

УДК 57.088.2

Е.Н. КОСОБОКОВА*, М.В. ПИНЮГИНА, В.С. КОСОРУКОВ

ФГБНУ «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» Москва, 115478

e-mail: ekkos@mail.ru

Получение биологически активного интерферона- α -2b человека из растений *Nicotiana benthamiana*

Описана методика получения и очистки биологически активного рекомбинантного интерферона- α -2b человека (рЧИФН- α -2b), синтезированного в результате экспрессии в растении *Nicotiana benthamiana*. Генетическая конструкция, содержащая модифицированный ген чИФН- α -2b, клонирована в двух разных векторах: в одном — на основе вируса табачной мозаики (контролируемый актиновым промотором из *Arabidopsis thaliana*, рА-IFN-A), в другом — вируса мозаики цветной капусты (контролируемый 35S промотором, рА-IFN-S). Для доставки экспрессионных векторов в листья растений использован метод агроинъекции. Максимальный уровень экспрессии гена рекомбинантного белка достигнут на пятые сутки после инъекции и составляет 200 и 20 мг на 1 кг листьев для рА-IFN-A и рА-IFN-S, соответственно. Рекомбинантный чИФН- α -2b, полученный из растений, проявлял антивирусную и противоопухолевую активность, соответствующую коммерческому аналогу.

Ключевые слова: продукция в растениях, чИФН- α -2b, His-домен.

Интерфероны (ИФН) — группа сигнальных низкомолекулярных белков, выделяемых клетками млекопитающих в ответ на присутствие болезнетворных микроорганизмов (таких как вирусы, бактерии, многоклеточные паразиты) или опухолевых клеток. Эти цитокины (медиаторы иммунитета) обладают антивирусной, иммуномодулирующей, противоопухолевой и другими видами активности, что позволяет отнести их к важнейшим факторам врожденного иммунитета, полифункциональным биорегуляторам широкого спектра действия и гомеостатическим агентам [1]. На фармацев-

тическом рынке представлены препараты ИФН, различающиеся по способу получения (природные и рекомбинантные) и по форме выпуска. Основные коммерческие препараты представляют собой рекомбинантную форму человеческого ИФН- α -2, имеют сходное фармакологическое действие, включающее противовирусный, противоопухолевый и иммуномодулирующий эффект, которое характерно для всех ИФН- α .

В клинике наиболее часто используют ИФН- α -2b. Целью применения того или иного препарата ИФН- α являются в первую очередь профилак-

Кособокова Екатерина Николаевна, Пинюгина Марина Владимировна, Косоруков Вячеслав Станиславович.

Список сокращений: БСА — бычий сывороточный альбумин; ДМСО — диметилсульфоксид; ИФА — иммуноферментный анализ; ИФН — интерферон; КЖ — культуральная жидкость; МЕ — международная единица; ОП — оптическая плотность; ПААГ — полиакриламидный гель; п.н. — пар нуклеотидов; ПЦР — полимеразная цепная реакция; среда LB — среда Луриа — Бергани; ФМСФ — фенилметилсульфонил фторид; ЦПД — цитопатическое действие; ЦТД — цитотоксическое действие; ЭМК — энцефаломиокардит; DAB — диаминобензидин; Ig — иммуноглобулин; MES — 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота; SDS — додецилсульфат натрия.

* Автор для переписки.

тика и лечение вирусных заболеваний [2, 3]. Одной из важнейших областей использования этого белка является также онкология: препараты ИФН включены в состав комбинированной терапии хронического миелолейкоза, Т-клеточной лимфомы кожи, множественной миеломы, злокачественной меланомы, СПИД-ассоциированной саркомы Капоши, волосатоклеточного лейкоза, фолликулярной лимфомы и рака почки [4, 5].

Длительные курсы интерферонотерапии при лечении таких заболеваний, как гепатит и рак почек, сопровождаются побочными эффектами разной степени тяжести, которые через некоторое время исчезают или снижаются [6, 7].

