

УДК 577.1

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТВОРИМОГО ИНТЕРФЕРОНА ГАММА ЧЕЛОВЕКА В СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ *Escherichia coli* ПРИ СНИЖЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2023 г. Е. А. Волосникова^{1, *}, Т. И. Есина¹, Д. Н. Щербаков¹, Н. В. Волкова¹, Я. С. Гогина¹, Т. А. Терещенко¹, Е. Д. Даниленко¹

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская обл., 630559 Россия

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

Поступила в редакцию 15.10.2022 г.

После доработки 30.10.2022 г.

Принята к публикации 07.11.2022 г.

Сконструирован рекомбинантный штамм–продуцент интерферона гамма человека (ИФН- γ) *E. coli* BL 21/pET-IFN- γ , обеспечивающий высокий уровень его экспрессии. Разработан способ получения растворимой формы рекомбинантного ИФН- γ , включающий наработку биомассы штамма-продуцента, содержащего целевой белок в количестве 32–37% от общего содержания клеточных белков, из которых 15–17% в растворимой форме, выделение и очистку белка. Процесс выделения и очистки включал стадии дезинтеграции, осветление лизата клеток, хроматографической очистки и диализа. Разработанный способ позволил получить из 1 г влажной биомассы до 5 мг препарата с чистотой не менее 95% и высокой специфической (противовирусной) активностью.

Ключевые слова: рекомбинантный интерферон гамма человека, штамм-продуцент, культивирование, хроматография, специфическая активность

DOI: 10.31857/S0555109923020174, **EDN:** LVLXPXU

Человеческий интерферон гамма (ИФН- γ) является белком-цитокином широкого спектра действия, участвующим в транскрипционном контроле значительного количества иммунологически релевантных генов. Около 350 клинических испытаний ИФН- γ как средства лечения различных заболеваний (туберкулез, онкологические заболевания и др.) продолжают в настоящее время либо уже завершены [1]. В связи с этим, не теряет актуальности задача разработки эффективной масштабируемой технологии получения этого рекомбинантного белка.

ИФН- γ кодируется предшественником гена IFNG “NCBI: NP_000610.2”, который состоит из 1240 пар нуклеотидов с 4 экзонами и расположен на хромосоме 12q24.1. Белок представляет собой симметричный гомодимерный гликопротеин, включающий 143 аминокислотных остатка с двумя сайтами гликозилирования. Предшественник нативного ИФН- γ состоит из 166 аминокислот за счет дополнительных 23 остатков секреторного сигнального пептида на N-конце. Молекулярная масса белка в биологически активной димерной форме составляет 38.8 кДа [2]. По литературным данным, молекулярная масса рекомбинантного ИФН- γ , продуцируемого *Escherichia coli*, состав-

ляет 17–18 кДа, он не гликозилирован, однако сохраняет при этом физиологическую активность [3].

Попытки получения ИФН- γ при помощи различных экспрессионных систем, как прокариотических, так и эукариотических (дрожжи, растительные клетки, клетки млекопитающих и насекомых) предпринимались неоднократно [2]. Последние имеют ряд преимуществ, в первую очередь, возможностью получения секреторного варианта. Однако бактериальные системы экспрессии, такие как *E. coli*, по-прежнему активно используются для получения ИФН- γ , что обусловлено простотой и дешевизной их культивирования [4]. В то же время известно, что высокий уровень экспрессии и отсутствие механизмов посттрансляционных модификаций у бактерий способны приводить к агрегации рекомбинантных белков в виде так называемых “телец включения” и, как следствие, снижению или утрате их биологической активности и иммуногенности [5]. Выделение и очистка целевого белка из телец включения, восстановление его биологической активности требуют дополнительных технологических стадий, включающих денатурацию белка (солюбилизацию в хаотропных растворителях) и последующую ренатурацию. Экспериментальные условия для обеих стадий

обычно специфичны для конкретного белка и не всегда позволяют обеспечить его удовлетворительно высокий выход и сохранение активности [6]. Несмотря на значительное количество работ, посвященных изучению процессов агрегации, солюбилизации и рефолдинга рекомбинантных белков, проблемы, связанные с получением биологически активных белков в клетках *E. coli*, во многом остаются нерешенными.

