуцентом рЦФА. Разработана уникальная система очистки, позволяющая получить качественные характеристики рЦФА на уровне европейских стандартов [16, 17]. Предлагаемый способ наработки рЦФА обеспечивает сохранение функциональных свойств, характерных для природного ЦФА, — изомеразную активность и хемоаттрактивное действие, направленное на усиление миграции клеток костного мозга, а также гранулоцитов и активированных Т-лимфоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Конструирование оптимизированной последовательности гена *СУРА*. Для обеспечения высокоэффективной трансляции чЦФА в *E. coli* провели оптимизацию последовательности гена *СУРА*, кодирующей данный белок. На основе имеющихся баз данных по анализу вторичных структур мРНК и других особенностей последовательностей, модулирующих прокариотическую трансляцию (программный пакет GeneBee («RNA secondary structure prediction» http://www.genebee.msu.ru/services/rna2_reduced.html)) [18–20], в нативной последовательности гена *СУРА* были выявлены факторы, лимитирующие эффективность трансляции в *E. coli*: редкие, повторяющиеся и субоптимальные кодоны; большое число AG-богатых участков и вторич-

ные сайты инициации трансляции. Удаление этих участков ДНК проводили вручную путём подбора и замены на наиболее часто использующиеся в *E. coli* кодоны.

Выделение тотальной РНК и синтез кДНК клеток Jurkat. Клетки линии Jurkat (TIB-152, ATCC, США), представляющей собой Т-клеточную лимфому человека, поддерживали в культуре *in vitro*. Клетки помещали в TRI Reagent («MRC», США) и выделяли тотальную РНК согласно протоколу производителя. Перед синтезом кДНК проводили обработку выделенной РНК ферментом ДНКазы I («Invitrogen», США) для предотвращения контаминации образцов геномной ДНК. Затем проводили синтез кДНК с помощью коммерческого набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific», США) согласно протоколу производителя. Полученную кДНК клеток Jurkat использовали в качестве матрицы при синтезе оптимизированного гена *СУРА* методом ПЦР.

Синтез оптимизированного гена *СУРА*. Оптимизированную последовательность гена *СУРА* синтезировали при помощи серии ПЦР с использованием набора перекрывающихся праймеров, расположенных в порядке от центральной части гена *СУРА* к его 5'- и 3'-концам (таблица). Набор олигонуклеотидов для синтеза конструировали при помощи программных пакетов «Oligo», «Vector NTI» и «GeneBee». Температуру ренатурации комплементарных участков олигонуклеотидов подбирали в диапазоне 58–60 °С для достижения оптимальной эффективности ПЦР-амплификации. В состав концевых прямого праймера (CPF5Nde) и концевого обратного праймера (CPR5Xho) (таблица) были введены сайты рестрикции NdeI и XhoI соответственно для обеспечения встраивания конструкта в векторные системы семейства pET [21]. ПЦР проводили с использованием смеси Taq- и Pfu-полимераз («Promega», США). Подбор оптимальных условий амплификации осуществляли при помощи градиентной функции амплификатора Mastercycler Nexus Gradient («Eppendorf», США). Используя кДНК клеток Jurkat, проводили первую амплификацию с праймерами CPF1 и CPR1 (таблица). Для этого ПЦР ставили параллельно при температурах отжига 57–64 °С, после чего аликвоты реакционной смеси наносили на агарозный или акриламидный гель (фрагменты длиной до 250 п.н.) и анализировали электрофоретически. Наиболее чистые продукты реакции нужной длины отбирали для дальнейшей стадии синтеза гена. ДНК частично экстрагировали из геля при нагревании до 55 °С в течение 30 мин в присутствии 1М

ацетата калия. Полученный продукт первой амплификации использовали во втором раунде ПЦР с праймерами CPF2 и CPR2 (таблица). Аналогичным образом, последовательно используя пары перекрывающихся праймеров и продукт предшествующей ПЦР в качестве матрицы, амплифицировали полную последовательность гена *СУРА*. Корректность синтеза последовательности рекомбинантной ДНК *СУРА* верифицировали методом капиллярного секвенирования (ЗАО «Евроген», Россия).

Получение штамма *E. coli* BL21(DE3)Gold/pETCYPopti. По завершении синтеза рекомбинантный ген *СУРА* (*rСУРА*) очищали с использованием набора для очистки ПЦР-продуктов (PCR Purification Kit, «Qiagen», Германия), обрабатывали эндонуклеазами NdeI и XhoI («Thermo Fisher Scientific») и лигировали с вектором pET22b(+) («Novagen», США), предварительно линеаризованным этими же ферментами (рис. 1). Полученным лигатом pETCYPopti трансформировали электрокомпетентные клетки *E. coli* штамма BL21(DE3)Gold («Agilent», США), подготовленные в соответствии с протоколом производителя. Для электротрансформации использовали прибор ВТХ ЕСМ 600 («Artisan Technology Group», США) в режиме 129 Ом, 2,5 кВ. Трансформанты высевали на агаризованную (1% агара) среду 2хУТ («Difco», США), содержащую 50 мкг/мл ампициллина и 2% глюкозы, и выращивали в течение 18 ч при 37 °С. Выросшие колонии анализировали при помощи ПЦР с использованием праймеров CPF3 и CPR3 (таблица) на наличие фрагмента гена *rСУРА*. Бактериальные колонии, содержавшие нужный ген, выращивали в течение ночи в жидкой среде 2хУТ. Плазмидную ДНК pETCYPopti выделяли при помощи коммерческого набора QIAfilter Plasmid MidiKit («Qiagen», США) согласно протоколу производителя. Выделенную плазмидную ДНК секвенировали (ЗАО «Евроген») для анализа точности встраивания фрагмента ДНК, кодирующего рЧЦФА. Трансформанты, содержащие корректно собранные варианты вставки, использовали для дальнейшей работы.

Наработка аналитического количества рЧЦФА. Для продукции рЧЦФА в аналитическом количестве (до 4 л) единичную колонию трансформанта *E. coli* BL21(DE3)Gold/pETCYPopti помещали в 10 мл среды 2хУТ, содержащей 2% глюкозы и 50 мкг/мл ампициллина, и выращивали 18 ч при 37 °С. По истечении времени инкубации 10 мл культуры переносили в 1 л среды 2хУТ, содержащей 0,1% глюкозы и 50 мкг/мл ампициллина, разносили среду на 4 колбы (по 250 мл) и выращивали на термостатируемом

Последовательности олигонуклеотидов, использованные для синтеза оптимизированного гена *СУРА*