Основными продуцентами терапевтически значимых белков являются бактериальные и дрожжевые культуры, а также культуры клеток животных. Каждая из этих групп организмов имеет в качестве продуцента ИФН свои преимущества и недостатки. Так, бактериальная система экспрессии зарекомендовала себя как дешевая «фабрика», обеспечивающая высокий выход целевого продукта. Недостатком бактериальных клеток является, однако, их неспособность обеспечивать посттрансляционные модификации, характерные для клеток человека, что имеет следствием образование в человеческом организме антител к ИФН и снижение эффективности терапии. Эту проблему можно решить, используя культуры клеток животных [8]. Однако эта система характеризуется высокой стоимостью и низкой степенью стабильности. Для растительных систем характерны низкая стоимость выращивания на больших площадях и простота масштабирования (путем увеличения занимаемой культурой площади); кроме того, эти системы не требуют дорогостоящих мер стерильности [9]. В отличие от бактериальной системы экспрессии в клетках высших растений осуществляются посттрансляционные модификации белков, сходные с таковыми в клетках млекопитающих: гликозилирование, фосфорилирование, метилирование и др. [10], а также обеспечивается правильная укладка (фолдинг) рекомбинантного продукта, сохраняющая белок растворимым. Помимо этого клетки растений не содержат бактериальных эндотоксинов, способных вызывать аллергические реакции у человека. В отличие от систем экспрессии на основе культур клеток млекопитающих растения свободны от патогенных для человека вирусов, микроорганизмов, прионов и онкогенов, т.е. являются безопасными продуцентами терапевтически значимых белков [11, 12].

До недавнего времени основная масса исследований была основана на получении стабиль-

но трансформированного трансгенного растения с введением целевого гена либо в ядерный, либо в хлоропластный геном и с воспроизведением экспрессии гена рекомбинантного белка в последующих поколениях [13]. Это трудоемкий и длительный метод, который требует больших затрат. Новый подход к продукции рекомбинантного белка с использованием временной экспрессии в растениях не столь затратен. Нашими коллегами была разработана система продукции рекомбинантных белков в листьях *Nicotiana benthamiana* с использованием растительных вирусных векторов [14]. Данная технология подразумевает вставку целевого гена в реплицирующиеся элементы вируса с последующим инфицированием клеток растения, где происходит амплификация, приводящая к накоплению рекомбинантного белка в цитозоли растительной клетки [15, 16]. Вследствие обработки вирусным вектором растения, получаемые по данной технологии, являются временными носителями трансгена (не более 3—5 дней после инфильтрации вектором). В связи с этим распространение «сбежавших» растений в природе при использовании данной технологии в принципе невозможно. В то же время, экспрессия гетерологичного белка может достигать высокого уровня за короткий срок (от 3 до 14 дней после инфицирования в зависимости от используемой системы). Применение специальных вспомогательных генетических элементов, обеспечивающих высокий уровень экспрессии, позволяет получать до 5 г целевого продукта из 1 кг зеленой массы, что составляет около 50% от всех растворимых белков [13]. Благодаря такому подходу возможно получение большого количества конструкций, которые могут быть быстро и легко протестированы; вирусные векторы легко переносятся внутрь клетки при помощи механического введения, осуществляя крупномасштабное инфицирование; возможно инфицирование одного и того же растения двумя и более векторами, что позволяет обеспечивать сборку белков, состоящих из нескольких доменов [17, 18].

Целью данной работы была разработка метода экспрессии гена ИФН- α -2b человека в *Nicotiana benthamiana*. Ген был клонирован в вирусных векторах, которые вводили в растения методом агроинъекции, используя агробактерии *Agrobacterium tumefaciens*. После определения времени максимального накопления целевого белка в инфицированных листьях была разработана технология извлечения и очистки рекомбинантного продукта, позволяющая сохранить его биологическую активность.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали штамм *Escherichia coli* BL21(DE3) и dH5 α из коллекции лаборатории трансгенных препаратов (НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ, Москва) и штамм агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 из коллекции лаборатории вирусологии (биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва). Генетические конструкции и праймеры для проведения ПЦР были синтезированы фирмой «Евроген» (Россия). В работе использовали рестриктазы, T4 ДНК-лигазу (Fermentas, Литва) и легкую цепь энтеропептидазы человека (L-NEP), произведенную в лаборатории инженерии белка ИБХ РАН [19].

Клонирование целевого гена в экспрессионных векторах. Ген чИФН- α -2b был искусственно синтезирован на основе синтетической последовательности, построенной с учетом частоты встречаемости кодонов ДНК в геноме *N. benthamiana* (рис. 1).

