

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ХИМЕРНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА МВР-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019 В ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННОМ МАСШТАБЕ

© 2022 г. Е. А. Волосникова<sup>1, \*</sup>, Т. И. Есина<sup>1</sup>, Я. С. Гогина<sup>1</sup>,  
Т. А. Терещенко<sup>1</sup>, А. И. Сарпова<sup>1</sup>, Г. М. Левагина<sup>1</sup>, Е. Д. Даниленко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Новосибирская область, р.п. Кольцово, 630559 Россия

\*e-mail: volosnikova\_ea@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 11.07.2022 г.

После доработки 14.07.2022 г.

Принята к публикации 15.07.2022 г.

Определены оптимальные условия культивирования рекомбинантного штамма-продуцента *Escherichia coli* KRX/pMBP-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019 в жидкой питательной среде объемом от 10 до 400 л. В результате получена биомасса с содержанием целевого белка, МВР-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019, 22–30% и удельным выходом 3.4–4.3 г из 1 л культуральной жидкости. Разработана лабораторная методика выделения и очистки целевого белка. Проведена оптимизация и 40-кратное масштабирование разработанного процесса. Опытная-промышленная технология позволяет получать с 1 г влажной биомассы до 15–20 мг чистого белка, отвечающего требованиям к препаратам, получаемым с использованием рекомбинантных ДНК.

**Ключевые слова:** химерный белок, штамм-продуцент, культивирование, аффинная хроматография, ионообменная хроматография, масштабирование

**DOI:** 10.56304/S0234275822040159

В современной медицинской практике широкое применение в диагностике и терапии нашли биофармацевтические препараты на основе белков и пептидов, получаемые генно-инженерными способами. Пептиды до сих пор остаются привлекательными объектами в качестве терапевтических средств в связи с их безопасным фармакологическим профилем, хорошей переносимостью и эффективностью. Биотехнология производства пептидных препаратов на основе клеток прокариот характеризуется высокой рентабельностью и лишена многих сложностей, присущих биофармацевтическим производствам на основе эукариотических клеток [1].

Химерный рекомбинантный белок, содержащий последовательности белка нуклеопротеина (N) коронавируса-2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) и мальтозасвязывающего белка, – МВР-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019 – был сконструирован для использования в качестве носителя синтетических пептидных антигенов в вакцинах против COVID-19 [2]. В качестве проду-

цента использован бактериальный штамм *Escherichia coli* KRX, трансфицированный плазмидой pMBP-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019, в состав которой встроен ген, кодирующий целевой белок. Штамм KRX/pMBP-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019 создан в ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора [3].

Целью работы была разработка и масштабирование процесса получения химерного рекомбинантного белка МВР-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019 в качестве носителя пептидных антигенов.

### УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали штамм-продуцент *Escherichia coli* KRX/pMBP-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019 из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора (№ В-1379). Культивирование проводили в среде LB, г/л: пептон – 10, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 5.

### Получение биомассы клеток

Для приготовления посевного материала использовали рабочий банк клеток (РБК), который получали из производственного штамма, хранящегося в лиофилизованном виде в Главном банке

*Список сокращений:* КЖ – культуральная жидкость; РБК – рабочий банк клеток; ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид; ИФА – иммуноферментный анализ.

клеток ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора (Россия). Посевной материал получали засеваем аликвоты РБК в колбы с жидкой средой: LB-бульон с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл – и инкубацией их в термостате при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 18–20 ч.

Культивирование рекомбинантного штамма *E. coli* KRX/pMBP-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019 проводили в лабораторном ферментере LiFlus SL-15L (Biotron, Южная Корея) вместимостью 15 л с объемом питательной среды 10 л. Для масштабирования процесса использовали полупромышленный ферментер LiFlus SP-100L (Biotron) вместимостью 100 л, реактор РВД 350.423 (ООО “Артлайф”, Россия) и реактор 205-394 (“Химмаш”, Россия) вместимостью 350 и 630 л соответственно. Объем питательной среды составлял 70–80% от вместимости ферментеров. Посевной материал вносили в количестве, составляющем 2% от объема питательной среды. Ферментацию вели при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  с работающей мешалкой (100 об/мин) и подачей стерильного воздуха  $0,8 \text{ л} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$  до середины логарифмической фазы роста штамма. Затем культуральную жидкость (КЖ) охлаждали до температуры  $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ , вносили индукторы: изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) и L-рамнозу – и продолжали культивирование при заданной температуре, не меняя другие параметры. В процессе ферментации контролировали рост штамма по оптической плотности ( $\text{OD}_{550}$ ) и потреблению кислорода. Культивирование заканчивали в конце логарифмической–начале стационарной фазы роста. Биомассу отделяли центрифугированием на проточной центрифуге Z41 (CERA, Германия) при 15000 g со скоростью потока 60 л/ч. Влажную биомассу взвешивали и рассчитывали выход с 1 л КЖ (г/л).