Название	Последовательность (5'→3')
Прямой праймер 1 (CPF1)	TCATTCCGGGCTTCATGTGTACAGGGCGGTGACTTCACCCGCCACAATGGCACCCGGTG-GCAAGAGCATCTACGGTGAGAAGTTCGAAGAT
Обратный праймер 1 (CPR1)	CCATTGGTGTTCGACCCGCGTTCGCCATGCTCAGGATGCCCGGACCCGGTAT-GCTTCAGGATGAAGTTCTCATCTTCGAACCTTCTCACC
Прямой праймер 2 (CPF2)	TGAGCACCCGGTGAGAAAGGCTTTGGTTACAAGGGCAGCTGCTTTCACCCGCATCATTC-CGGGCTTCATGT
Обратный праймер 2 (CPR2)	TGCTTGCCATCCAGCCACTCGGTCTTCGCGGTGCAGATGAAAACTGGCTACCATTGGT-GTTCGGACCC
Прямой праймер 3 (CPF3)	GAGCTGTTTCGCGGACAAGGTGCCGAAGACCCGCCGAGAACTTTCGTGCCCTGAGCACCG-GTGAGAAAG
Обратный праймер 3 (CPR3)	CATGGCCTCCACAATGTTTCATGCCTTCCTTCACTTTGCCAAACACGACATGCTTGC-CATCCAGCCAC
Прямой праймер 4 (CPF4)	GTTCTTTGATATCGCGGTGGACGGCGAGCCGCTGGGCCGTGTCAGCTTTGAGCT-GTTCGCGGACAAG
Обратный праймер 4 (CPR4)	CAATGGTGATTTTCTTGCTGGTCTTGCCATTGCGGCTGCCAAAGCGCTCCATGGCCTCCA-CAATGTTT
Прямой праймер 5 (CPF5Nde)	TTTCTCTATATTCATATGGTCAACCCGACCGTGTCTTTGATATCGCGGT
Обратный праймер 5 (CPR5Xho)	CGTTATTCTCGAGTTACAGCTGGCCACAGTCCGCAATGGTGATTTTCTTGC

Примечание. Сайты рестрикции NdeI и XhoI выделены полужирным начертанием.

шейкере при 37 °С с перемешиванием при 220 об./мин до оптической плотности (OD_{600}) 1,5 ОЕ. Выросшую культуру охлаждали до 28 °С, добавляли изопропил-β-d-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) («Thermo Fisher Scientific») до концентрации 0,5 мМ и продуцировали белок в течение 4 ч. Биомассу продуцента собирали центрифугированием (CentriTech VP Pilot, «BioTechno Group», Россия) при 5000 об./мин в течение 10 мин и хранили в виде замороженных осадков при температуре –80 °С при добавлении 15% глицерина в качестве криопротектора.

Нарботка препаративного количества рчЦФА. Получение биомассы продуцента *E. coli* BL21(DE3)Gold/pETCYPori проводили методом ферментации в 50-литровом биореакторе («Infors», Швейцария) с электромагнитным импеллером и контроллером, обеспечивающим мониторинг уровня растворенного кислорода, значения pH, содержания определённых ионов, концентрации глюкозы и уровня пенообразования. Объём единичной ферментации составлял 30 л. Ферментацию проводили в среде 2xYT, содержащей 1% глюкозы, 50 мМ K_2HPO_4 и 0,5 мМ $MgCl_2$. Инокулят в количестве 2 л готовили в 5-литровом ферментёре LabFors («Infors») в сре-

де 2xYT, содержащей 5% глицерина, 5% глюкозы, 80 мМ K_2HPO_4 и 3 мМ $MgCl_2$. Начальная концентрация ампицилина составляла 100 мкг/мл. Инокулят выращивали с использованием 100 мл первичной культуры, приготовленной в среде SOB («Difco») с добавлением 5% глюкозы. Первичную культуру готовили на основе единичной колонии продуцента, наращивая биомассу в течение 7 ч при концентрации ампицилина 100 мкг/мл. Значение pH среды при инокуляции составляло 7,6. В дальнейшем уровень pH поддерживали в диапазоне 7,0–7,2 титрованием 1 М раствором NaOH. Температура роста первичной культуры и инокулята составляла 37 °С. Инокулят вводили в предварительно разогретую до 37 °С культуральную среду в основном ферментёре и растили культуру в течение 8 ч при значениях pH в диапазоне от 7,0 до 7,2 и содержании растворенного кислорода 28–30%. При достижении оптической плотности культуры (OD_{600}) 1,5–2 ОЕ температуру в ферментёре снижали до 28 °С и добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,5 мМ. После индукции экспрессии белка контролировали параметры культуры и при истощении добавляли смесь, содержащую 800 г/л глюкозы и 2 г/л

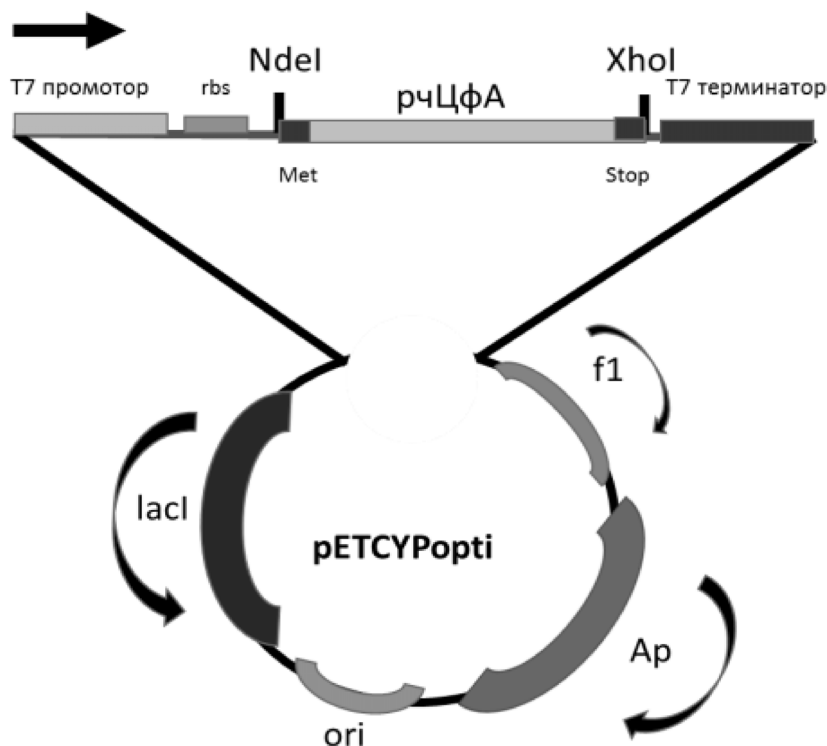


Рис. 1. Структура рекомбинантной плазмиды pETCYPopti. Рекомбинантная плаزمида pETCYPopti имеет размер 5858 п.н. и содержит фрагмент XhoI-NdeI вектора pET22b(+), несущий ген устойчивости к ампициллину ampR, промотор и терминатор РНК-полимеразы фага Т7 и полилинкер, в котором по сайтам XhoI и NdeI клонирован ген *CYP4* размером 498 п.н.

ампициллина. Через 1 ч после индукции инициировали систему пеногашения. Продукцию белка проводили в течение 12 ч. Далее отделяли биомассу с использованием проточной центрифуги, как описано выше, и хранили при -80°C с добавлением 15% глицерина.