В концевые участки гена чИФН- α -2b были введены сайты гидролиза эндонуклеазами *NcoI* и *XhoI*, необходимые для последующего переклонирования кодирующего фрагмента в экспрессионных векторах. Для удаления полигистидиновой последовательности после очистки целевого белка в генетической конструкции между 6His-домом и чИФН- α -2b содержится сайт расщепления энтеропептидазой GCGGATGATGACGATAGA (что соответствует аминокислотной последовательности AlaAspAspAspArg), а между сайтом гидролиза энтеропептидазой и полигистидиновым доменом — нейтральный полилинкер GGTGGAGG-TGGA (аминокислотная последовательность GlyGlyGly). Для удобства манипулирования конструкциями гены были клонированы в рAL-TA-векторе («Евроген», Москва). Структура полученных плазмид была подтверждена секвенированием («Евроген»).

Для получения экспрессионных плазмид последовательность гена чИФН- α -2b-6His из рAL-TA-вектора была вырезана по сайтам рестрикции *NcoI* и *XhoI*. Короткий фрагмент размером 551 п.н. был выделен из геля после проведения электрофоретического разделения и лигирован с двумя экспрессионными векторами. В первом случае использовался один из наиболее популярных векторов на основе вируса мозаики цветной капусты (CaMV), в котором ген целевого белка находится под контролем сильного 35S-промотора (рис. 2).

С целью сравнения эффективности экспрессии был использован ранее полученный и зарекомендовавший себя как высоко продуктивный вектор, содержащий гены полимеразы TVCV, транспортного белка и тяжелой цепи антитела Her2/неу. Так как для переклонирования фрагмента, кодирующего целевой белок, были введены сайты *NcoI* и *XhoI*, а в базовом векторе содержалось 2 сайта *NcoI*, ограничивающие функционально значимый участок, для создания экспрессионной конструкции проводили комбинированное клонирование, представленное на рис. 3. Вся кассета транскрибировалась под контролем актинового промотора из *A. thaliana* и терминатора гена наполинсинтазы из *A. tumefaciens*. Полученные генетические конструкции были названы рA-IFN-S и рA-IFN-A, в них ген рекомбинантного белка находится под контролем конститутивных промоторов 35S или аргининового, соответственно. Векторами рA-IFN-S и рA-IFN-A сначала трансформировали клетки *E. coli* для проведения скрининга полученных генетических конструкций и выделения плазмид в количестве, достаточном для дальнейших исследований. Затем плазмидами, проверенными с помощью рестрикционного анализа, трансформировали агробактерии *A. tumefaciens*.

Агроинъекция. Агробактерии *A. tumefaciens*, штамм GV3101, трансформированные плазмидами рA-IFN-S или рA-IFN-A, культивировали в течение ночи в 20 мл среды LB при 28° и разбав-

ccatg gat cat cat cac cat cat cac ggt gga ggt gga gcg gat gat gac gat aga tgt gat ctt cct caa act cat tct ctt ggt tct aga agg act ctt atg ctt ttg gct caa atg aga agg att tct ctt ttt tct tgt ctt aag gat aga cat gat ttt ggt ttt cct caa gaa gaa ttc ggt aat caa ttt caa aag gct gaa act att cct gtt ctt cat gaa atg att caa cag att ttt aat ctt ttt tct act aag gat tct tct gct gca tgg gat gaa act ctt ttg gat aag ttt tat act gaa ctt tat caa cag ctt aat gat ctt gaa gct tgt gtt att caa ggt gtt ggt gtt act gaa act cct ctt atg aag gaa gat tct att ctt gct gtt aga aag tat ttt caa aga att act ctt tat ctt aag gaa aaa aag tat tct cct tgt gct tgg gaa gtt gtt aga gct gaa att atg aga tct ttt tct ctt tct act aat ctt caa gaa tct ctt aga tct aag gaa tga ctcgagctgcag

Рис. 1. Синтезированная генетическая последовательность, кодирующая чИФН- α -2b, оптимизированная для экспрессии в *N. benthamiana*: cat cat cac cat cat cac — HisTag; ggt gga ggt gga — нейтральный полилинкер; gcg gat gat gac gat aga — сайт расщепления энтеропептидазой; ccatgg — сайт рестрикции *NcoI*; ctcgag — сайт рестрикции *XhoI*; ctgcag — сайт рестрикции *PstI*