Одним из подходов к решению данной проблемы является конструирование штаммов-продуцентов, способных синтезировать целевой белок в растворимой форме.

Повышение растворимости рекомбинантных белков в бактериальном цитозоле может быть достигнуто благодаря его коэкспрессии с шаперонами и слиянию с повышающими растворимость белками или фрагментами белков. Наиболее часто используемыми тегами растворимости являются: глутатион-S-трансфераза, тиоредоксин, убиквитин, белок, связывающий мальтозу, малый убиквитинподобный модификатор (SUMO) и др.

Помимо этого, для предотвращения образования телец включения возможно изменение условий культивирования *E. coli*, в частности, снижение температуры до уровня субоптимальных значений. Ограничивающим моментом в данном случае, однако, является замедление роста бактериальной культуры и снижение выхода рекомбинантного белка [7].

Цель работы – конструирование штамма-продуцента рекомбинантного интерферона гамма человека и подбор оптимальных условий его культивирования для обеспечения продукции белка преимущественно в растворимой форме, а также разработка способа его выделения.

МЕТОДИКА

Конструирование экспрессионного вектора. В работе использовали нуклеотидную последовательность ИФН- γ человека (NP_000610.2). Кодонный состав последовательности гена оптимизировали для экспрессии в системе *E. coli* при помощи сервиса “Codon Optimisation Tool” (“Integrated DNA Technologies”, США). Синтез гена проводился ООО “ДНК-синтез” (Россия). Синтезированная нуклеотидная последовательность была встроена в экспрессионный вектор pET21a (“Novagen”, Германия) по уникальным сайтам рестрикции BamHI и HindIII, в результате чего был получен плазмидный вектор pET-IFN- γ .

Получение биомассы клеток, содержащих целевой белок. Рекомбинантный штамм *E. coli* BL 21/pET-IFN- γ получали трансформацией компетентных клеток *E. coli* BL 21 (“Novagen”) рекомбинантной плазмидной ДНК pET-IFN- γ при помощи метода электропорации. Дальнейшее выращивание

рекомбинантных клонов проводили на LB-агаре с ампициллином (100 мкг/мл) при 37°C в течение 18–20 ч. Колонии, содержащие рекомбинантную плазмиду, смывали с агара LB-бульоном, добавляли глицерин до конечной концентрации 15%. Полученную суспензию разливали в криоприборки по 100 мкл и хранили при температуре –70°C.

Посевной материал рекомбинантного штамма получали засеваем суспензии штамма-продуцента в колбы Эрленмейера, содержащие среду LB с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл, и дальнейшим инкубированием на термостатируемой качалке при температуре 37°C в течение 18–20 ч.

Посевной материал использовали также и для засева ферментера в количестве 1–2% от объема питательной среды. Культивирование осуществляли на среде LB с ампициллином (100 мкг/мл) в биореакторе LiFlus SL-15L (“Biotron”, Южная Корея) объемом 15 л, с коэффициентом заполнения средой 0.7 при температуре $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$, скорости вращения мешалки 100 об./мин и скорости подачи стерильного воздуха 1 л/л · мин⁻¹.

Для масштабирования процесса использовали полупромышленный ферментер LiFlus SP-100L (“Biotron”) объемом 100 л. В качестве индуктора синтеза целевого белка в клетках *E. coli* BL21/pET-IFN- γ использовали изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (IPTG) (“Anatrace Products”, США). Культивирование заканчивали в конце логарифмической – начале стационарной фазы роста при достижении оптической плотности OD₅₅₀ 3.7–4.3. Биомассу отделяли центрифугированием на проточной центрифуге Z41 (“СЕРА”, Германия) при 15000 g и скорости потока 60 л/ч. Влажную биомассу взвешивали и определяли в ней содержание целевого белка в %.

Содержание рекомбинантного белка. Содержание белка в биомассе определяли методом электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с окрашиванием Кумаси G-250 (“Sigma”, США) и последующим денситометрическим сканированием окрашенных гелей. Относительное содержание белка определяли с использованием системы визуализации GelDoc Go с ПО Image Lab (“Bio-Rad Laboratories”, США).