#### *Анализ содержания целевого белка*

Содержание целевого рекомбинантного белка в биомассе определяли методом электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (ДСН-ПААГ) с окрашиванием Ку-масси G-250 и последующим денситометрическим сканированием. Относительное содержание белка определяли с использованием системы визуализации GelDoc Go с программным обеспечением Image Lab (Bio-Rad Laboratories, США).

#### *Очистка целевого белка*

Полученную биомассу подвергали дезинтеграции, контролируя падение оптической плотности при длине волны 595 нм ( $\text{OD}_{595}$ ) до 30–35% от исходного значения. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием на высокоскоростной центрифуге Avanti J-30I (Beckman Coulter, США) при 10000 g и  $4^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Дополни-

тельное осветление и частичное освобождение от клеточных эндотоксинов проводили, используя для их осаждения жидкий сорбент Ammofloc-25 (“Физлабприбор”, Россия), который добавляли к супернатанту, содержащему целевой белок, в соотношении 1 : 10 (сорбент : супернатант). Осаждение вели в течение ночи при  $4^\circ\text{C}$ . Осадок отделяли центрифугированием в тех же условиях.

По лабораторной методике осветленный супернатант, содержащий целевой белок, очищали аффинной хроматографией на ИМАС-сефарозе (Cytiva, Швеция) на хроматографе Akta Pure 150 (скорость подвижной фазы до 35 мл/мин). Целевой белок элюировали раствором, содержащим 50 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,3 М NaCl, 0,5 М имидазол, pH 8,0. Доочистку белка проводили жидкостной ионообменной хроматографией. Фракцию целевого белка, полученную в результате аффинной хроматографии, наносили на соединенные последовательно колонки с анионообменной смолой Q-сефарозой (Cytiva) и катионообменной смолой SP-сефарозой (Cytiva), уравновешенными 50 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 8,0. После нанесения всего объема целевой фракции продолжали промывку колонок тем же буфером до показания 10 mAU по оптической плотности. Отсоединяли колонку с Q-сефарозой и проводили элюцию целевого белка с SP-сефарозы линейным градиентом NaCl от 0,1 до 1,0 М в буфере 50 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 8,0.

При масштабировании технологии хроматографическую очистку вели на хроматографе Akta Pilot (скорость подвижной фазы до 200 мл/мин). На этапе аффинной хроматографии успешно осуществлен перенос и воспроизведение лабораторной методики аффинной хроматографии в условиях опытно-промышленного производства. С целью оптимизации технологии ионообменной хроматографии и доочистки целевого белка от примеси эндотоксинов колонку с SP-сефарозой после нанесения целевого белка промывали раствором, содержащим 50 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Tergitol 15-S-9, pH 8,9, после чего продолжали промывку буфером 50 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 8,9, до показания 10 mAU по оптической плотности. Отсоединяли колонку с Q-сефарозой и проводили элюцию целевого белка с SP-сефарозы ступенчатым градиентом NaCl от 0,1 до 1,0 М в буфере 50 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 8,9.

Полученный в результате очистки препарат стерилизовали с использованием 0,22-микрометрового фильтра (Corning, США) и хранили при  $-20^\circ\text{C}$ .

#### *Методы определения содержания примесей*

Содержание остаточных белков штамма-производителя определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора *E. coli* HCP ELISA kit (96 tests) F410 (Cygnus Technologies, США) согласно рекомендациям производителя.

Содержание остаточной ДНК штамма-производителя определяли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием набора *E. coli* Host Cell DNA Extraction and Amplification Kit in Tubes (#D415T; Cygnus Technologies) по протоколу производителя.