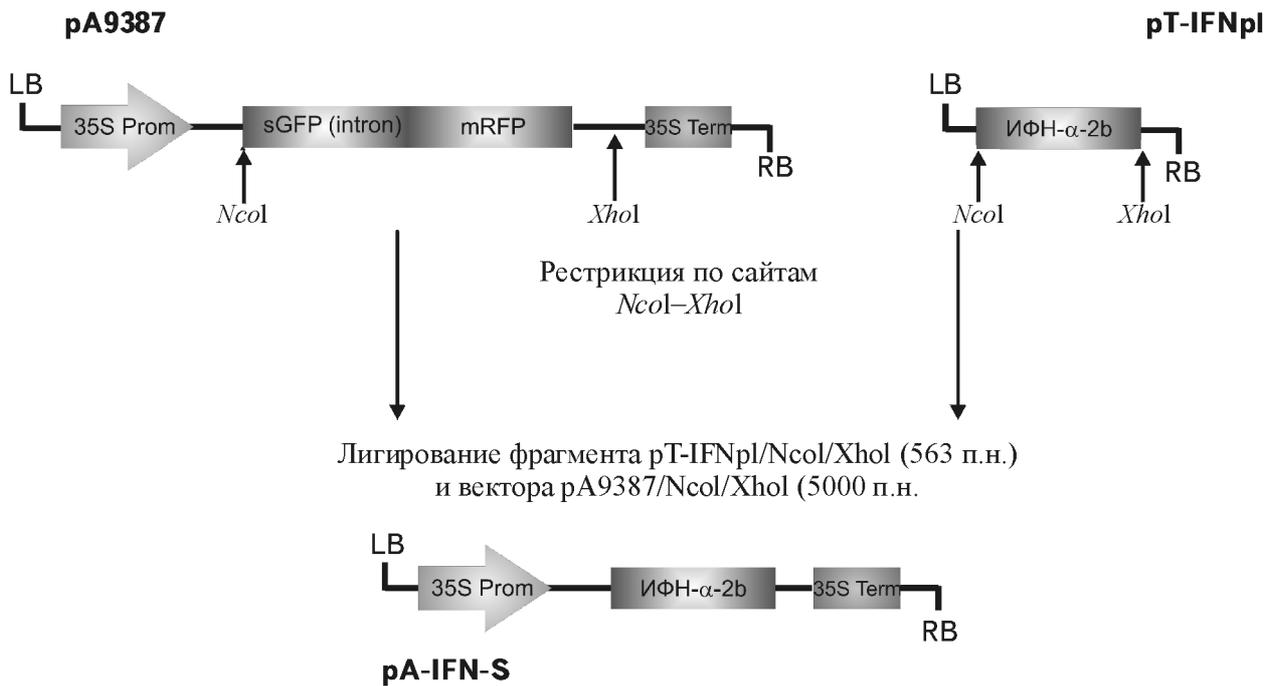


Рис. 2. Схема конструирования плазмиды pA-IFN-S для экспрессии гена чИФН- α -2b-6His: LB (left border) и RB (right border) — левая и правая границы T-ДНК, соответственно; sGFP (intron) — некодирующая область зеленого флюоресцентного белка (green fluorescent protein); mRFP — красный флюоресцентный белок; 35S Prom — промотор 35S; 35S Term — терминатор 35S

ляли суспензию буферным раствором для агроинъекций (10 мМ MES (Helicon, Россия), 10 мМ $MgSO_4$ (Helicon), pH 5,5) до $OP_{600} = 0,1$. Агроинъекцию проводили однократно посредством шприца без иглы. Для препаративного получения целевого белка и контроля его биологической активности трансформации подвергали 30—50 растений.

Продуктивность и уровень экспрессии вирусного вектора, в котором ген целевого белка находится под контролем 35S-промотора, стимулировали путем совместной агроинъекции смесью агробактерий, несущих данный вирусный вектор, и агробактерий, содержащих вектор с геном белка p19 из вируса карликовой кустистости томатов. При использовании вектора, в котором ген целевого белка находится под контролем сильного активного промотора, не было необходимости в совместной агроинъекции.