Выделение и очистка ИФН- γ . Образец биомассы (10 г влажных клеток) суспендировали в 100 мл буферного раствора, содержащего 1 мМ фенол-метилсульфонилфторида (ингибитор протеиназ), 20 мМ трис-НCl, pH 8.0, и разрушали ультразвуком с последующим центрифугированием. Для первичной очистки и осветления супернатанта, содержащего ИФН- γ в растворимой форме, применяли жидкий сорбент Аммофлок-25 (“Физлаб-прибор”, Россия).

Очистку целевого белка вели каскадной хроматографией на ион-обменных сорбентах Q-сефароза и SP-сефароза, уравновешенных 20 мМ

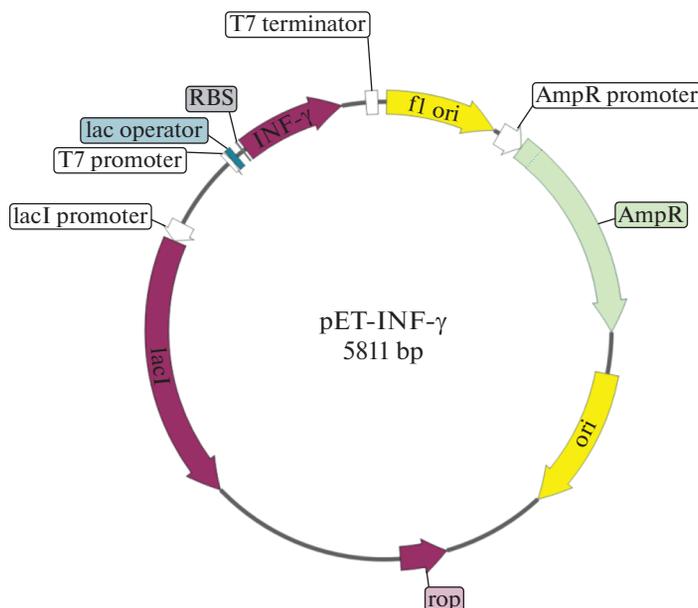


Рис. 1. Генетическая карта плазмидного вектора pET-INF- γ : T7 promoter – промотор гена белка 10 фара T7; T7 tag – лидерная последовательность гена 10 бактериофага T7; INF- γ – последовательность, кодирующая зрелый интерферон-гамма; T7 terminator – терминатор бактериофага T7.

трис-НСl буфером, рН 8.0. Колонку с Q-сефарозой, на которую целевой белок не сорбировался, отсоединяли после промывки раствором 20 мМ трис-НСl, рН 8.0. Элюцию ИФН- γ с колонки с SP-сефарозой проводили линейным градиентом 0–1.0 М NaCl в 20 мМ трис-НСl, рН 8.0.

Анализ содержания целевого белка. Белковый состав образцов анализировали методом электрофореза в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях с окрашиванием красителем Кумасси G-250 (“Sigma”, США), анализ гелей проводили методом, описанным выше.

Определение специфической активности. Специфическую (противовирусную) активность определяли микрометодом в 96-луночных планшетах с плоским дном, по подавлению цитопатического действия (ЦПД) тест-вируса энцефаломиокардита (ЕМС), штамм “Колумбия” в дозе 100 ЦПД₅₀ (трехкратное разведение) в культуре клеток человека линии Л-68 (диплоидные клетки (фибропласты) из здоровой ткани легкого) как описано в работе [8]. В качестве контрольного препарата использовали препарат Ингарон (интерферон гамма человеческий рекомбинантный, лиофилизат), 100000 МЕ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Человеческий ИФН- γ является примером рекомбинантного белка, легко синтезируемого в клетках *E. coli*, но склонного к агрегации. Использование векторов, обеспечивающих конститутивную экспрессию, обычно позволяет добиться

накопления целевого белка до 30% от суммарного белка бактериальных клеток, однако больше двух третей этого белка содержится в тельцах включения, частично или полностью денатурированы и поэтому лишены биологической активности [7]. В работе для конструирования штамма *E. coli* BL21/pET-INF- γ был выбран вариант индуцибельной экспрессии. Последовательность целевого гена клонировали в составе вектора pET21 (рис. 1), обеспечивающего в сочетании со штаммом *E. coli* BL 21 строгий контроль синтеза РНК. Дерепрессия промотора осуществлялась добавлением в состав питательной среды IPTG.