Содержание бактериальных эндотоксинов определяли проведением ЛАЛ-теста методом качественного гель-тромб теста (метод А) с использованием эндотоксинспецифичного ЛАЛ-реактива Pyrogstar ES-F (5.2 мл/флакон), чувствительность 0.125 ЕЭ/мл (FUJIFILM Wako Chemicals, США) в соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи (ОФС) “Бактериальные эндотоксины” [4].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Получение биомассы штамма-производителя, содержащей целевой белок

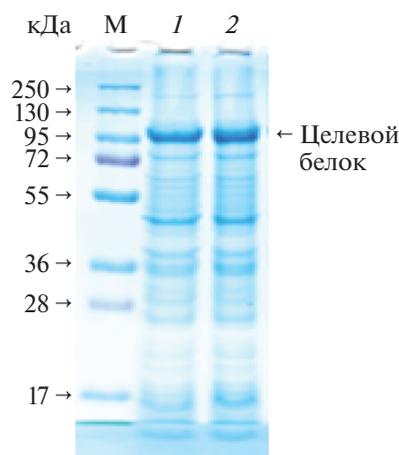
В результате проведенной работы определены оптимальные условия культивирования штамма-производителя *E. coli* KRX/pMBP-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019 в ферментерах вместимостью от 15 до 630 л: коэффициент заполнения средой 0.7–0.8; подача воздуха  $0.8 \text{ л} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ ; скорость вращения мешалки 100 об/мин, температура  $(37.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$  до  $\text{OD}_{550}$  1.0–1.2, затем охлаждение КЖ до  $(24.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$  подачей воды в рубашку ферментера. После охлаждения КЖ вносили индукторы (ИПТГ до конечной концентрации 0.1 мМ и L-рамнозу до конечной концентрации 0.1%) и продолжали культивирование при температуре  $(24.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$  в течение 5–6 ч до начала стационарной фазы.

Культивирование при этих условиях масштабирования позволило получить образцы биомассы с содержанием целевого белка 22–30%. Выход биомассы составлял 3.4–4.3 г из 1 л КЖ в ферментере вместимостью 100 л и 3.2–3.6 г из 1 л КЖ в реакторах вместимостью 350 и 630 л, что сопоставимо с полученным при культивировании в 15-литровом лабораторном ферментере.

На рис. 1 приведены электрофореграммы образцов биомассы штамма *E. coli* KRX/pMBP-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019, полученных при культивировании в ферментерах вместимостью 100 и 630 л. Содержание целевого белка с молекулярной массой  $90 \pm 5$  кДа находится в диапазоне от 22 до 30%.

### Очистка целевого белка

При получении иммунобиологических препаратов из бактериальных клеток проблема очистки от эндотоксинов остается актуальной задачей. Очистку полупродукта от эндотоксинов проводят на каждой стадии технологического процесса.



**Рис. 1.** Электрофореграмма образцов биомассы *E. coli* KRX/pMBP-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019. Биомасса получена при культивировании в 100-литровом ферментере (1) или 630-литровом ферментере (2). Электрофорез проведен в 10%-ном ДСН-ПААГ, полученный гель окрашен Кумасси G-250. М – маркер молекулярной массы белков (#26619, Thermo Fisher Scientific, США).

**Fig. 1.** Electrophoregram of *E. coli* KRX/pMBP-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019 biomass samples obtained by cultivation in a 100-liter fermenter (1) or 630-liter fermenter (2). Electrophoresis was performed in 10% SDS-PAAG, and the gel was stained with Coomassie G-250. M – protein molecular weight marker (#26619, Thermo Fisher Scientific, USA).

При разработке лабораторной методики очистки целевого белка биомассу разрушали воздействием ультразвука на дезинтеграторе Sonicator Q2000 (Qsonica, США) при 22 кГц до снижения  $\text{OD}_{595}$  до 30–35% от исходного значения. При масштабировании процесса разрушение биомассы проводили гомогенизатором высокого давления Pony NS2006L (GEA, Италия) при давлении 800–1200 бар до снижения  $\text{OD}_{595}$  до 30–35% от исходного значения. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием при 10000 g и  $4^\circ\text{C}$  в течение 30 мин.

В разработанной лабораторной методике грубую очистку супернатанта после центрифугирования проводили осаждением белка сульфатом аммония. При оптимизации и масштабировании процесса для предварительной очистки от отрицательно заряженных эндотоксинов и остатков клеточного дебриса применяли жидкий сорбент Amtofloc-25, который сорбирует примеси анионов, с последующим отделением полученного осадка от целевого продукта центрифугированием (10000 g, 30 мин,  $4^\circ\text{C}$ ). Это позволило отказаться от использования сульфата аммония и получить более чистый полупродукт на данной стадии.