После агроинъекции растения выращивали под биолампами с продолжительностью дня 16 ч при 22° и влажности 60%.

Экстракция и очистка целевого белка из листьев *N. benthamiana*. На пятые сутки после заражения агробактериями листья собирали, удаляли центральные крупные жилки, взвешивали и измельчали при помощи куттера CL (Fimar, Италия). В полученную массу добавляли буферный

раствор для экстракции (0,2 М цитрат натрия (Helicon), 0,005 М ЭДТА (Helicon), 0,1% твина-20 (Helicon), pH 8,0), и смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч при постоянном перемешивании, после чего центрифугировали 30 мин при 1200 g с целью удаления клеточных обломков и нерастворимого материала. Далее экстракт фильтровали через двойной слой префильтра Mira cloth (Merck, Германия), а затем через фильтр с размером пор 1,2 мкм и 0,45 мкм (Whatman, Англия). Благодаря наличию аффинного домена, обладающего сродством к никелевому сорбенту, было возможно использование аффинной хроматографии для очистки целевого продукта. Отфильтрованный экстракт наносили на колонку Ni^{2+} -сефарозы (GE Healthcare, Швеция). Сопутствующие белки удаляли с колонки путем промывания 10 объемами буферного раствора для экстракции (см. выше). чИФН- α -2b элюировали буферным раствором следующего состава: 500 мМ NaCl (Helicon), 10 мМ трис-HCl (Helicon), 100 мМ имидазол (Sigma, США), pH 7,0.

Скрининг белка. Для анализа уровня экспрессии каждый день после инфльтрации до момента засыхания листа собирали по 0,04 г листовой биомассы, растирали в тефлоновой ступке и смешивали с 200 мкл буферного раствора для нанесения (60% глицерина (Amresco, США), 5 мМ