Выбор условий культивирования штамма-продукента. Общие закономерности культивирования рекомбинантных микроорганизмов, в которых целевой ген находится под контролем индуцибельного промотора, подробно описаны [9], что не исключает необходимость подбора оптимальных параметров роста и синтеза целевого продукта для каждого рекомбинантного штамма. При выборе условий культивирования штамма *E. coli* BL 21/pET-INF- γ в качестве контролируемых параметров использовали: время подачи индуктора, концентрацию индуктора, температуру и продолжительность инкубации с индуктором.

В экспериментах по выбору времени подачи индуктора было отмечено, что внесение IPTG в концентрации 0.1 мМ в логарифмической фазе роста культуры в диапазоне оптической плотности OD₅₅₀ культуральной жидкости (КЖ) от 1.0 до 1.6 с последующей инкубацией при 37°C в течение 5–6 ч приводило к стабильно высокому уровню

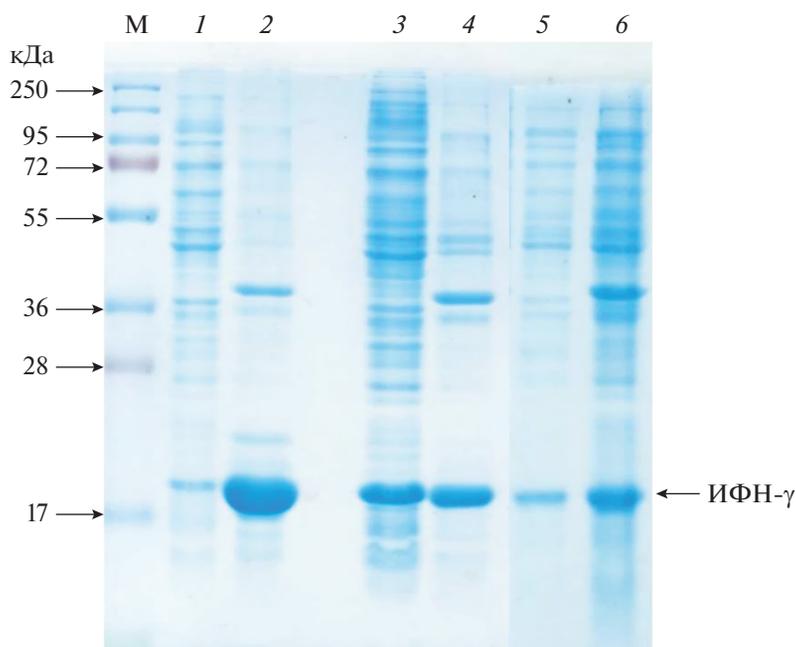


Рис. 2. Электрофореграмма фракций клеточных белков бактерий *E. coli* BL 21/pET-IFN- γ после дезинтеграции и центрифугирования: 1, 3, 5 – белки супернатанта после инкубации с IPTG при температуре 37, 25, 20°C соответственно; 2, 4, 6 – осадки клеточных белков после инкубации с IPTG при температуре 37, 25 и 20°C; М – маркер молекулярной массы белков (17–250 кДа). Пробы для электрофореза получали путем осаждения одинакового количества клеток, стандартизованных по оптической плотности.

ню синтеза целевого белка, экспрессируемого в тельцах включения. По данным денситометрического анализа электрофореграмм клеток, содержание целевого белка с молекулярной массой $18.0 \pm \pm 0.5$ кДа, соответствующего массе ИФН- γ , составляло от 46 до 48% от содержания общего клеточного белка. Удельный выход биомассы был равен 3.6–3.7 г/л. Дальнейшее увеличение времени культивирования не приводило к повышению содержания целевого белка в биомассе.

Для определения минимального количества IPTG, достаточного для полноценной индукции синтеза целевого белка, индуктор вносили в инкубационную среду в концентрациях 0.1, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02 и 0.01 мМ.

Температуру культивирования поддерживали на уровне 37°C. Результаты белкового электрофореза показали, что IPTG в концентрации 0.01 мМ индуцирует синтез ИФН- γ в количестве 30–32% от суммарного клеточного белка. Максимальное содержание целевого белка в клетках (46–49%) достигалось через 5–6 ч инкубации при концентрации IPTG 0.04–0.05 мМ, что сопоставимо с результатами, полученными при внесении индуктора в концентрации 0.1 мМ.