Выделение рЧЦФА. Для выделения рЧЦФА 100 г бактериальной биомассы суспендировали в 300 мл буфера, содержащего 20 мМ Tris-HCl (рН 8), 100 мМ NaCl и дополненного ингибитором сериновых протеаз PMSF (в конечной концентрации 1 мМ) («Thermo Fisher Scientific»), и обрабатывали лизоцимом (20 мкг/мл) («PanReas Applichem», Испания) при 4°C в течение 30 мин. Лизис клеток проводили добавлением детергента Triton X-100 («Sigma-Aldrich», США) до концентрации 0,5%. К лизату добавляли MgCl_2 до концентрации 1 мМ и разрушали геномную ДНК *E. coli* ДНКазой (10 мкг/мл, «Sigma-Aldrich») в течение 15 мин при 20°C , затем добавляли ЭДТА до концентрации 5 мМ. Полученный лизат центрифугировали (Centritech VP Pilot, «BioTechno Group», Россия) в течение 20 мин при 18 000 g и супернатант, содержащий целевой белок, порционно высаливали сульфатом аммония из расчета половина объема насы-

щенного раствора сульфата аммония на один объем лизата. Осажденный лизат (25% сульфата аммония) инкубировали при 4°C в течение 1 ч для формирования осадка. Осадок удаляли центрифугированием в течение 15 мин при 18 000 g. Для осаждения целевого белка из супернатанта использовали насыщенный сульфат аммония из расчета 3 объема раствора сульфата аммония на 1 объем супернатанта, смесь инкубировали при 4°C в течение ночи. Образовавшийся осадок собирали центрифугированием в течение 60 мин при 18 000 g и растворяли в буфере, содержащем 30 мМ Na_3PO_4 (рН 8). Полученный раствор центрифугировали в течение 30 мин при 18 000 g для удаления нерастворенных частиц и примесей и диализовали трижды по 4 ч при 4°C против раствора 30 мМ Na_3PO_4 в соотношении 1 : 10. После диализа раствор целевого белка центрифугировали в течение 30 мин при 18 000 g для удаления частиц и агрегатов.

Очистка рЧЦФА. Одноэтапную очистку рЧЦФА проводили методом тандемной анионообменной хроматографии на колонках DEAE-сефароза и Q-сефароза («GE Healthcare», США). В препаративном варианте использова-

ли колонку HiScale 50/40 («GE Healthcare»), упакованную 300 мл DEAE-сефарозы, и HiScale 50/20 («GE Healthcare»), упакованную 200 мл Q-сефарозы. Перед нанесением белка колонки уравнивали буфером, содержащим 30 мМ Na_3PO_4 (рН 8). Нанесение белка вели при скорости потока 5 мл/мин и собирали фракцию после прохождения обеих колонок. Собранный раствор рЧЦФА стерилизовали фильтрацией через стерильный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм («Millipore», «Merck», США), обладающий низкой сорбцией белка, и хранили при 4 °С.

Электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Для выявления наиболее эффективного штамма-продуцента рЧЦФА уровень продукции рЧЦФА определяли с помощью SDS-PAGE в денатурирующих условиях в 12% полиакриламидном геле по методу Лэммли [22]. Аликвоты жидкой культуры продуцента центрифугировали (Centritech VP Pilot) при 5000 об./мин в течение 5 мин; осажденные клетки растворяли в 100 мкл лизирующего буфера с добавлением красителя бромфенолового синего («VWR Life Science AMRESCO», Австрия), обрабатывали 20 с ультразвуком, нагревали 3 мин при 100 °С и наносили на гель. После проведения электрофореза гель окрашивали Кумасси R-250 («Thermo Fisher Scientific») по стандартной методике и сканировали с помощью денситометра Shimadzu CS-930 («DMS», Франция). В качестве калибровочных значений использовали данные денситограмм очищенного рЧЦФА, концентрация которого была предварительно определена по методу Бредфорда [23]. При определении стабильности рЧЦФА в качестве маркера дополнительно использовали бычий сывороточный альбумин (БСА, «Amresco», Англия) и маркер молекулярной массы белков («Thermo Fisher Scientific», кат. № 26619).

Определение содержания эндотоксина. Оценку содержания бактериальных эндотоксинов в очищенных образцах рЧЦФА проводили с помощью ЛАЛ-теста, используя количественный гель-тромб тест, основанный на способности лизата амебоцитов мечехвоста *Limulus polyphemus* специфически реагировать с эндотоксинами грамотрицательных бактерий (ЛПС). Анализы проводили на базе ООО «НПО «ЛАЛ-центр» (Москва, Россия) в соответствии с инструкцией производителя («Charles River Endosafe», США).

Определение пептидил-пролил цис-транс-изомеразной активности рЧЦФА. Изомеразную активность рЧЦФА измеряли в сравнительном анализе с химотрипсином. В качестве субстрата использовали *N*-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-нитроанилид (20 М, «Sigma-Aldrich») в 100 мМ

натрий-фосфатном буфере (рН 7,8) [24]. Для постановки теста к 1 мл очищенного рЧЦФА (100 нМ) в 50 мМ буфере Tris-HCl, рН 7,8 (рабочий буфер), добавляли субстрат химотрипсина до конечной концентрации 0,1 мМ. Субстрат предварительно растворяли в диметилсульфоксиде (сток 2 мг/мл) («Sigma-Aldrich»). Реакцию проводили при 10 °С. Смесь инкубировали 15 мин, затем добавляли 2 мкл химотрипсина (сток 2 мг/мл) («Sigma-Aldrich»), растворенного в рабочем буфере, и перемешивали. Интенсивность окраски измеряли на спектрофотометре UV300 («Amersham», Великобритания) при длине волны 390 нм. Измерения вели с периодичностью в 2 с в течение 200 с. В качестве отрицательного контроля использовали рабочий буфер. Блокирующее влияние ЦсА («Sigma-Aldrich») на изомеразную активность рЧЦФА оценивали, добавляя к исходной реакционной смеси 10 мкл раствора ЦсА (сток 10 мкМ в этаноле) до конечной концентрации 100 нМ.

Животные. Самок мышей C57BL/6 (14–16 недель) получали из экспериментально-биологической лаборатории НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина») Минздрава России. Экспериментальные группы состояли из 10 животных. Мышей содержали при 12-часовом световом цикле при температуре 20–24 °С и 40% относительной влажности. Работу с животными проводили в соответствии с протоколом этической комиссии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Облучение мышей в сублетальной дозе 4,5 Гр осуществляли на гамма-терапевтической установке Со-60 «Агат-Р» (Россия) с начальной мощностью $1,9 \times 10^{14}$ Бк.

Оценка биологической активности рЧЦФА *in vivo*. Оценку хемоаттрактивной активности рЧЦФА по отношению к стволовым кроветворным клеткам костного мозга проводили посредством определения числа селезеночных эндоклоний после сублетального облучения мышей по методу Till & McCullough [25]. Через 24 ч после облучения опытным мышам в хвостовую вену вводили очищенный рЧЦФА в дозе 100 мкг/мышь. Одной группе контрольных животных вводили адекватный объем натрий-фосфатного буфера, в котором был растворен рЧЦФА. Второй группе контрольных животных вводили раствор липополисахарида (ЛПС, «Sigma-Aldrich») в том же буфере в концентрации, адекватной количеству ЛПС, содержащему-

ся в растворе 100 мкг рЧЦФА (4 пг/мышь). Через семь дней после введения рЧЦФА мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации, селезенки извлекали и помещали в фиксирующую жидкость, состоящую из ледяной уксусной кислоты и абсолютного спирта в соотношении 1 : 3. Через 4 ч проводили визуальный подсчет эндогенных колоний в каждой селезенке.