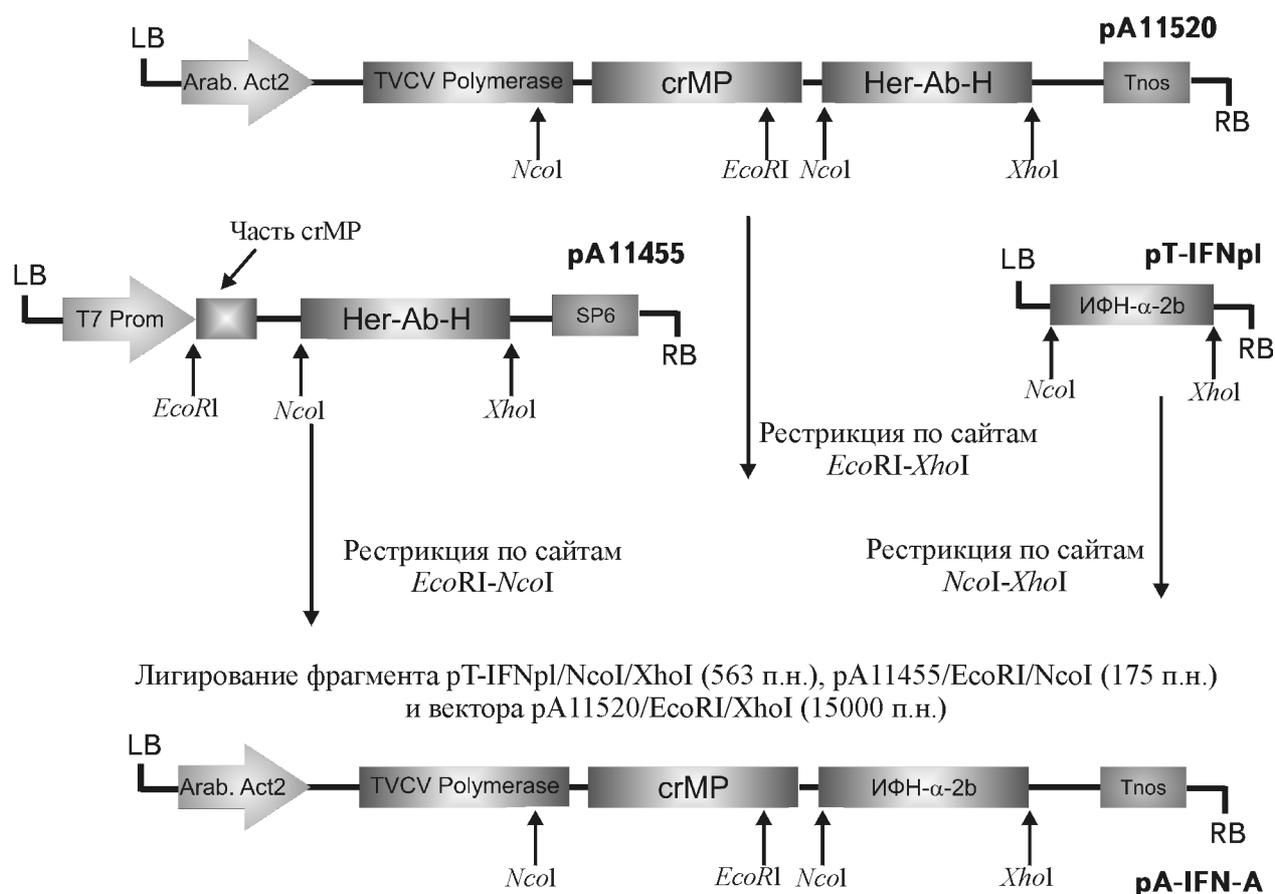


Рис. 3. Схема конструирования плазмиды pA-IFN-A для экспрессии чИФН-α-2b-6His: LB (left border) и RB (right border) — левая и правая границы Т-ДНК, соответственно; Arab.Act2 — актиновый промотор; TVCV Polymerase — ген полимеразы вируса TVC; crMP — ген транспортного белка крВТМ; Her-Ab-H — ген тяжелой цепи моноклональных антител Her2neu; SP6 — поверхностный белок вируса; Tnos (terminator of polypaline synthase) — терминатор гена нопалинсинтазы

β-меркаптоэтанол (Helicon), 10% SDS (Sigma), 250 мМ трис-НСl (Helicon), рН 6,8). Полученные экстракты прогревали в течение 5 мин при 95°. Для оценки результатов экспрессии применяли стандартный метод вертикального электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS) в редуцирующих (в присутствии бета-меркаптоэтанол) условиях по Лэммли, используя установку Mini Protean II (BioRad, США). Для визуализации белков в геле применяли метод окрашивания 0,2%-ным Coomassie brilliant blue G-250 («ПанЭко», Россия).

Идентификацию ИФН-α проводили путем вестерн-блоттинга с использованием влажного переноса при помощи установки Mini-VE Blotter (Amersham Biosciences Corp., США). Перенос осуществляли на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham Biosciences Corp.) в буфере TGB (39 мМ глицин, 48 мМ трис-НСl, 0,1% SDS, 20% метанола) в течение 2 ч при токе 180 мА. Перед нанесением мембраны обрабатывали смесью Т-ТБС (2 мМ трис-НСl,

13,7 мМ NaCl, 0,1 % твина-20, рН 7,5—7,6) с 5% БСА (Sigma). После нанесения ИФН-содержащего препарата проводили его гибридизацию с моноклональными мышинными антителами против ИФН-α (ММНА-2, PBL INTERFERON SOURCE, США) в течение 2 ч при постоянном вращении в гибридайсере. Далее повторяли отмывку мембраны Т-ТБС и инкубировали ее с мечеными антителами против Ig мыши («Имтек», Россия) в течение 1 ч в гибридайсере. Для выявления антител с пероксидазной активностью использовали DAB.

Концентрацию рекомбинантного белка определяли при помощи ИФА с использованием набора ИФА-IFN-alfa («Цитокин», Россия).

Удаление полигистидинового домена. Отщепление гистидинового участка проводили при помощи легкой цепи энтеропептидазы человека [19]. Добавляли 5—6 единиц фермента на 1 мг целевого белка и инкубировали при комнатной температуре в течение ночи. Эффективность гидролиза контролировали при помощи электрофореза в

15%-ном ПААГ. Для инактивации фермента добавляли ФМСФ (Helicon) до конечной концентрации 0,4 мМ. После этого проводили повторную хроматографию на Ni^{2+} -NTA-агарозе.