Известно, что значительная часть эндотоксинов связана с целевым белком электростатическим взаимодействием. Для их удаления проводили доочистку белка ионообменной хроматографией. В

**Таблица 1.** Сравнительная характеристика образцов целевого белка, полученных по лабораторной и опытно-промышленной технологии**Table 1.** Comparative data of target protein samples obtained by laboratory and pilot industrial technologies

Технология	[С] <sup>a</sup> , мг/мл	Примеси				Выход <sup>f</sup> , мг/1 г
		всего <sup>b</sup> , %	белки <sup>c</sup> , нг/мг	ДНК <sup>d</sup> , пг/мг	ЭТ <sup>e</sup> , ЕЭ/мг	
Требования ОФС Государственной фармакопеи РФ XIV изд.	≥5	≤5	≤200	≤100	≤40	≥2
Лабораторная технология	5–7	10–17	78.4	2.06	40–100	4–6
Опытно-промышленная технология	15–25	2–4	2.16	0.004	<40	15–20

*Примечание:* <sup>a</sup> Концентрация целевого белка; <sup>b</sup> суммарное содержание примесей; <sup>c</sup> остаточные белки штамма-продуцента; <sup>d</sup> остаточная ДНК штамма-продуцента; <sup>e</sup> содержание бактериальных эндотоксинов; <sup>f</sup> выход целевого белка из 1 г биомассы.  
*Note:* <sup>a</sup> Concentration of the target protein; <sup>b</sup> total content of impurities; <sup>c</sup> residual proteins of the producer strain; <sup>d</sup> residual DNA of the producer strain; <sup>e</sup> content of bacterial endotoxins; <sup>f</sup> yield of the target protein from 1 g of biomass.

лабораторной технологии эту процедуру вели каскадной хроматографией на последовательно соединенных колонках с анионо- и катионообменными смолами (Q- и SP-сефароза соответственно) при pH 8.0. При оптимизации процесса очистки хроматографию проводили при pH 8.9 – в этих условиях заряд целевого белка меньше, чем при pH 8.0, и составляет 5.8 против 13. Заряд белка был определен по аминокислотной последовательности в программе ProteinCalculator v3.4 [5].

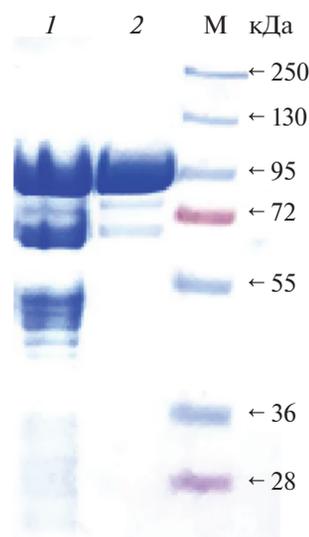
При pH 8.9 ослабевает связывание положительно заряженного белка с отрицательно заряженными эндотоксинами. Для удаления эндотоксинов проводили промывку сорбировавшегося на SP-сефарозе белка буферным раствором, содержащим детергент Tergitol 15-S-9, pH 8.9. Затем колонку промывали и проводили элюцию целевого белка ступенчатым градиентом NaCl от 0.1 до 1.0 М в буфере 50 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.9.

В результате масштабирования технологии получения и очистки химерного рекомбинантного белка МВР-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019 производительность процесса увеличилась в 40 раз (выход с одного процесса увеличился с 750 мг до 30 г целевого белка). Концентрация белка в полученных сериях составила 15–25 мг/мл. Сравнительные характеристики белка в разных сериях представлены в табл. 1 и на рис. 2. Показано, что разработанная опытно-промышленная технология позволяет получать до 15–20 мг белка с чистотой 96–98% из 1 г влажных клеток.

Таким образом, нами проведена оптимизация и масштабирование процессов наработки, выделения и очистки химерного рекомбинантного белка МВР-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019 – потенциального носителя пептидных антигенов. Показано, что полученные препараты соответствуют требованиям общей фармакопейной статьи “Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК”, предъявляемым к рекомбинантным белкам, и, следовательно, могут быть использованы в производстве биопрепаратов, в том числе вакцин [6].

