

ОСТАТОК ГЛИЦИНА НА N-КОНЦЕ РЕКОМБИНАНТНОГО GM-CSF НЕ СНИЖАЕТ ЕГО ГРАНУЛОЦИТОЭЗСТИМУЛИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ

© 2025 г. Е. А. Волосникова¹, *, Н. В. Волкова¹, Я. С. Гогина¹,
Т. И. Есина¹, Г. Г. Шимина¹, Е. Д. Даниленко¹, Д. Н. Щербаков¹

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

*e-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 03.12.2024 г.

После доработки 27.01.2025 г.

Принята к публикации 30.01.2025 г.

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) – цитокин, регулирующий пролиферацию и дифференцировку нейтрофилов и макрофагов, обладает иммуномодулирующими и адьювантными свойствами. Использование препаратов rhGM-CSF в клинической практике ограничено низкой продуктивностью штаммов-продуцентов. Сконструирован плазмидный вектор, обеспечивающий в клетках *Escherichia coli* синтез химерного белка, включающего rhGM-CSF и глутатион-S-трансферазу или тиоредоксин. Для получения целевой рекомбинантной плазмиды в составе плазмиды pET21 одновременно клонировали нуклеотидную последовательность глутатион-S-трансферазы или тиоредоксина и rhGM-CSF таким образом, чтобы при синтезе слитого белка между последним и белками-партнерами был сайт протеолиза TEV протеазы. Подобраны условия культивирования штаммов *E. coli* BL 21(DE3)/pET-GST-6His-GM и *E. coli* BL 21(DE3)/pET-Tx-6His-GM, позволяющие получать в биомассе не менее 30% слитого белка, с выходом влажной биомассы от 3.5 г до 3.8 г с 1 л культуральной жидкости. Показано, что гемостимулирующая активность полученного белка rhGM-CSF, обладающего одним дополнительным аминокислотным остатком глицина на N-конце, сравнима с эталонным препаратом. Предложенный подход позволяет получать препарат rhGM-CSF с высоким выходом и чистотой более 95%.

Ключевые слова: рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека, слитый белок, штамм-продуцент, культивирование, хроматография, гемостимулирующая активность

DOI: 10.56304/S0234275825010120

Актуальной проблемой всемирного здравоохранения является болезнь Альцгеймера. В связи со старением населения, число случаев этого заболевания неуклонно растет и, по прогнозам, к 2050 г доля живущих с этой болезнью может достичь 1/85 от общей численности населения [1]. В настоящее время ведется активная работа по поиску лекарственных средств, способных предотвращать развитие симптомов этого заболевания. Одним из препаратов, показавших многообещающие результаты, является Sargramostim, полученный на основе рекомбинантного GM-CSF че-

ловека [2]. Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) – это белок-цитокин, регулирующий пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток-предшественников гранулоцитов и моноцитов/макрофагов, а также обеспечивающий активацию зрелых нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов [3]. Есть данные о наличии у этого белка иммуномодулирующих и адьювантных свойств [4]. Человеческий GM-CSF, длиной 144 аминокислотных остатка, представляет собой одобренный FDA цитокин, используемый для лечения иммунодефицита в случаях нейтропении различной этиологии, острого миелолейкоза и при трансплантации костного мозга [5].

Для получения рекомбинантного GM-CSF человека описано применение нескольких систем экспрессии, в том числе, прокариоты *Escherichia coli* [6], дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* [7] и клетки млекопитающих CHO [8]. Опубликована инфор-

Список сокращений: rhGM-CSF – рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека; SDS – додецилсульфат натрия; ИПТГ – изопропил-D-1-тиогактопиранозид; ОП – оптическая плотность; ПААГ – полиакриламидный гель; ТВ – тельца включения; ФСБ – фосфатно-солевой буфер. ДТТ – дитиотреитол, GST – глутатион-S-трансфераза, Tx – тиоредоксин.

мация и о более экзотических системах, например, использование рекомбинантного вируса осповакцины [9]. Несмотря на отсутствие посттрансляционных модификаций у *E. coli* (за исключением генно-модифицированных штаммов), важных для получения эукариотических белков, эта система экспрессии может быть использована для промышленного получения rhGM-CSF. Прежде всего, это связано с достаточно высоким выходом, до 10 мг высокоочищенного белка с 1 г биомассы клеток [6], при этом, накопление rhGM-CSF, как правило, происходит в неактивной форме в тельцах включения, что требует проведения процедуры ренатурации [10]. Однако, указанные значения продуктивности могут быть не предельными и возможно дальнейшее их повышение, например, за счет использования технологии слитых белков. Суть этой технологии состоит в том, что целевой белок экспрессируется слитым с дополнительным белком. Повышение выхода может достигаться за счет защиты целевого белка от деградации и ускорения фолдинга. По этой же причине использование разных белков-партнеров увеличивает эффективность процессов ренатурации. За время применения этого подхода для экспрессии различных белков эмпирическим путем отобран ряд белков-партнеров слияния, способных выступать в качестве шаперонов, среди которых мальтозасвязывающий белок (MBP), глутатион-S-трансфераза (GST), тиоредоксин (Trx) [11, 12].

Цель нашей работы состояла в конструировании рекомбинантных плазмид, обеспечивающих синтез слитых белков, включающих, кроме GM-CSF человека, белки партнеры GST и Trx, а также в разработке способа получения биологически активного препарата целевого белка.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Конструирование плазмиды и получение биомассы клеток штамма-продуцента

Для конструирования рекомбинантных плазмид pET-GST-6His-GM и pET-Trx-6His-GM использовали последовательность гена, кодирующего гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GenBank M11220). Оптимизацию нуклеотидной последовательности проводили при помощи онлайн инструмента Codon Optimisation Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/codon-optimization-tool>). Синтез гена в составе плазмиды pGH, а также синтез праймеров для ПЦР были выполнены ООО “ДНК-Синтез” (Россия).