Известно, что повышение выхода растворимого белка может быть достигнуто в результате индукции белкового синтеза при пониженной температуре [9]. Для подтверждения этого было проведено культи-

вирование в ферментере LiFlus SP-100L (“Biotron”) рекомбинантного штамма *E. coli* BL 21/pET-IFN- γ после внесения индуктора при температурах 37, 25 и 20°C.

Локализацию белка ИФН- γ в клетках бактерий определяли электрофоретически после дезинтеграции клеток биомассы, центрифугирования и анализа содержания целевого белка в осадке и супернатанте. На рис. 2 приведены электрофореграммы белковых фракций осадков и супернатантов образцов биомасс, полученных при инкубации при разных температурных режимах.

Из результатов, представленных на рис. 2, следует, что при культивировании штамма-продукта при 37°C и внесении индуктора в течение 5–6 ч более 90% синтезируемого ИФН- γ содержалось в осадке телец включения (дорожка 2). При снижении температуры культивирования до 25°C после подачи индуктора содержание целевого белка в клетках через 8–9 ч от начала культивирования достигало 32–37%. При этом белок накапливался в равной степени как в растворимой форме (в цитоплазме и периплазме) (дорожка 3), так и в тельцах включения (дорожка 4). Дальнейшее понижение температуры культивирования до 20°C с индукцией приводило к замедлению роста и снижению содержания целевого белка до 20–25%, при этом белок преимущественно (до 70%) накапливался в тельцах включения (дорожка 6). Поскольку результат оказался неудовлетвори-

Таблица 1. Данные по выходу из 10 г биомассы очищенного белка ИФН- γ

Стадия очистки ИФН- γ	Раствор белка, мл	Суммарный белок, мг	Белок ИФН- γ , мг	Содержание белка, %
Лизат клеток после центрифугирования	100	240	136	56.6
Осветление Аммофлоком-25	110	180	116	64.4
Ионообменная хроматография	16.6	52	50	96

тельным, указанную температуру в дальнейшем не использовали.

Выход биомассы и целевого белка, его содержание и локализации в клетках, полученные для ферментера LiFlus SL-15L объемом 15 л, полностью воспроизводились в условиях масштабирования в ферментере LiFlus SP-100L объемом 100 л.

Таким образом, подобраны условия культивирования нового штамма-продуцента ИФН- γ *E. coli* BL 21/pET-IFN- γ для двух типов биореакторов со следующими характеристиками и условиями выращивания: коэффициент заполнения средой 0.7–0.8; подача воздуха 1.0 л л⁻¹ · мин⁻¹; скорость вращения мешалки 100 об./мин, температура (37.0 ± 1.0)°С; внесение индуктора (IPTG) в конечной концентрации 0.04–0.05 ммоль/л при оптической плотности КЖ OD₅₅₀ 1.0–1.6; продолжительность культивирования после индукции в течение 5–6 ч. Удельный выход биомассы составлял 3.5–3.6 г/л КЖ. Содержание целевого белка – 46–48% от суммарных клеточных белков, при этом белок синтезировался, в основном, в тельцах включения (более 90%).

Снижение температуры культивирования штамма после внесения IPTG до 25°С и дальнейшая инкубация в течение 8–9 ч приводили к тому, что экспрессия целевого белка достигала уровня 32–33% в ферментере объемом 15 л и 33–37% – в 100 л ферментере. Накопление белка происходило в равной степени в тельцах включения и периплазме. Выход биомассы составлял 4.6–4.7 г/л КЖ при культивировании в 15-литровом ферментере и 4.6–5.0 г/л – 100-литровом.

Выделение и очистка ИФН- γ . Для того, чтобы оценить эффективность выделения рекомбинантного ИФН- γ , синтезируемого в растворимой форме (~50%), была использована биомасса, содержащая целевой белок в периплазме, полученная в ферментере LiFlus SP-100L при снижении температуры до 25°С после подачи индуктора. Суспензию клеток в буфере для разрушения помещали в ледяную баню и разрушали ультразвуком (22 кГц) до снижения OD₅₅₀ на 45–50% от исходного значения. Затем суспензию центрифугировали при 12000g в течение 45 мин и при 4°С.