Статистический анализ. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica for Windows 6.0 («StatSoft», США). Для сравнения внутри группы использовали парный выборочный *t*-критерий Стьюдента, а для межгруппового сравнения – независимый *t*-критерий Стьюдента. Различия признавали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Оптимизация последовательности гена *СУРА* и создание штамма-продуцента рЧЦФА. Ранее при создании штамма-продуцента *E. coli* для получения рЧЦФА использовали оригинальную последовательность гена *СУРА*, которая содержит спектр кодонов, характерных для транскрипции генов в организме человека [26]. Этот спектр существенно отличается от спектра кодонов, используемых для продукции активно экспрессирующихся белков в *E. coli*. В результате тРНК, содержащая редкие для *E. coli* антикодоны, титровалась высоким уровнем транскрипции гетерологического белка, затрудняя работу аппарата трансляции, продукцию целевого белка и общий рост клеточной массы.

Современные методы повышения продукции рекомбинантных белков основываются не только на подборе адекватной системы транскрипции-трансляции и условий культивирования, но и на адаптации последовательности ДНК, кодирующей целевой белок, – «кодонной оптимизации» [27, 28] для продукции в конкретном организме-хозяине [29]. Для этого в данной работе был проведен дизайн последовательности гена *СУРА*, который включал в себя замены некоторых кодонов нативного гена на кодоны, наиболее часто встречающиеся в генах белков с высоким уровнем продукции у *E. coli*. При этом учитывали перспективы стабильности конечной мРНК, отсутствие препятствий трансляции в виде чрезмерной структурированности мРНК, отсутствие гомополимерных участков [18, 19] и особенности проведения высокоэффективной терминации трансляции, поскольку рибосомы могут «проскакивать» «слабые» терминирующие

кодона (TGA), особенно если они представлены в единственном числе.

Анализ последовательности нативного гена *СУРА* выявил достаточно многочисленные элементы, негативно влияющие на эффективность транскрипции и трансляции гена ЧЦФА в *E. coli*. В последовательности *СУРА* обнаружено несколько кодонов, тРНК для которых весьма слабо представлены в *E. coli* (рис. 2, а, выделены серым), и «субоптимальных» кодонов, для которых частота встречаемости тРНК относительно невысока (рис. 2, а, подчеркнуты). Кроме того, выявлено несколько пар повторяющихся друг за другом кодонов (рис. 2, а, выделены курсивом и подчеркнуты), что также может вызывать паузы в трансляции. В нативной последовательности гена *СУРА* был обнаружен участок «упрощенной структуры» ДНК (GAGAGA, рис. 2, б), который мог стать фактором нестабильности РНК и в котором возможно присутствие сайтов внутреннего связывания с рибосомой [18], потенциально обуславливающих трансляционные паузы [19, 20]. Кроме того, нативная последовательность гена *СУРА* содержала относительно большое число AG-богатых участков, которые могли распознаваться рибосомами и вызывать паузы в трансляции (рис. 2, б).

Анализ вторичной структуры исходной последовательности показал её значительную нестабильность: в наиболее энергетически выгодной конформации присутствует протяжённая петля, не содержащая комплементарных пар оснований (рис. 2, в). Присутствие данной петли могло способствовать ускоренной деградации мРНК и снижению уровня трансляции.

При дизайне из последовательности гена *СУРА* удалили гомополимерные и AG-богатые участки (рис. 2, б), а также провели замену редко встречающихся и повторяющихся кодонов (рис. 2, а). Кроме того, были удалены участки, потенциально способные к вторичной инициации трансляции (рис. 2, в), и создан новый сайт терминации трансляции, состоящий из двух последовательных кодонов ТАА, являющихся наиболее «сильными». Также были удалены сайты для узнавания гексануклеотидными эндонуклеазами рестрикции для облегчения переноса синтетического гена в различные экспрессионные системы. В результате анализа и оптимизации была создана рекомбинантная последовательность гена *СУРА* (*рСУРА*), оптимизированная для транскрипции и трансляции в *E. coli* (рис. 2, д). Анализ вторичной структуры *рСУРА* показал, что оптимизированная ДНК этого гена лишена указанных выше недостатков (рис. 2, в).

Сравнение природной и оптимизированной последовательностей гена *СУРА* показало, что

ATG GTC AAC CCC ACC GTG TTC TTC GAC ATT GCC GTC GAC GGC GAG CCC TIG GGC CGC GTC TCC TTT GAG CTG TTT GCA GAC AAG GTC CCA
 AAG ACA GCA GAA AAT TTT CGT GCT CTG AGC ACT GGA GAG AAA GGA
 TTT GGT TAT AAG GGT TCC TGC TTT CAC AGA ATT ATT CCA GGG TTT
 ATG TGT CAG GGT GGT GAC TTC ACA CGC CAT AAT GGC ACT GGT GGC
 AAG TCC ATC TAT GGG GAG AAA TTT GAA GAT GAG AAC TTC ATC CTA
 AAG CAT ACG GGT CCT GGC ATC TTA TCG ATG GCA AAT GCT GGA CCC
 AAC ACA AAT GGT TCC CAG TTT TTC ATC TGC ACT GCC AAG ACT GAG
 TGG TTG GAT GGC AAG CAT GTG GTG TTT GGC AAA GTG AAA GAA GGC
 ATG AAT ATT GTG GAG GCC ATG GAG CGC TTT GGG TCC AGG AAT GGC
 AAG ACC AGC AGG AGG ATC ACC ATT GCT GAC TGT GGA CAA CTC TGA

ATGGTCAACCCACCCTGTTCTTCGACATTGCCGTCGACGGCGAGCCCTTG
 GGCCCGCTCTCCTTTGAGCTGTTTGACAGACAAGGTCCCAAAGACAGCAGA
AAATTTTCGTGCTCTGAGCACTGGAGAGAAAGGATTTGGTTATAAGGGTTC
 CTGCTTTACAGAAATTATTCAGGGTTTATGTGTCAGGGTGGTGACTTCAC
 ACGCCATAATGGCACTGGTGGCAAGTCCATCTATGGGGAGAAATTTGAAG
 ATGAGAACTTCATCCTAAAGCATACGGGTCTGGCATCTTATCGATGGCAA
 ATGCTGGACCCAACACAAATGGTTCACAGTTTTCATCTGCACTGCCAAGA
 CTGAGTGGTTGGATGGCAAGCATGTGGTGTGGGCAAAAGTGAAAGAAGGC
 ATGAATATTGTGGAGGCCATGGAGCGCTTTGGGTCCAGGAATGGCAAGAC
 CAGCAAGAAGATCACCATTGCTGACTGTGGACAACCTCTGA

ATGGTCAACCCACCCTGTTCTTCGACATTGCCGTCGACGGCGAGCCCTTG
 GGCCCGCTCTCCTTTGAGCTGTTTGACAGACAAGGTCCCAAAGACAGCAGA
AAATTTTCGTGCTCTGAGCACTGGAGAGAAAGGATTTGGTTATAAGGGTTC
 CTGCTTTACAGAAATTATTCAGGGTTTATGTGTCAGGGTGGTGACTTCAC
 ACGCCATAATGGCACTGGTGGCAAGTCCATCTATGGGGAGAAATTTGAAG
ATGAGAACTTCATCCTAAAGCATACGGGTCTGGCATCTTATCGATGGCAA
 ATGCTGGACCCAACACAAATGGTTCACAGTTTTCATCTGCACTGCCAAGA
 CTGAGTGGTTGGATGGCAAGCATGTGGTGTGGGCAAAAGTGAAAGAAGGC
 ATGAATATTGTGGAGGCCATGGAGCGCTTTGGGTCCAGGAATGGCAAGAC
 CAGCAAGAAGATCACCATTGCTGACTGTGGACAACCTCTGA