Аmplификацию нуклеотидных последовательностей GST, Trx и GM проводили при помощи трех пар праймеров:

- GM-GST-F 5'-gatatacatatgtcccctatactagggtatttg-gaaaatt-3', GM-GST-R 5'-accttgaaaataagattttcttttg-gaggatggtcgccac-3',

- TRX-F 5'-gagatatacatatgagcgataaaattattcacct-gactg-3', TRX-R 5'-gcaccttgaaaataagattttcatggtgatg-gtgatgatggccagaaccagaaccggcc-3',

- и TEV-GM-F 5'-gaaaatcttttttcaaggtgcaccggcac-gtagcccgca-3', MG-R 5'-aaaaaagcggcgccttattctgaacagg-3', соответственно.

В случае гена GM-CSF в качестве матрицы использовали плазмиду pGH-GM, в случае GST – плазмиду pGEX-4T-1, для Trx – плазмиду pET32a.

ПЦР-продукт GST (или Trx) и GM-CSF смешивали и проводили перекрывающуюся амплификацию с использованием фланкирующих праймеров. Полученный ПЦР-продукт и вектор pET21a(-) обрабатывали рестриктазами FauNDI и CciNI (ООО “СибЭнЗайм”, Россия). Далее продукты гидролиза смешивали и лигировали при помощи ДНК-лигазы бактериофага T4 (ООО “СибЭнЗайм”) в течение 30 мин при комнатной температуре. Трансформацию компетентных клеток *E. coli* штамм NEB Stable (New England Biolabs, США) продуктами лигирования проводили по методу Heat-shock. Наличие встройки подтверждали рестрикционным анализом и секвенированием по методу Сэнгера (данные не представлены). После подтверждения наличия встройки плазмидами pET-GST-6His-GM и pET-Trx-6His-GM трансформировали клетки *E. coli* штамм BL 21(DE3).

Клетки продуцентов *E. coli* BL 21(DE3)/pET-GST-6His-GM или *E. coli* BL 21(DE3)/pET-Trx-6His-GM выращивали на LB-агаре с ампициллином (neoFroxx, Германия) (100 мкг/мл) при 37°C в течение 18–20 ч. Затем переносили петлей в жидкую среду LB (по Ленноксу) (1% бактотриптона (BioFroxx, Германия), 0.5% дрожжевого экстракта (ProCel 251MG, Франция), 0.5% NaCl (ООО “МЗХР”, Россия), pH 7.2) с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) и инкубировали на качалке (Excella E 25, Германия) при 37°C в течение 18–20 ч (ночная культура). Ночную культуру пересевали в колбы, содержащие LB-бульон в соотношении 1 : 100. Инкубацию проводили при 37°C в условиях непрерывного перемешивания (180 об/мин), контролируя оптическую плотность культуры (ОП) при длине волны 550 нм. Индукцию синтеза целевого белка осуществляли внесением изопропил-D-1-тиогактопиранозид (ИПТГ) (Anatrace Products, США) с концентрацией стока 0.1 mM при достижении ОП₅₅₀ = 0.9–1.2 о.е. и продолжали культивирование до начала стационарной фазы роста. После окончания культивирования клетки собирали центрифугированием в течение 15 мин (7500 g), 4°C на центрифуге Awel MF 48-R (Domel, Словения).

Анализ содержания целевого белка

Образцы биомасс анализировали методом электрофореза в денатурирующих условиях в 12%-ном

полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS) (Applichem, Германия), гель окрашивали раствором кумасси R-250 (Applichem). Содержание целевого белка в бактериальных клетках оценивали денситометрией гелей с использованием системы визуализации GelDoc Go с ПО Image Lab (Bio-Rad Laboratories, США).

Очистка целевого белка

Образцы биомассы (10 г влажных клеток) суспендировали в 100 мл буферного раствора 20 мМ Трис-НСl (Applichem), pH 8.0, содержащего ингибитор протеаз – 1 мМ фенолметилсульфонил-фторида (PMSF) (GERBU, Германия), разрушали ультразвуком на Sonicator Q2000 (Qsonica, США). Тельца включения (ТВ) отделяли центрифугированием на центрифуге Avanti J-30I (Beckman Coulter, США) при (21612 g), $4 \pm 2^\circ\text{C}$, 30 мин. Отмывку ТВ проводили с использованием 150 мл раствора 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0, содержащего 5 мМ ЭДТА (неоFroxx) либо 0.5% Тритон X-100 (Applichem). Денатурацию белка проводили в 100 мл 8 М мочевины (неоFroxx) в 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0. Ренатурацию – разбавлением в 10 раз до 1 л буфером 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0.

Для очистки GST-6His-GM проводили аффинную хроматографию на колонке с Glutathione Sepharose 4FF (SunResin, Китай), объемом 10 мл, уравновешенной фосфатно-солевым буфером (ФСБ, Gibco, Великобритания), pH 7.6. Слитый белок элюировали раствором, содержащим 10 мМ глутатиона-L восстановленного (Applichem), в ФСБ, pH 7.6. Полученный слитый белок GST-6His-GM, а также белок Tgх-6His-GM (полученный из отмываемых телец включения) расщепляли TEV-протеазой (TEVp) (ООО “Биолабмикс”, Россия).

Для очистки rhGM-CSF от Tgх, GST и TEV использовали аффинную хроматографию на колонке с IMAC-сефарозой объемом 8 мл (Cytiva, Швеция), уравновешенной 20 мМ имидазолом, 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0. Элюцию целевого белка производили градиентом имидазола от 20 мМ до 500 мМ в буферном растворе 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0 десятью колоночными объемами, со скоростью 1 мл/мин. Анализ целевого белка проводили методом электрофореза в 15%-ном ПААГ в нередуцирующих условиях с окрашиванием кумасси R-250.