Для грубой очистки и осветления раствора после центрифугирования в супернатант, содержащий целевой белок, добавляли жидкий сорбент

Аммофлок-25 в количестве 10% от объема раствора белка. Полученный раствор инкубировали 12 ч при 2–8°С и центрифугировали при 12000 g 30 мин и 4°С.

Очистку целевого белка проводили методом каскадной хроматографии на ионообменных сорбентах Q-сефароза и SP-сефароза. Колонки с ион-обменными сорбентами Q-сефароза (20 мл) и SP-сефароза (20 мл) уравнивали 20 мМ трис-НСl буфером, рН 8.0, наносили раствор белка, после чего колонки промывали тем же буфером. Колонку с Q-сефарозой, на которой целевой белок не сорбировался, отсоединяли. Белок элюировали с колонки с SP-сефарозой линейным градиентом 0–1 М NaCl в 20 мМ трис-НСl буфере, рН 8.0. Фракции целевого белка с оптической плотностью от 0.25 о.е. анализировали методом электрофореза в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях (рис. 3). Из представленных данных видно, что чистота полученного белка превышала 95%. Фракции, содержащие ИФН- γ , объединяли и диализовали против буфера, содержащего 20 мМ трис-НСl, рН 8.0, и 50 мМ NaCl. Выход целевого белка составил 50 ± 5 мг из 10 г биомассы (5 мг из 1 г влажных клеток). Данные приведены в табл. 1. Как известно из литературных данных, выход целевого белка из биомассы *E. coli*, содержащей ИФН- γ в тельцах включения, колебался в диапазоне от 2.5 до 5.0 мг из 1 г биомассы [1, 10]. Следовательно, количество высокоочищенного белка, полученного только из растворимой фракции в нашем исследовании, соответствовало максимальному выходу белка из штамма, продуцирующего ИФН- γ в тельцах включения. Можно предположить, что дальнейшее совершенствование условий культивирования позволит увеличить продукцию ИФН- γ в растворимой форме и как следствие, повысить выход целевого белка, как минимум в 2 раза.

Определение специфической противовирусной активности. Анализ специфической активности белка в культуре клеток Л-68 показал, что активность полученного препарата ИФН- γ в 1.7 раза превышала показатель контрольного препарата Ингарон (1.77 × 10⁵ против 1 × 10⁵ МЕ).

Сконструирован рекомбинантный индуцибельный штамм *E. coli* BL 21/pET-IFN- γ – продуцент интерферона гамма человека, обеспечивающий высокий уровень экспрессии целевого белка. В ре-

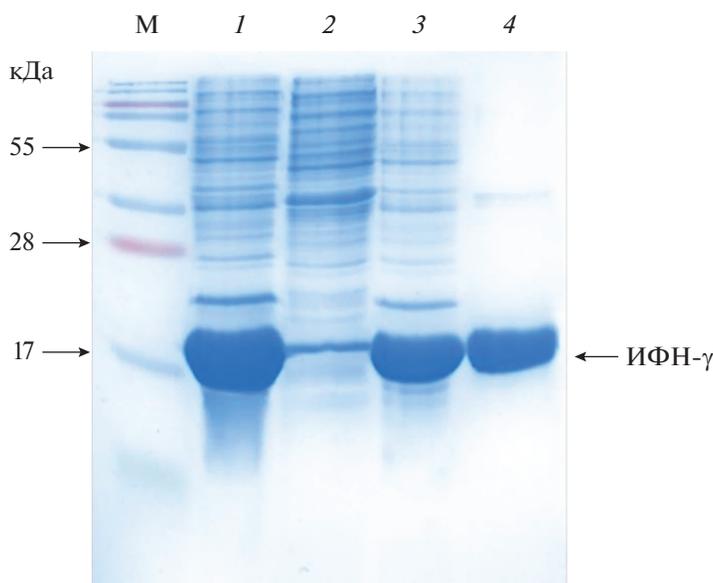


Рис. 3. Электрофореграмма белковых фракций, полученных в процессе очистки ИФН- γ : М – маркер молекулярной массы белков (17–250 кДа), 1 – лизат биомассы; 2 – осадок при осветлении; 3 – раствор белка после осветления ам-мофлокком-25; 4 – конечный препарат (белок ИФН- γ).