ATG GTC AAC CCG ACC GTG TTC TTT GAT ATC GCG GTG GAC GGC GAG
 CCG CTG GGC CGT GTC AGC TTT GAG CTG TTC GCG GAC AAG GTG CCG
 AAG ACC GCC GAG AAC TTT CGT GCC CTG AGC ACC GGT GAG AAA GGC
 TTT GGT TAC AAG GGC AGC TGC TTT CAC CGC ATC ATT CCG GGC TTC
 ATG TGT CAG GGC GGT GAC TTC ACC CGC CAC AAT GGC ACC GGT GGC
 AAG AGC ATC TAC GGT GAG AAG TTC GAA GAT GAG AAC TTC ATC CTG
 AAG CAT ACC GGT CCG GGC ATC CTG AGC ATG GCG AAC GCG GGT CCG
 AAC ACC AAT GGT AGC CAG TTT TTC ATC TGC ACC GCG AAG ACC GAG
 TGG CTG GAT GGC AAG CAT GTC GTG TTT GGC AAA GTG AAG GAA GGC
 ATG AAC ATT GTG GAG GCC ATG GAG CGC TTT GGC AGC CGC AAT GGC
 AAG ACC AGC AAG AAA ATC ACC ATT GCG GAC TGT GGC CAG CTG

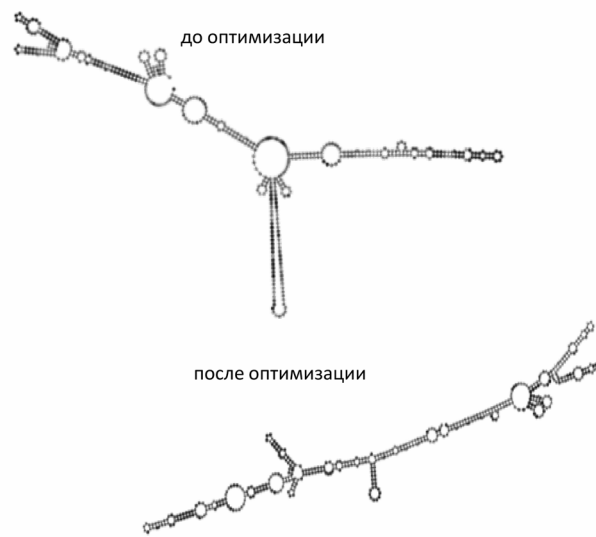


Рис. 2. Особенности нативной последовательности гена *СУРА*, ограничивающие эффективность продукции рЧЦФА в *E. coli*. *a* – Нативная последовательность гена *СУРА* с указанием факторов, лимитирующих эффективность трансляции: редкие кодоны выделены серым, повторяющиеся – курсивом и подчеркнуты, субоптимальные – подчеркнуты. *б* – Гомополимерные и AG-богатые участки в составе нативной последовательности (выделены серым). *в* – Участки, потенциально способные к вторичной инициации трансляции (выделены серым). *г* – Вторичная структура РНК гена *СУРА* до (сверху) и после (снизу) оптимизации. *д* – Оптимизированная последовательность гена *СУРА*

степень их идентичности составила ~ 80%. Разработанную последовательность ДНК *СУРА* синтезировали при помощи серии ПЦР с перекрывающимися праймерами (таблица). В последнюю пару праймеров были введены сайты эндонуклеаз рестрикции NdeI и XhoI (CPF5Nde и CPR5Xho, таблица) для последующего клонирования полноразмерной ДНК оптимизированного гена *СУРА* в плазмидный вектор рЕТ22b(+) («Novagen», США). В результате была получена экспрессионная плаزمида рЕТСУРopt1 размером 5858 п.н., которая содержала клонированный ген *СУРА* размером 498 п.н. (рис. 1). Этой плазмидой трансформировали штамм *E. coli* BL21(DE3)Gold, в результате чего был получен штамм-продуцент рЧЦФА *E. coli* BL21(DE3)Gold/pЕТСУРopt1 [17].

Оценка продуктивности штамма-продуцента рЧЦФА. На первом этапе проводили подбор оптимальных условий для максимальной продукции рЧЦФА штаммом-продуцентом. Для этой цели была использована стандартная методика анализа зависимости продукции белка от уровня индуктора и температуры, при которой проводится индукция [30]. Продукцию рЧЦФА индуцировали добавлением ИПТГ в конечной концентрации от 50 до 1000 мкМ при температурах 22, 25, 28, 30, 32 и 37 °С. Результаты сравнительного анализа показали, что добавление ИПТГ в конечной концентрации более 250 мкМ не увеличивало продукцию рЧЦФА (данные не представлены). При температуре 25 °С удельный выход растворимого белка был максимальным в пересчёте на грамм биомассы,

однако при 28 °С общий выход биомассы был существенно выше, что приводило к накоплению большего количества растворимого белка в пересчёте на литр культуральной среды, чем при 25 °С (данные не представлены). Таким образом, была сформирована программа роста клеток-продуцентов рЦФА, включающая стартовые условия для масштабирования роста в ферментёре: наращивание биомассы при 37 °С, индукцию продукции белка при 28 °С путём добавления ИПТГ до конечной концентрации 0,5 мМ. Электрофоретический анализ лизата бактериальной биомассы штамма-продуцента показал, что при подобранных условиях выращивания и индукции рЦФА является доминирующим белком (рис. 3, а). Аналогичные результаты были получены при продукции рЦФА в препаративном количестве (рис. 3, б, дорожка 2). По результатам денситометрических измерений количество рЦФА составило 50% от общего количества клеточного белка бактерий.

Оптимизация способа очистки рЦФА. Хроматографическую очистку рЦФА проводили одноэтапно с использованием тандема колонок DEAE-Sepharose и Q-Sepharose в буфере, содержащем 30 мМ фосфата натрия (рН 8). Было показано, что существенным моментом эффективности такой очистки рЦФА является объем образца, наносимого на колонку. В случае нанесения объемов образца, двукратно и более превышающих объем колонки DEAE-Sepharose, возможна контаминация очищенного белка примесями, слабо удерживаемыми носителем, которые медленно мигрируют вдоль колонки и выходят после окончания элюции целевого белка. Спектр поглощения белкового препарата, со-

державшего данные примеси, демонстрирует смещение максимума поглощения с длины волны 275–280 нм, характерной для препаратов белка, к длине волны 260 нм (данные не представлены).

Известно, что анионообменные смолы обладают высокой способностью к связыванию липополисахаридов и бактериального эндотоксина. В то же время ЦФА, обладающий высокой изоэлектрической точкой (рI 9,6) [31], не связывается с данными носителями. Концентрация рЦФА при таком способе очистки составляла не менее 10 мг/мл при суммарном выходе очищенного белкового продукта не менее 0,5 г с литра культуры без ферментации и не менее 1 г с литра культуры, выращенной в ферментёре, что более чем в 5 раз превосходило уровень продукции в аналогичных условиях для неоптимизированного гена [32].