Определение концентрации белка на всех стадиях технологического процесса осуществляли методом Лоури. Чистоту полупродукта и конечного препарата определяли методом электрофореза в 15%-ном ПААГ в нередуцирующих условиях с окрашиванием Кумасси R-250. Содержание целевого белка оценивали денситометрией гелей с использованием системы визуализации GelDoc Go с ПО Image Lab (Bio-Rad Laboratories).

Анализ аминокислотной последовательности rhGM-CSF

Для анализа аминокислотной последовательности rhGM-CSF 5 мг лиофилизованного белка растворяли в 300 мкл буфера для денатурации (7 М мочевины, 50 мМ Трис-НСl, pH 8.0). Инкубировали раствор в течение 30 мин при 95°C . Добавляли DTT (BioFroxx) до финальной концентрации 4 мМ и продолжали инкубацию 30 мин при 95°C . Раствор охлаждали до комнатной температуры и добавляли раствор йодацетамида (неоFroxx) до финальной концентрации 15 мМ. Инкубировали раствор в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. К раствору добавляли 1200 мкл буфера 50 мМ Трис-НСl, pH 8.0.

К 1500 мкл полученного раствора добавляли 10 мкг трипсина класса “Sequencing grade” (Promega, США). Инкубировали смесь белка с ферментом в течение 18 ч при 37°C . Для хроматографического разделения продуктов гидролиза использовали колонку C18, $2.1 \times 150 \text{ mm } 2.7 \text{ Micron}$, Advanced Bio Peptide Plus (Agilent, США). Система растворителей: буфер А – вода, 0.1%, муравьиная кислота (Sigma, США), элюция буфером Б – ацетонитрил, 0.1%, муравьиная кислота, скорость потока 0.2 мл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием времяпролетного масс-спектрометра LC/qTOF 6530 (Agilent). Анализ MS2 спектров проводили в программе Comet Asay (Великобритания) [13].

Оценка специфической (гранулоцитпоэзстимулирующей) активности

Гемостимулирующую активность изучали на модели цитостатической миелосупрессии, вызванной введением мышам циклофосфамида (Sigma-Aldrich, США). Было использовано 18 самцов мышей линии СВА, с массой тела 20–24 г (возраст 2.5–3.0 месяца), полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Новосибирской области). Содержание животных и экспериментальные исследования проводили в соответствии требованиями Международной конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей (Страсбург, 1986 год), а также с соблюдением Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Исследования были одобрены Биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора (протокол № 2 от 14.02.2024 г.).

Для воспроизведения модели всем животным однократно внутрибрюшинно вводили циклофосфамид в дозе 200 мг/кг. Через сутки животным опытных групп начинали курс подкожных инъек-

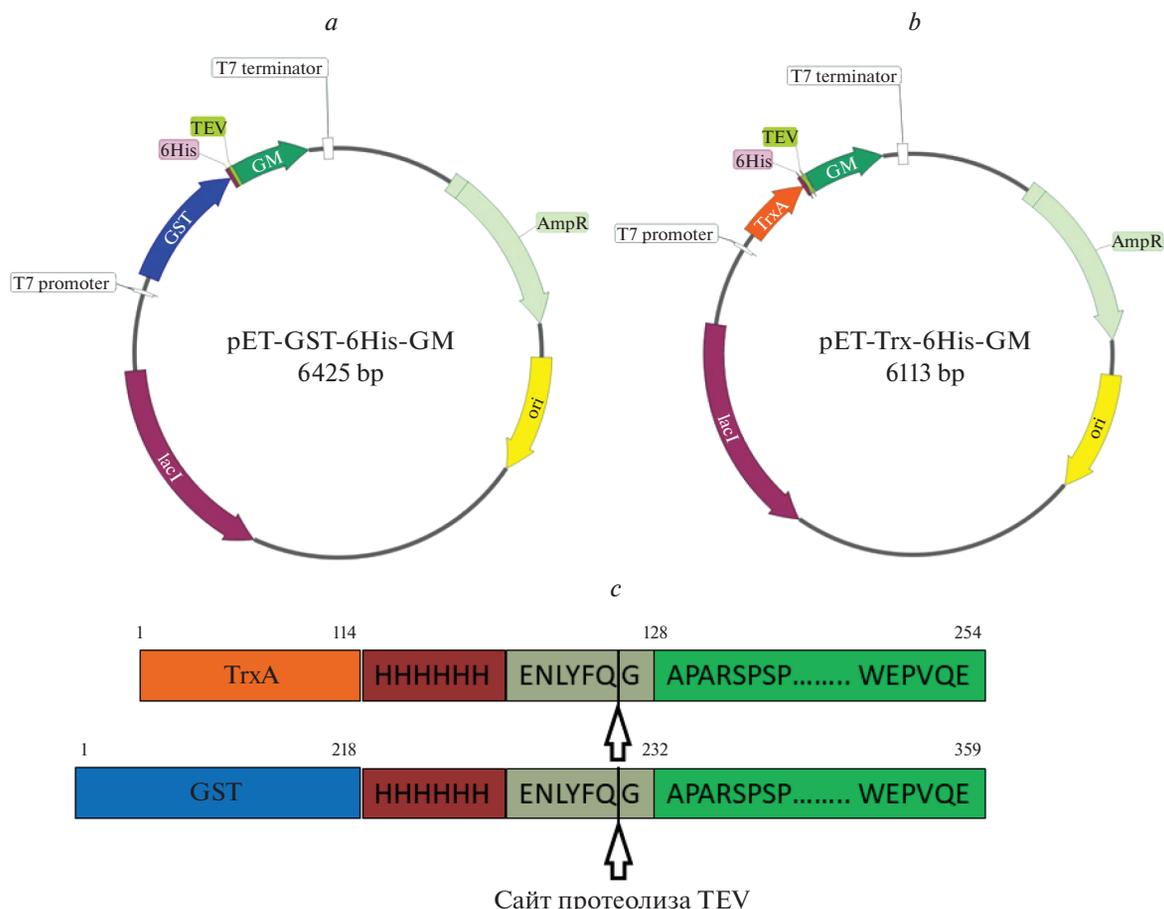


Рис. 1. *a* – Карта плазмиды pET-GST-6His-GM. *b* – Карта плазмиды pET-Trx-6His-GM. *c* – Схема слитых белков GST-6His-GM и Trx-6His-GM.