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам лаборатории контроля качества препаратов ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора: Ю.В. Телегиной, М.В. Алексеевой, Н.Г. Мотовиловой – за проведение экспериментов по определению содержа-



**Рис. 2.** Электрофореграмма очищенного целевого белка. Электрофорез в 15%-ом ДСН-ПААГ, окрашивание Кумасси G-250. На дорожки нанесено 40 мкг образца, полученного по лабораторной (1) и по опытно-промышленной (2) технологии. М – маркер молекулярной массы белков (#26619, Thermo Fisher Scientific).

**Fig. 2.** Electrophoregram of the purified target protein in 15% SDS-PAAG. 40 µg of the sample obtained using the laboratory (1) and pilot (2) technologies were applied to the tracks. M – protein molecular weight marker (#26619, Thermo Fisher Scientific).

ния остаточной ДНК штамма-производителя и эндотоксинов; сотруднику отдела биологических испытаний О.Н. Каплиной за определение содержания остаточных белков штамма-производителя.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках научно-исследовательских работ, проводимых по Распоряжению № 103-р Правительства Российской Федерации от 22 января 2021 года.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Есинов Р.С.* Методология биотехнологического получения рекомбинантных пептидов медицинского назначения. Дис. д-ра химических наук, ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” Российской академии наук, Москва, 2019, 224 с.
2. *Рыжиков А.Б., Рыжиков Е.А., Богрянцева М.П., Гаврилова Е.В., Даниленко Е.Д., Имамдинов И.Р., Максюттов Р.А., Нецаева Е.А., Попова А.Ю., Пьянков О.В., Пьянкова О.Г., Суслонпаров И.М.* Пептидные иммуногены и вакцинная композиция против коронавирусной инфекции COVID-19 с использованием пептидных иммуногенов. Патент RU2738081, бюллетень № 34, опублик. 07.12.2020.
3. *Имамдинов И.Р., Бочкарева М.Д., Прудникова Е.Ю., Тишин А.Е., Пьянков О.В., Гаврилова Е.В., Максюттов Р.А.* Искусственный ген, кодирующий бициклонную структуру, образованную последовательностями рецептор-связывающего домена гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2, Р2А-пептида и гликопротеина G VSV, рекомбинантная плазмида pStem-rVSV-Stb1\_RBD\_SC2, обеспечивающая экспрессию искусственного гена и рекомбинантный штамм вируса везикулярного стоматита rVSV-Stb1\_RBD\_SC2, используемого для создания вакцины против коронавируса SARS-CoV-2. Патент RU2733831, бюллетень № 38, опублик. 07.10.2020.
4. ОФС.1.2.4.0006.15 Бактериальные эндотоксины. *Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание*, 2018, т. 1, 1233–1243. <https://femb.ru/record/pharmacopea14>; <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol1/1251/>
5. ProteinCalculator v3.4, <http://protecalc.sourceforge.net>
6. ОФС.1.7.1.0007.15 Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК. *Государственная фармакопея Российской Федерации, XIV издание*, 2018, т. 2, 2575–2595. <https://femb.ru/record/pharmacopea14>; <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol2/763/>

### Development of a Pilot Technology for Producing a Chimeric Recombinant Protein MBP-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019

E. A. Volosnikova<sup>a, #</sup>, T. I. Esina<sup>a</sup>, Ya. S. Gogina<sup>a</sup>,  
T. A. Tereshchenko<sup>a</sup>, A. I. Sarpova<sup>a</sup>, G. M. Levagina<sup>a</sup>, and E. D. Danilenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Novosibirsk oblast, Koltsovo settl., 630559 Russia

<sup>#</sup>e-mail: volosnikova\_ea@vector.nsc.ru

**Abstract**—The optimal conditions for cultivation the recombinant producer strain of *Escherichia coli* KRX/pMBP-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019 in a volume of liquid nutrient medium from 10 to 400 L were determined. As a result, biomass containing 22–30% of the target MBP-6×His-N<sub>n</sub>CoV-2019 protein was obtained, and the yield of the purified product was 3.4–4.3 g per 1 L of culture fluid. A laboratory technology for isolation and purification of the target protein was developed; optimization and 40-fold scaling of the developed process were carried out. The pilot industrial technology makes it possible to produce up to 15–20 mg of pure protein from 1 g of wet biomass; the product meets the requirements for drugs obtained using recombinant DNA.

**Keywords:** chimeric protein, producer strain, cultivation, affinity chromatography, ion exchange chromatography, scaling