Чистота полученного рЦФА стандартно составляла 95% по данным денситометрии (рис. 3, б, дорожки 3–7). Анализ количества эндотоксина в образцах рЦФА показал, что при разработанном способе очистки его содержание не превышало 0,04 нг на 1 мг белка, что соответствует требованиям Европейской фармакопеи к инъекционным препаратам [16].

Оценка активности рЦФА. ЦФА, обладая пептидил-пролил цис-транс-изомеразной активностью, играет важную роль в формировании пространственной структуры белков [3]. Кроме того, ЦФА является лигандом для ЦсА, и их связывание подавляет ферментативную и биологическую активность ЦФА. Для подтверждения функционального соответствия полученного рекомбинантного белка природному ЦФА мы

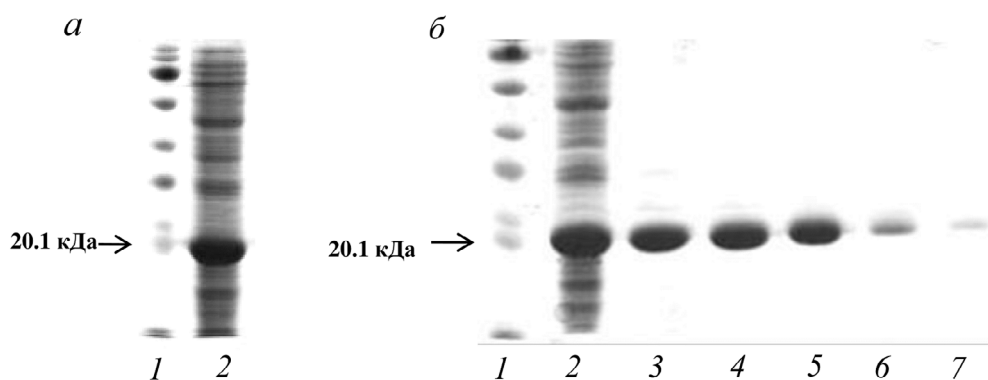


Рис. 3. Электрофоретический анализ чистоты рЦФА. а – Аналитическая продукция рЦФА в клетках BL21(DE3)Gold/pETCYPorti; 1 – маркер молекулярной массы Page Ruler Plus («Thermo Fisher Scientific», США); 2 – лизат бактериальной биомассы после продукции рЦФА. б – Препаративная продукция рЦФА в клетках BL21(DE3)Gold/pETCYPorti; SDS-PAGE электрофоретический анализ после очистки рЦФА методом тандемной анионообменной хроматографии на колонках DEAE-Sepharose и Q-Sepharose: 1 – маркер молекулярной массы Page Ruler Plus; 2 – лизат бактериальной биомассы после осаждения сульфатом аммония и диализа; 3–7 – различные количества рЦФА, очищенные при помощи тандемной анионообменной хроматографии (5,0; 3,0; 2,0; 0,5; 0,2 мкг соответственно)

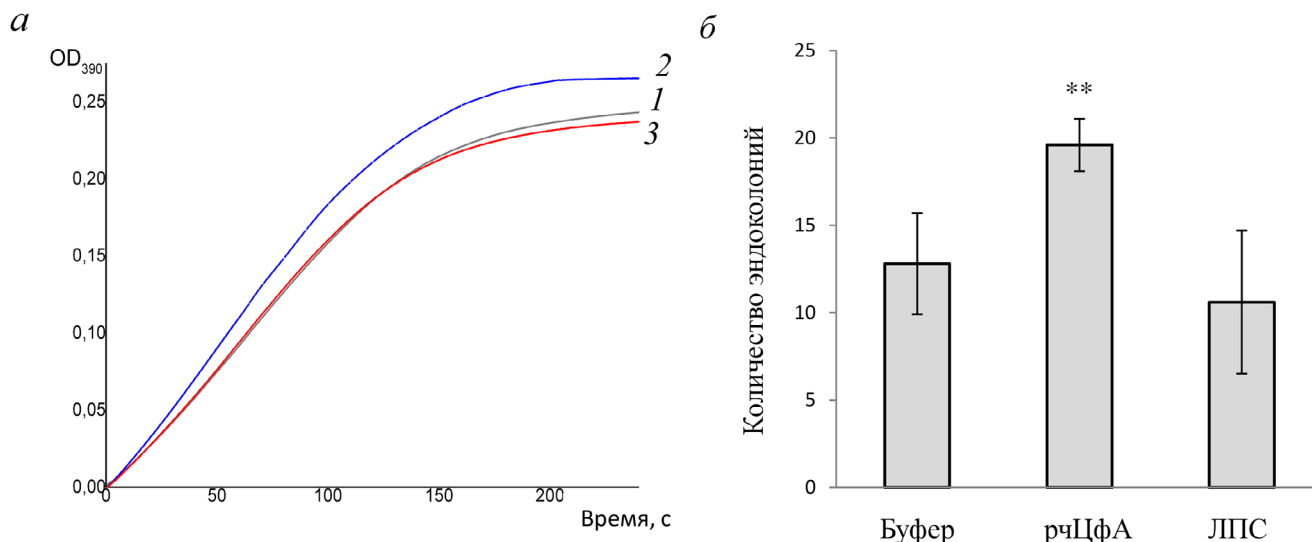


Рис. 4. Оценка активности рсЦФА. *а* – Анализ изомеразной активности рсЦФА: 1 – химотрипсин; 2 – рсЦФА + химотрипсин; 3 – рсЦФА + ЦсА + химотрипсин. *б* – Влияние рсЦФА на формирование эндоколоний стволовых клеток в селезенке сублетально облученных мышей линии C57BL/6. Представлены данные одного из двух репрезентативных экспериментов ($M \pm SEM$), по 10 мышей в группе. ** $p \leq 0,01$

оценили способность рекомбинантного белка проявлять изомеразную активность и влияние ЦсА на эту активность.

Было показано, что добавление рсЦФА в реакционную смесь химотрипсина и N-нитроанилида приводило к увеличению скорости образования изомерной формы р-нитроанилида (рис. 4, *а*, кривая 2), что свидетельствовало о наличии изомеразной активности рсЦФА. Добавление ЦсА в реакционную систему приводило к нейтрализации данной активности (рис. 4, *а*, кривая 3). Таким образом, было показано, что рсЦФА обладает функциональными свойствами природного ЦФА: проявляет изомеразную активность и является лигандом для ЦсА, сохраняя способность с ним связываться.

Известно, что природный ЦФА является хемоаттрактантом не только для нейтрофилов, эозинофилов, моноцитов и активированных Т-лимфоцитов [5–7], но и для незрелых клеток-предшественников гемопоэза из костного мозга [11]. Чтобы оценить хемотаксическую активность рсЦФА в отношении клеток костного мозга, белок вводили сублетально облученным мышам и через 7 дней после облучения производили подсчет эндоколоний, которые образовали гемопоэтические стволовые клетки костного мозга в селезенке мыши [11, 25]. Поскольку ЛПС также обладает способностью усиливать миграцию клеток костного мозга, в качестве дополнительного контроля отдельной группе животных вводили ЛПС в дозе 4 пг/мышь, что соответствовало его количеству в растворе рсЦФА

(100 мкг/мышь), вводимом опытной группе животных.