Fig. 1. *a* – Map of the pET-GST-6His-GM plasmid. *b* – Map of the pET-Trx-6His-GM plasmid. *c* – Scheme of the GST-6His-GM and Trx-6His-GM fusion proteins.

ций препарата rhGM-CSF, полученного в данном исследовании, и препарата сравнения – рекомбинантного rhGM-CSF, полученного по технологии, описанной в [6]. Препараты rhGM-CSF вводили в дозе 90 мкг/кг, которая была определена как эффективная гемостимулирующая в проведенных нами ранее экспериментах [14]. На пятые сутки у животных забирали на анализ образцы крови из кончика хвоста. В образцах крови определяли общее количество лейкоцитов и рассчитывали лейкоцитарную формулу [15]. Уровень гемостимулирующей активности препаратов рассчитывали, как отношение абсолютного числа сегментоядерных нейтрофилов крови опытных животных к абсолютному числу сегментоядерных нейтрофилов контрольных животных (в процентах). Полученные результаты обрабатывали с помощью пакета программ “Statgraphics, Vers.5.0” (Statistical Graphics Corp., США). В связи с малыми объемами выборок для оценки значимости межгрупповых различий применяли непараметрический U-критерий

Манна–Уитни с критическим уровнем статистической значимости (p), равным 0.05 [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантных плазмид

Первым этапом работы стало получение рекомбинантных плазмид, способных обеспечить синтез химерных белков. Для их конструирования была выбрана система pET на основе промотора бактериофага T7. После клонирования и трансформации был проведен отбор клонов. Нуклеотидные последовательности полученных рекомбинантных плазмид pET-GST-6His-GM и pET-Trx-6His-GM (рис. 1) подтверждались секвенированием по Сэнгеру.

Штаммы-продуценты слитых белков были получены трансформацией плазмиды pET-GST-6His-GM и pET-Trx-6His-GM клеток *E. coli* штамма BL21С. Культивирование штаммов-продуцентов *E. coli* BL 21(DE3)/pET-GST-6His-GM и

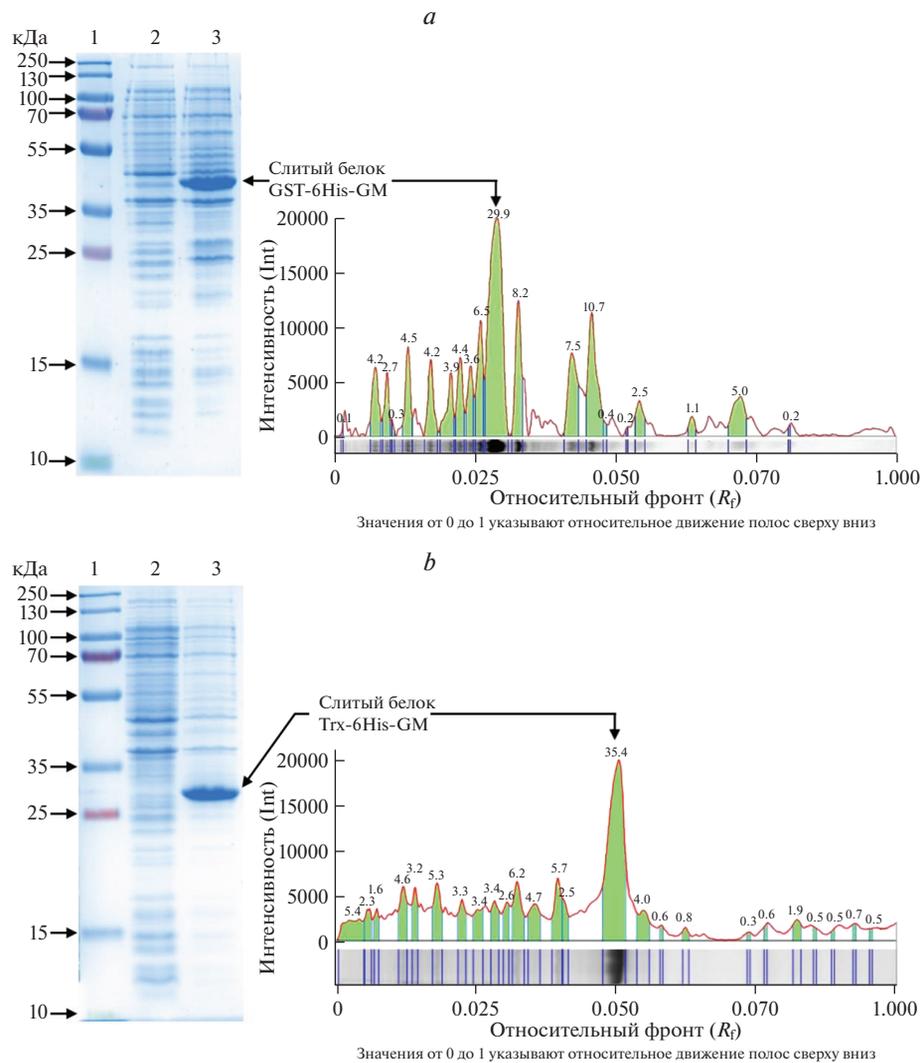


Рис. 2. Электрофореграмма и денситограмма лизатов клеток биомассы штаммов-продуцентов. *a* – Штамм *E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM. Электрофорез в 12%-ном ПААГ, 1 – маркер молекулярных масс белков (10–250 кДа); 2 – лизат клеток биомассы *E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM до индукции ИПТГ; 3 – лизат клеток биомассы *E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM через 6 ч индукции ИПТГ. *b* – Штамм *E. coli* BL21/pET-Trx-6His-GM. Электрофорез в 12% ПААГ, 1 – маркер молекулярных масс белков (10–250 кДа); 2 – лизат клеток биомассы *E. coli* BL21/pET-Trx-6His-GM до индукции; 3 – лизат клеток биомассы *E. coli* BL21/pET-Trx-6His-GM через 6 ч индукции ИПТГ.