зультате оптимизации параметров культивирования штамма максимальное накопление целевого белка в количестве 32–37% от общего количества клеточных белков достигалось при индукции 0.04–0.05 мМ IPTG в середине логарифмической фазы и последующем культивировании при 25°C в течение 8–9 ч. При этом накопление белка происходило в равной степени в тельцах включения и в растворимой форме.

Разработан способ выделения и очистки интерферона гамма, содержащегося в клетках в растворимой форме. Способ очистки включал дезинтеграцию клеток ультразвуком, предпочистку жидким сорбентом, очистку каскадной ионообменной хроматографией с последующим диализом. Показано, что разработанный способ позволял получить из 1 г влажной биомассы до 5 мг препарата с чистотой более 95% и высокой специфической (противовирусной) активностью.

Таким образом, удалось разработать систему, позволяющую получать белок в растворимой форме, что облегчает его выделение и очистку, поскольку процедура не содержит таких стадий, как денатурация и ренатурация, на которых происходят основные количественные потери белка и потери его биологической активности.

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

Коллектив авторов выражает благодарность сотрудникам ОБТК ФБУН ГНЦ ВБ “Вектор” Роспотребнадзора: С.В. Усовой, Е.Ф. Перышкиной,

Е.С. Башкиной – за проведение экспериментов по определению специфической (противовирусной) активности препарата ИФН- γ .

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pandey R., Prabhu A.A., Dasu V.V. // Separation Science and Technology. 2018. V. 53. № 3. P. 487–495. <https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1395463>
2. Razaghi A., Owens L., Heimann K. // J. Biotechnol. 2016. V. 240. P. 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.022>
3. Khalilzadeh R., Shojaosadati S.A., Bahrami A., Maghsoudi N. // Biotechnology Letters. 2003. V. 25. № 23. P. 1989–1992. <https://doi.org/10.1023/b:bile.0000004390.98648.25>
4. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. // Front. Microbiol. 2014. V. 5. P. 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
5. Malhotra A. // Methods in Enzymol. 2009. V. 463. P. 239–258. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63016-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63016-0)
6. Leibly D.J., Nguyen T.N., Kao L.T., Hewitt S.N., Barrett L.K., Van Voorhis W.C. // PLOS ONE. 2012. V. 7. № 12. P. e52482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052482>

7. Tileva M., Krachmarova E., Ivanov I., Maskos K., Natcheva G. // Protein Expr. Purif. 2016. V. 117. P. 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.09.022>
8. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Т.2. ОФС.1.7.2.0002.15 Биологические методы испытания препаратов интерферона с использованием культур клеток. С. 2740–2749. <https://femb.ru/record/pharmасorea14>
9. Хайруллин Р.Ф. Экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli*: учебн. пособие. / Ред. Р.Ф. Хайруллин, Р.Г. Киямова, А.А. Ризванов. Казань: Изд-во Казанского ун-та, 2018. 142 с.
10. Закабунин А.И., Барановская Г.А., Пустошилова Н.М., Майстренко В.Ф., Гаврюченкова Л.П., Громова О.А. Способ получения рекомбинантного интерферона – гамма человека. Патент РФ. 1999. № 2132386.

Production of Soluble Human Gamma Interferon in the *Escherichia coli* Expression System with a Decrease in Cultivation Temperature

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

^a State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559 Russia

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

A recombinant strain producing human gamma interferon (IFN- γ) *E. coli* BL 21/pET-IFN- γ was constructed, providing a high level of its expression. A method has been developed for obtaining a soluble form of recombinant IFN- γ , consisting of the processes of producing a biomass of a producer strain containing a target protein in an amount of 32–37% of the total content of cellular proteins, protein isolation and purification. The purification process included the stages of disintegration, clarification of the cell lysate, chromatographic purification and dialysis. The developed method makes it possible to obtain from 1 g of wet biomass up to 5 mg of the drug with a purity of at least 95% and high specific (antiviral) activity.

Keywords: human recombinant gamma interferon, producer strain, cultivation, chromatography, specific activity