Исследование показало, что после введения рсЦФА число образованных эндоколоний увеличивалось в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой животных, которым вводили буфер, использованный для хроматографического выделения рсЦФА (рис. 4, *б*). ЛПС в используемой дозе не оказал влияния на миграцию клеток костного мозга мыши (рис. 4, *б*).

Таким образом, было показано, что рсЦФА обладает всеми функциональными свойствами природного белка, сохраняя изомеразную и хемоаттрактивную активности.

Оценка стабильности рсЦФА. Стерильные образцы полученного рсЦФА в различных концентрациях (2,5, 5 и 13 мг/мл) были заложены на хранение в холодильник при температуре 4 °С. По истечении трех лет хранения было отмечено, что полученный рсЦФА проявлял большую стабильность, поскольку даже при высоких концентрациях (13 мг/мл) раствор белка не терял прозрачность, белок сохранял растворимость, молекулярную стабильность (по результатам SDS-ПААГ, рис. 5) и изомеразную активность, аналогичную показанной на рис. 4, *а* (данные не представлены). Было подтверждено, что такой белок сохраняет биологическую активность, являясь хемоаттрактантом для гранулоцитов и активированных Т-лимфоцитов [7]. Однако лучшую сохранность обеспечивает хранение данного белка в более низких концентрациях (3–5 мг/мл), т.к. в дальнейшем при хране-

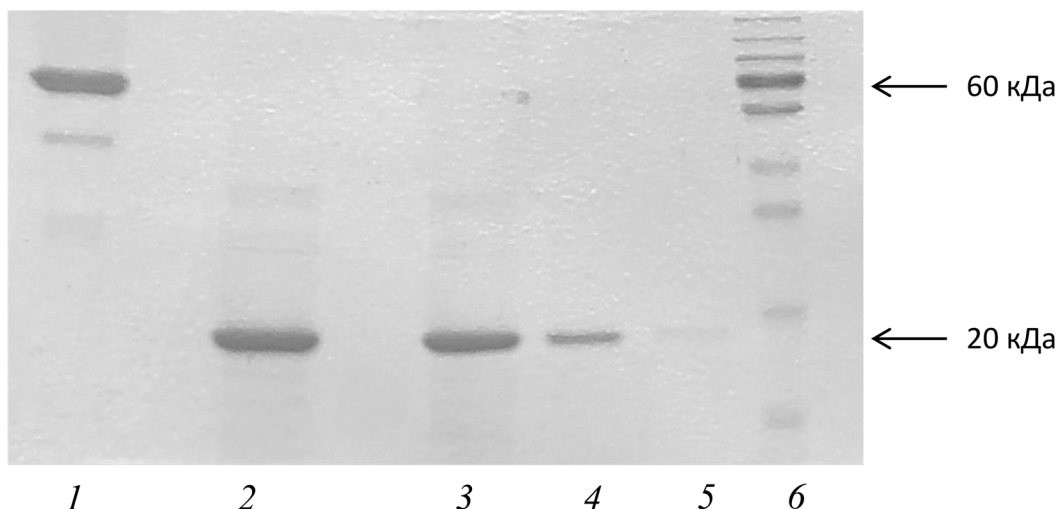


Рис. 5. Оценка молекулярной стабильности рчЦФА через 3 года после получения. 1 – БСА (10 мкг); 2–5 – рчЦФА в количестве 10, 5, 1 и 0,1 мкг соответственно; 6 – маркер молекулярной массы Page Ruler Plus («Thermo Fisher Scientific», США)

нии образцов более трех лет раствор белка в высоких концентрациях может мутнеть и выпадать в осадок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании мы разработали и синтезировали последовательность ДНК *СУРА*, оптимизированную для особенностей белковой продукции в *E. coli*. Это позволило значительно увеличить продуктивность полученного штамма по сравнению с уже известными продуцентами рчЦФА [26, 32]. Существенным преимуществом разработанной технологии является простая и эффективная процедура очистки рчЦФА, позволяющая в значительной мере избавиться от примесей бактериального ЛПС. Оценка биологической активности рчЦФА показала, что полученный белок воспроизводит функциональные свойства природного ЦФА [7]. При описанном способе получе-

ния молекула рчЦФА обладает высокой стабильностью при хранении.

Таким образом, все перечисленные качества позволяют считать полученный рчЦФА перспективным для его использования при проведении фундаментальных исследований, для всестороннего изучения данного белка в качестве мишени при поиске подходов лечения различных заболеваний, а также для изучения возможности его медицинского применения как лекарственного средства [33].

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства промышленности и торговли Российской Федерации (грант № 12411.1008799.13.004).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nigro, P., Pompilio, G., and Capogrossi, M. C. (2013) Cyclophilin A is a key player for human disease, *Cell Death Dis.*, **4**, e888, doi: 10.1038/cddis.2013.410.
2. Wang, P., and Heitman, J. (2005) Cyclophilins, *Genome Biol.*, **6**, 226, doi: 10.1186/gb-2005-6-7-226
3. Honga, F., Leeb, J., Piao, Y. J., Jae, Y. K., Kim, Y. J., et al. (2004) Transgenic mice overexpressing cyclophilin A are resistant to cyclosporin A-induced nephrotoxicity via peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **316**, 1073-1080, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.02.160.
4. Colgan, J., Asmal, M., Neagu, M., Yu, B., Schneidkraut, J., et al. (2004) Cyclophilin A regulates TCR signal strength in CD4⁺ T cells via a proline-directed conformational switch in Itk, *Immunity*, **21**, 189-201, doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.005.
5. Arora, K., Gwinn, W. M., Bower, M. A., Watson, A., Okumabua, I., et al. (2005) Extracellular cyclophilins