Fig. 2. Electrophoregram and densitogram of biomass cell lysates of the producer strains. *a* – *E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM strain. Electrophoresis in 12% PAGE, 1 – protein molecular weight marker (10–250 kDa); 2 – *E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM biomass cell lysate before induction; 3 – *E. coli* BL21/pET-GST-6His-GM biomass cell lysate after 6 h of IPTG induction. *b* – *E. coli* BL21/pET-Trx-6His-GM strain. Electrophoresis in 12% PAGE, 1 – protein molecular weight marker (10–250 kDa); 2 – *E. coli* BL21/pET-Trx-6His-GM biomass cell lysate before induction; 3 – *E. coli* BL21/pET-Trx-6His-GM biomass cell lysate after 6 h of IPTG induction.

E. coli BL 21(DE3)/pET-Trx-6His-GM после добавления индуктора ИПТГ в течение 5–6 ч обеспечило накопление целевых белков в ТВ. По данным электрофореза, уровень экспрессии слитого белка GST-6His-GM с молекулярным весом 45 ± 0.5 кДа достигал 30% от суммы клеточных белков, белка Trx-6His-GM молекулярным весом 31 ± 0.5 кДа – 35% (рис. 2), при этом выход влажной биомассы составлял 3–4 г с 1 л культуральной жидкости.

Выделение и очистка белка

Для выделения белков полученную суспензию клеток продуцентов подвергали дезинтеграции до снижения оптической плотности при 595 нм (OP_{595}) на 50% от исходного значения. После выделения, отмывки ТВ, денатурации и ренатурации чистота слитых белков в полученном препарате уже превышала 70%. Для очистки белка GST-6His-GM было решено провести аффинную хроматогра-

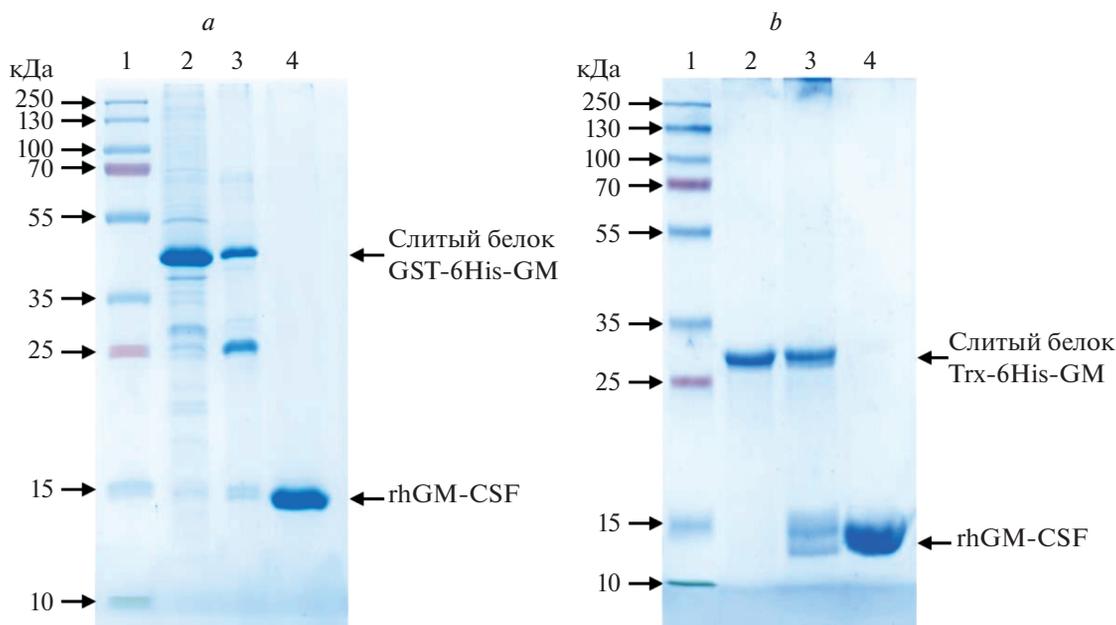


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов очистки белка rhGM-CSF, *a* – 15%-ный ПААГ, невозстанавливающие условия. 1 – маркер молекулярных масс белков (10–250 кДа); 2 – слитый белок GST-6His-GM после аффинной хроматографии на Glutathione Resin; 3 – смесь белков после гидролиза TEV; 4 – белок GM (конечный продукт). *b* – 15%-ный ПААГ, невозстанавливающие условия. 1 – маркер молекулярных масс белков (10–250 кДа); 2 – слитый белок Trx-6His-GM после отмывки TB; 3 – смесь белков после гидролиза TEV; 4 – белок GM (конечный продукт).

Fig. 3. Electrophoregram of rhGM-CSF protein purification products. *a* – Electrophoresis in 15% PAGE, non-reducing conditions. 1 – protein molecular weight marker (10–250 kDa); 2 – GST-6His-GM fusion protein after affinity chromatography on Glutathione Resin; 3 – protein mixture after TEV hydrolysis; 4 – GM protein (final product). *b* – Electrophoresis in 15% PAGE, non-reducing conditions. 1 – protein molecular weight marker (10–250 kDa); 2 – Trx-6His-GM fusion protein after washing inclusion bodies; 3 – protein mixture after TEV hydrolysis; 4 – GM protein (final product).