- contribute to the regulation of inflammatory responses, *J. Immunol.*, **175**, 517-522, doi: 10.4049/jimmunol.175.1.517.
6. Dawar, F. U., Wu, J., Zhao, L., Khattak, M. N. K., Mei, J., et al. (2017) Updates in understanding the role of cyclophilin A in leukocyte chemotaxis, *J. Leukoc Biol.*, **101**, 823-826, doi: 10.1189/jlb.3RU1116-477R.
 7. Kalinina, A. A., Silaeva, Yu. Yu., Kazansky, D. B., and Khromykh, L. M. (2019) The role of recombinant human cyclophilin A in the antitumor immune response, *Acta Naturae*, **11**, 63-67, doi: 10.32607/20758251-2019-11-2-63-67.
 8. Ramachandran, S., Venugopal, A., Kutty, V., Vinitha, A., Divya, G., et al. (2014) Plasma level of cyclophilin A is increased in patients with type 2 diabetes mellitus and suggests presence of vascular disease, *Cardiovasc. Diabetol.*, **13**, 38, doi: 10.1186/1475-2840-13-38.
 9. Kalinina, A., Golubeva, I., Kudryavtsev, I., Khromova, N., Antoshina, E., et al. (2021) Cyclophilin A is a factor of antitumor defense in the early stages of tumor development, *Int. Immunopharmacol.*, **94**, 107470, doi: 10.1016/j.intimp.2021.107470.
 10. Spik, G., Haendler, B., Delmas, O., Mariller, C., Chamoux, M., et al. (1991) A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP), *J. Biol. Chem.*, **266**, 10735-10738.
 11. Khromykh, L. M., Kulikova, N. L., Anfalova, T. V., Muranova, T. A., Abramov, V. M., et al. (2007) Cyclophilin A produced by thymocytes regulates the migration of murine bone marrow cells, *Cell Immunol.*, **249**, 46-53, doi: 10.1016/j.cellimm.2007.11.002.
 12. Perrucci, G., Straino, S., Corliano, M., Scopece, A., Napolitano, M., et al. (2016) Cyclophilin A modulates bone marrow-derived CD117(+) cells and enhances ischemia-induced angiogenesis via the SDF-1/CXCR4 axis, *Int. J. Cardiol.*, **212**, 324-335, doi: 10.1016/j.ijcard.2016.03.082.
 13. Hong, F., Lee, J., Song, J., Lee, S., Ahn, H., et al. (2002) Cyclosporin A blocks muscle differentiation by inducing oxidative stress and inhibiting the peptidyl-prolyl-*cis-trans* isomerase activity of cyclophilin A: cyclophilin A protects myoblasts from cyclosporin A-induced cytotoxicity, *FASEB J.*, **16**, 1633-1635, doi: 10.1096/fj.02-0060fje.
 14. Guo, M., James, A., Kwak, J., Shen, J., Yokoyama, K., et al. (2016) Cyclophilin A (CypA) plays dual roles in regulation of bone anabolism and resorption, *Sci. Rep.*, **6**, 22378, doi: 10.1038/srep22378.
 15. Liu, X., Zhao, Z., Xu, C., Sun, L., Chen, J., et al. (2012) Cyclophilin A restricts influenza A virus replication through degradation of the M1 protein, *PLoS One*, **7**, e31063, doi: 10.1371/journal.pone.0031063.
 16. Malyala, P., and Singh, M. (2008) Endotoxin limits in formulations for preclinical research, *J. Pharm. Sci.*, **97**, 2041-2044, doi: 10.1002/jps.21152.
 17. Khromykh, L. M., Kalinina, A. A., Kozyr, A. V., Kolesnikov, A. V., Silaeva, Yu. Yu., et al. (2016) The strain of *Escherichia coli* BL21(DE3)GoldpETCYPopti is the producer of recombinant human cyclophilin A. Patent # 2603283, Russian Federation.
 18. Wu, X., Jörnvall, H., Berndt, K. D., and Oppermann, U. (2004) Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **313**, 89-96, doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.091.
 19. Li, G. W., Oh, E., and Weissman, J. S. (2012) The anti-Shine-Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria, *Nature*, **484**, 538-541, doi: 10.1038/nature10965.
 20. Jin, H., Zhao, Q., Gonzalez de Valdivia, E. I., Ardell, D. H., Stenström, M., et al. (2006) Influences on gene expression *in vivo* by a Shine-Dalgarno sequence, *Mol. Microbiol.*, **60**, 480-492, doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05110.x.
 21. Studier, F. W., and Moffattm, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130, doi: 10.1016/0022-2836(86)90385-2.
 22. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
 23. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
 24. Kumawat, M., Karuna, I., Ahlawat, N., and Ahlawat, S. (2020) Identification of *Salmonella typhimurium* peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase B (PPIase B) and assessment of their role in the protein folding protein, *Pept. Lett.*, **27**, 744-750, doi: 10.2174/0929866527666200225124104.
 25. Till, J. E., and McCullough, E. A. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, *Radiat. Res.*, **14**, 213-222, doi: 10.1667/rrav01.1.
 26. Liu, J., Albers, M. W., Chen, C. M., Schreiber, S. L., and Walsh, C. T. (1990) Cloning, expression, and purification of human cyclophilin in *Escherichia coli* and assessment of the catalytic role of cysteines by site-directed mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 2304-2308, doi: 10.1073/pnas.87.6.2304.
 27. Grosjean, H., and Fiers, W. (1982) Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes, *Gene*, **18**, 199-209, doi: 10.1016/0378-1119(82)90157-3.
 28. Hatfield, G. W., and Roth, D. A. (2007) Optimizing scale-up yield for protein production: computationally optimized DNA assembly (CODA) and translation engineering, *Biotechnol. Annu. Rev.*, **13**, 27-42, doi: 10.1016/S1387-2656(07)13002-7.
 29. Jestin, J. L., and Kempf, A. (2009) Optimization models and the structure of the genetic code, *J. Mol. Evol.*, **69**, 452-457, doi: 10.1007/s00239-009-9287-5.
 30. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.
 31. Handschumacher, R. E., Harding, M. W., Rice, J., Drugge, R. J., and Speicher, D. W. (1984) Cyclophilin: A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A, *Science*, **226**, 544-547, doi: 10.1126/science.6238408.
 32. Khromykh, L. M., Lazarev, V. N., Manuvera, V. A., Kalinina, A. A., Silaeva, Yu. Yu., et al. (2015) The strain of *Escherichia coli* BL21(DE3)Gold/pETmin-CypA is the producer of recombinant human cyclophilin A. Patent #2557305, Russian Federation.
 33. Kalinina, A., Zamkova, M., Antoshina, E., Trukhanova, L., Gorkova, T., et al. (2019) Analyses of the toxic properties of recombinant human cyclophilin A in mice, *J. Immunotoxicol.*, **16**, 182-190, doi: 10.1080/1547691X.2019.1665597.

**PREPARATIVE PRODUCTION AND PURIFICATION
OF RECOMBINANT HUMAN CYCLOPHILIN A****A. A. Kalinina¹, A. V. Kolesnikov², A. V. Kozyr², N. L. Kulikova³,
M. A. Zamkova¹, D. B. Kazansky¹, and L. M. Khromykh^{1*}**

¹ Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology"
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 115478 Moscow, Russia; e-mail: lkhromykh@list.ru

² Federal Budgetary Scientific Institution "State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology",
142279 Obolensk, Moscow Region, Russia

³ Open Joint-Stock Company "Institute of Immunological Engineering", 142380 Lyubuchany, Moscow Region, Russia

In this work, we developed a method of preparative production of recombinant human cyclophilin A (rhCypA) in *Escherichia coli*. The full-length cDNA encoded the gene of human CypA (CYPA) was amplified by RT-PCR from the total RNA of human T cell lymphoma Jurkat. The nucleotide sequence of CYPA was optimized to provide highly effective translation in *E. coli*. Recombinant CYPA DNA was cloned into the pET22b(+) vector, and the resulted expression plasmid was used to transform *E. coli* strain BL21(DE3)Gold. The recombinant producer strain of *E. coli* produced soluble rhCypA in the cytoplasm of the bacteria. The synthesis efficiency of rhCypA was up to 50% of the total cell protein allowing to produce rhCypA in the amount of 1 g per liter of the culture. We also developed the method for rhCypA purification, consisting of single-step tandem anion exchange chromatography on DEAE- and Q-Sepharose columns. The protein purity was 95% according to electrophoresis (SDS-PAGE), and its contamination with the endotoxin did not exceed 0,05 ng per 1 mg of the protein that met the requirements of European Pharmacopoeia to injectable preparations. The produced recombinant protein exhibited functional features of native CypA, i.e., isomerase activity and chemokine activity as assessed by stimulation of migration of mouse bone marrow hematopoietic stem cells *in vivo*. The generated producer strain of *E. coli* is a super-producer and could be used for large-scale experimental studies of rhCypA and its preclinical and clinical trials as a drug.

Keywords: cyclophilin A, gene optimization, producer strain, isomerase activity, chemokine activity