фию на Glutathione Resin, для белка Trx-6His-GM эту стадию не проводили.

Слитый белок GST-6His-GM после аффинной хроматографии на Glutathione Resin и белок Trx-6His-GM, полученный из телец включения, подвергали расщеплению протеазой TEV (ООО “Биолабмикс”), для чего было подобрано оптимальное соотношение 1 е.а. протеазы на 5 мкг слитого белка. Расщепление вели в течение 12 ч при температуре $6 \pm 2^\circ\text{C}$. На рис. 3 представлена электрофореграмма в 15%-ном ПААГ слитых белков, продуктов гидролиза, а также конечного препарата белка rhGM-CSF. Выход целевого белка составил 8 мг из 1 г влажных клеток, чистота более 95%.

Для подтверждения аминокислотной последовательности полученного rhGM-CSF использовали хромато-масс-спектрометрию (ХМС). Проводили трипсинолиз полученного белка с последующей идентификацией продуктов протеолиза при помощи времяпролетного масс-спектрометра LC/qTOF 6530. Было показано, что полученный белок соответствует по своей аминокислотной последовательности GM-CSF человека, с дополнительным глицином на N-конце.

Несмотря на то, что в результате проведенных операций для обеих конструкций (pET-GST-6His-

GM и pET-Trx-6His-GM) был получен препарат rhGM-CSF, отличающийся от препарата Sargramostim одним дополнительным аминокислотным остатком глицина на N-конце, дальнейшие работы было решено проводить для варианта rhGM-CSF, полученного из слитого белка GST-6His-GM. Выделение и очистка второго варианта, слитого белка Trx-6His-GM, было осложнено близостью молекулярных масс продуктов протеолиза Trx-6His и rhGM-CSF (рис. 3). Тем не менее, второй вариант будет доведен до стадии конечного препарата, для этого предполагается разработать схему выделения, включающую одну или две дополнительные стадии хроматографической очистки.

Для подтверждения биологической активности была использована модель цитостатической миелосупрессии. Результаты изучения влияния полученного белка rhGM-CSF на показатели периферической крови мышей с цитостатической миелосупрессией приведены в табл. 1.

Из приведенных в табл. 1 данных следует, что препараты rhGM-CSF в дозе 90 мкг/кг вызывали повышение относительного содержания сегментоядерных нейтрофилов крови по сравнению с контрольным показателем. Статистически значимое отличие этого показателя от контроля отмечено в

Таблица 1. Влияние rhGM-CSF на показатели периферической крови мышей линии СВА на фоне введения циклофосамида (5 сут)**Table 1.** Effect of rhGM-CSF substance on peripheral blood parameters in CBA mice after cyclophosphamide treatment (day 5)

Препарат, серия	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	Сегментоядерные нейтрофилы, 10 ⁹ /л	Лейкоцитарная формула, %				
			эозинофилы	нейтрофилы		моноциты	лимфоциты
				палочко- ядерные	сегментоядерные		
Физиологический раствор	3.97 ± 0.7	0.37 ± 0.1	0	7.2 ± 2.2	8.0 ± 2.0	21.8 ± 3.8	63.0 ± 6.1
rhGM-CSF препарат сравнения	3.60 ± 0.9	0.78 ± 0.3 (211%)	0	7.0 ± 2.0	16.7 ± 4.6 <i>p</i> = 0.128	14.5 ± 2.1	61.8 ± 7.4
rhGM-CSF исследуемый препарат	4.20 ± 0.2	0.87 ± 0.2 (235%)	0	7.2 ± 1.4	20.3 ± 3.4* <i>p</i> = 0.016	19.0 ± 2.1	53.5 ± 3.4
Интактные	12.8 ± 0.5	2.70 ± 0.4	1.4 ± 0.7	1.4 ± 0.4	20.8 ± 2.1	3.6 ± 0.5	73.0 ± 2.5

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, m – ошибка среднего арифметического; * – статистически значимые отличия по отношению к контрольной группе (физиологический раствор), $p \leq 0.05$. В скобках указано отношение абсолютного числа сегментоядерных нейтрофилов крови опытных животных к контрольному показателю, %.

Note: The data are presented as $M \pm m$, where M is the arithmetic mean, m is the error of the arithmetic mean; * – statistically significant differences compared to the control group (saline solution), $p \leq 0.05$. The ratio of the absolute number of segmented neutrophils in the blood of experimental animals to the control value, %, is given in brackets.

группе, которой вводили препарат, полученный с использованием технологии слитых белков. В группе сравнения наблюдали выраженную тенденцию к увеличению относительного числа сегментоядерных нейтрофилов, отсутствие достоверных различий с контролем может быть связано со значительными индивидуальными колебаниями показателя в этой группе. Значения показателей в опытной группе и группе сравнения составляли, соответственно, $20.3 \pm 3.4\%$ и $16.7 \pm 4.6\%$, что в 2–2.5 раза превышало контрольный уровень ($8.0 \pm 2.0\%$).

Отмечена выраженная тенденция к увеличению абсолютного числа сегментоядерных нейтрофилов опытных животных и мышей группы сравнения по сравнению с показателем положительного контроля. В группе мышей, которым вводили исследуемый препарат rhGM-CSF, данный показатель составлял $0.87 \pm 0.2 \times 10^9/\text{л}$, в группе после введения препарата сравнения rhGM-CSF – $0.78 \pm 0.3 \times 10^9/\text{л}$, что соответствовало 235 и 211%, по отношению к уровню контроля ($0.37 \pm 0.1 \times 10^9/\text{л}$).

Для обеспечения фолдинга белка в *E. coli*, как правило, связанного с растворимостью последнего, часто используют технологию слитых белков. Хотя изначально этот подход был разработан для облегчения обнаружения и очистки белков, впоследствии стало ясно, что некоторые из них, используемые при получении химерных конструкций, обладают дополнительными преимуществами, такими как повышение выхода их партнеров по слиянию, защита от внутриклеточного протеолиза и повышение растворимости [17].

Данная технология была использована в работе по получению рекомбинантного GM-CSF человека в прокариотической системе экспрессии. Для этого были сконструированы две плазмиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую GST или Tgх таким образом, чтобы при синтезе слитого белка GST/Tgх она находилась на его N-конце. Между последовательностями, кодирующими белок слияния и rhGM-CSF, была включена последовательность, кодирующая сайт протеолиза TEV протеазы, необходимой для ферментативного удаления N-концевого фрагмента. В состав аминокислотной последовательности GST и Tgх были включены шесть гистидинов для обеспечения возможности аффинной очистки. Использование сконструированной плазмиды действительно позволило добиться на относительно высоком уровне синтеза химерного белка, его выход в биомассе достигал 30% от суммы клеточных белков для GST и 35% для Tgх, что сравнимо с количеством, полученным в работе [6].

Использование технологии слитых белков для продукции rhGM-CSF известно. В частности, было описано конструирование химерных вариантов и с глутатион-S-трансферазой. Однако, оценить результаты этих работ с точки зрения эффективности синтеза не представляется возможным, так как авторы не приводят информацию о выходах целевого белка [5, 10]. Анализ биомассы штаммов-продуцентов, полученных в настоящей работе, показал, что химерный белок при используемых параметрах культивирования накапливается в виде телец включения, аналогичный результат был получен в исследовании Vanitha Selvarajan с соавторами [5]. Несмотря на наличие GST или

Тгх в составе химерной конструкции, оба белка оказались нерастворимы и обнаруживались в виде телец включения. Накопление рекомбинантного белка в виде телец включения имеет недостатки, один из которых — необходимость проведения стадии ренатурации, на которой обычно происходят значительные потери целевого продукта. Однако есть и плюсы: отмывка телец включения позволяет получать без хроматографических процедур целевой белок с высокой степенью чистоты, что продемонстрировано нами на примере слитого белка Тгх-6His-GM. Первыми этапами очистки были отмывка телец включения, денатурация и ренатурация; полученный в ходе этих процедур препарат был сравним по чистоте с образцом белка GST-6His-GM после стадии аффинной хроматографии на Glutathione Sepharose 4FF.

Денатурацию белка из телец включения проводили раствором 8М мочевины в 20 мМ Трис-HCl, pH 8.0, ренатурировали путем разбавления в 10 раз этим же буфером, но без мочевины. Контроль выпадающего при разбавлении осадка с помощью электрофореза в 15%-ном ПААГ подтвердил, что белок ренатурируется полностью (данные не приведены), в то время как в работе [6] потери на этой стадии достигали 20%.

Разработанная схема очистки целевого белка позволила получить препарат rhGM-CSF высокой степени чистоты (рис. 3), а подобранные условия ферментативного гидролиза обеспечивали полное расщепление слитого белка. Финальный выход высокоочищенного rhGM-CSF составил не менее 8 мг с 1 г биомассы, что сравнимо или выше, чем в аналогичных работах с использованием прокариотических продуцентов [6, 18].

Стоит отметить, что rhGM-CSF, полученный в работе, отличается от препарата Sargramostim одним дополнительным аминокислотным остатком глицина на N-конце. Это является следствием особенностей сайта протеолиза TEV, который включает остаток G, остающийся на N-конце белка после протеолиза. Тем не менее был выбран именно такой дизайн молекулы, вместо использования протеаз, обеспечивающих гидролиз с сохранением N-концевой последовательности, как, например, для пары SUMO и Upr протеаз. Полученный в результате использования технологии слитых белков препарат обладал высокой биологической активностью. Анализ количества лейкоцитов и их морфологических форм в периферической крови мышей с цитостатической миелосупрессией показал, что введение исследуемого rhGM-CSF в дозе 90 мкг/кг вызывало повышение как относительного, так и абсолютного содержания сегментоядерных нейтрофилов по сравнению с контрольным показателем. Следовательно, препарат обладал гемостимулирующими свойствами.

Таким образом, сконструирована рекомбинантная плаزمидная рЕТ-GST-6His-GM, кодирующая химерный белок, включающий глутатион-S-трансфе-

разу на N-конце и зрелый rhGM-CSF на C-конце. Полученный штамм-продуцент *Escherichia coli* BL 21(DE3)/pET-GST-6His-GM обеспечивал накопление слитого белка в биомассе до 30% от общего количества белков. Разработанная технология очистки позволила получить высокоочищенный препарат rhGM-CSF с выходом до 8 мг с 1 г биомассы. При оценке его гемостимулирующей активности на модели цитостатической миелосупрессии, вызванной введением мышам циклофосфамида, установлено, что препарат rhGM-CSF вызывает повышение содержания сегментоядерных нейтрофилов крови по сравнению с контрольным показателем, следовательно, полученный белок обладает гемостимулирующими свойствами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания, Тема ГЗ-39/21 “Отработка технологии препаративной наработки и очистки рекомбинантных белков”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов, требующих раскрытия в данной статье.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brookmeyer R., Johnson E., Ziegler-Graham K., Arriaghi H.M. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.*, 2007, 3(3), 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2007.04.381>
2. Potter H., Woodcock J.H., Boyd T.D., Coughlan C.M., O'Shaughnessy J.R., Borges M.T., Thaker A.A., Raj B.A., Adamszok K., Scott D., Adame V., Anton P., Chial H.J., Gray H., Daniels J., Stocker M.E., Sillau S.H. Safety and efficacy of sargramostim (GM-CSF) in the treatment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. (N Y)*, 2021, 7(1), e12158. <https://doi.org/10.1002/trc2.12158>
3. Зурочка А.В., Зурочка В.А., Добрынина М.А., Гриценко В.А. Иммунобиологические свойства гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и синтетических пептидов его активного центра. *Медицинская иммунология*, 2021, 23(5), 1031–1054. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-IPO-2216>
4. Petrina M., Martin J., Basta S. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor has come of age: From a vaccine adjuvant to antiviral immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2021, 59, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.01.001>
5. Selvarajan V., Bidkar A.P., Shome R., Banerjee A., Chaubey N., Ghosh S.S., Sanpui P. Studying in vitro phagocytosis of apoptotic cancer cells by recombinant GMCSF-treated RAW 264.7 macrophages. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2017, 102, 1138–1145. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.003>
6. Есина Т.И., Лебедев Л.Р., Волосникова Е.А., Гилева И.П., Гогина Я.С., Терещенко Т.А., Кочнева Г.В., Гражданцева А.А., Даниленко Е.Д. Способ получения рекомбинантного гранулоцитарно-макрофа-

- гального колониестимулирующего фактора человека. *Биотехнология*, 2019, 35(3), 68–73. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-3-68-73>
7. Tran A.M., Nguyen T.T., Nguyen C.T., Huynh-Thi X.M., Nguyen C.T., Trinh M.T., Tran L.T., Cartwright S.P., Bill R.M., Tran-Van H. *Pichia pastoris* versus *Saccharomyces cerevisiae*: a case study on the recombinant production of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *BMC Res. Notes.*, 2017, 10(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2471-6>
 8. Ghasemi N., Bandedpour M., Ranjbari J. Optimization of Key Factors in Serum Free Medium for Production of Human Recombinant GM-CSF Using Response Surface Methodology. *Iran. J. Pharm. Res.*, 2019, 18(Suppl1), 146–156. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.112322.13681>
 9. Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Ткачева А.В., Гилева И.П., Кулигина, Е.В., Рихтер В.А., Кочнева Г.В. Высокоэффективная продукция биологически активного секретируемого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека рекомбинантным вирусом осповакцины. *Биотехнология*, 2015, 31(5), 13–21. <https://doi.org/10.1134/S0003683816070036>
 10. Chaubey N., Ghosh S.S. Molecular cloning, purification and functional implications of recombinant GST tagged hGMCSF cytokine. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2013, 169(5), 1713–1726. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0052-7>
 11. Esposito D., Chatterjee D.K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2006, 17(4), 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.06.003>
 12. Хайруллин Р.Ф., Киямова Р.Г., Ризванов А.А. Экспрессия рекомбинантных белков в *E.coli*: учеб. Пособие. Казань, Россия: Изд-во Казан. ун-та, 2018, 142.
 13. Comet – это инструмент поиска в базе данных последовательностей тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) с открытым исходным кодом, выпущенный по лицензии Apache 2.0. Доступно онлайн на <https://uwpr.github.io/Comet/> [Дата обращения – 02.12.2024]
 14. Шимица Г.Г., Батенева А.В., Гамалей С.Г., Есина Т.И., Терещенко Т.Г., Даниленко Е.Д. Исследование гемостимулирующих свойств рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение, 2020, 20(4), 268–276. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-268-276>
 15. Новицкий В.В., Евтушенко О.М. Руководство к практическим занятиям по гематологии: для студентов медико-биологического факультета Томск, Россия: Изд-во Сибирского государственного медицинского университета, 1999, 160.
 16. Гржибовский А.М. Анализ трех и более независимых групп количественных данных. *Экология человека*, 2008, (3), 50–58.
 17. Silva F.S.R., Santos S.P.O., Meyer R., Silva E.S., Pinheiro C.S., Alcantara-Neves N.M., Pacheco L.G.C. In vivo cleavage of solubility tags as a tool to enhance the levels of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2021, 118(11), 4159–4167. <https://doi.org/10.1002/bit.27912>
 18. Malekian R., Jahanian-Najafabadi A., Moazen F., Ghavimi R., Mohammadi E., Akbari V. High-yield production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in *E. coli* BL21 (DE3) by an auto-induction strategy. *Iran. J. Pharm. Res.*, 2019, 18(1), 469–478.

Glycine Residue at the N-Terminus of Recombinant GM-CSF Does Not Decrease Granulocyteopoiesis Stimulating Activity

E. A. Volosnikova^{a, #}, N. V. Volkova^a, Ya. S. Gogina^a, T. I. Esina^a, G. G. Shimina^a, E. D. Danilenko^a, and D. N. Shcherbakov^a

^a State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Koltsovo, Novosibirsk oblast, 630559 Russia

[#]e-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru

Abstract—Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is a cytokine that regulates the proliferation and differentiation of neutrophils and macrophages and has immunomodulatory and adjuvant properties. The application of rhGM-CSF preparations in medical practice is restricted due to the low efficiency of producer strains. A plasmid vector has been designed to synthesize in *Escherichia coli* cells a chimeric protein that includes rhGM-CSF and glutathione S-transferase or thioredoxin. To construct the target recombinant plasmid, the nucleotide sequences of glutathione S-transferase or thioredoxin and rhGM-CSF were simultaneously cloned within the pET21 plasmid in a way that during the synthesis of the fusion protein there appears a cleavage site specific for TEV protease between the protein-partners and the target protein. The conditions for cultivating *E. coli* BL 21(DE3)/pET-GST-6His-GM and *E. coli* BL 21(DE3)/pET-Trx-6His-GM strains were determined to produce at least 30% fusion protein in the biomass, with a wet biomass output of 3.5 g to 3.8 g per liter of culture solution. It has been shown that the hemostimulating activity of the obtained rhGM-CSF protein, which has one additional N-terminal amino acid glycine residue, is comparable to the reference preparation. The proposed technique enables the production of rGM-CSF with a high yield and purity of more than 95%.

Keywords: recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, fusion protein, strain producer, cultivation, chromatography, hemostimulatory activity