Изучение биологической активности ИФН- α -2b

Определение противовирусной активности ИФН- α -2b. Противовирусную активность образцов препаратов ИФН- α -2b определяли общепринятым микрометодом в 96-луночном планшете с культурой перевиваемых диплоидных фибробластов легкого эмбриона человека (линия ЛЭЧ-977, 11-й пассаж, Медико-генетический центр РАМН, Москва) по подавлению цитопатического действия вируса энцефаломиокардита [20]. В лунки с монослоем клеток, выращенным в течение 48 ч в питательной среде ДМЕМ с L-глутамином, 10% эмбриональной телячьей сыворотки и гентамицином («ПанЭко»), вносили двукратные разведения исследуемых препаратов в объеме 100 мкл. Каждый образец исследовали повторно в двух лунках и в двух независимых определениях. Клетки инкубировали с разведениями препарата ИФН в течение 24 ч при 37° в атмосфере 5% CO_2 (инкубатор Nuairе, США). В контрольные лунки с клетками без ИФН добавляли питательную среду. Перед заражением клеток вирусом КЖ из лунок удаляли. В лунки вносили 100 мкл вируса в дозе 100 ЦПД₅₀ (наибольшее разведение, которое вызывает цитопатическое действие в 50% зараженных клеток), которая обуславливала 100%-ную гибель клеток в контроле через 20 ч инкубации при 37°. Оценку ЦПД вируса в лунках с разведениями ИФН проводили с помощью светового инвертированного микроскопа (Meiji Techno, Япония). Титр ИФН рассчитывали как обратную величину разведения ИФН, подавляющего ЦПД вируса в 50% клеток монослоя.

Определение противоопухолевой активности ИФН- α -2b в МТТ-тесте. В исследовании использовали адгезионные культуры клеток меланомы человека линии *melKor* (коллекция ФГБНУ «РОИЦ им. Н.Н.Блохина»). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 («ПанЭко»), содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки, водорастворимые витамины, аминокислоты, пируват натрия, L-глутамин, 10 мМ NEPERE и антибиотики, рН 7,3, при 37° в атмосфере 5% CO_2 . Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста пассивированием культуры через каждые 2—3 дня.

Для регистрации результатов исследования использовали плоскодонные 96-луночные план-

шеты. В каждую лунку помещали по 4 тыс. клеток (200 мкл среды). Через 24—48 ч к ним добавляли препарат ИФН с концентрацией 2000 МЕ. Отрицательным контролем служили интактные клетки, которые находились в тех же условиях, но без ИФН. В качестве положительного контроля использовали Реаферон-ЕС («Вектор-Медика», Россия). Помимо этого проводили контроль буфера, в котором была растворена субстанция. Результаты регистрировали через 24 и 48 ч. Для этого в лунки добавляли по 20 мкл МТТ-красителя (3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолий), обладающего способностью восстанавливаться дегидрогеназами живых клеток до голубого кристаллического формазона, растворимого в ДМСО. После инкубации клеток с красителем в течение 4 ч при 37° в атмосфере 5% CO_2 в лунки добавляли по 200 мкл ДМСО. Результаты регистрировали с помощью ридера Biotrak II (Amersham) посредством измерения ОП образцов при длине волны 530 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью сравнения уровня продукции целевого рекомбинантного белка с использованием разных векторов в работе были получены две векторные конструкции рА-IFN-S и рА-IFN-A (см. рис. 2, 3), различающиеся аппаратом для экспрессии рекомбинантного белка. При планировании генетической конструкции мы оптимизировали нуклеотидную последовательность с учетом частоты встречаемости кодонов в *N. benthamiana*. При химическом синтезе проводили замену 67% нуклеотидной последовательности растения с последовательностью кДНК человека с целью увеличения уровня экспрессии. Полученные конструкции обеспечивают синтез белка, который несет на N-конце последовательность полигистидинового звена (для аффинной хроматографии на Ni-сфарозе, специфически связывающейся с His₆) и специальный аминокислотный линкер, состоящий из гибкого участка и сайта узнавания для специфической энтеропептидазы человека (см. рис. 2 и 3).

Согласно литературным данным и предшествующим работам авторов данного исследования, эффективность работы энтеропептидазы зависит от способности крупной молекулы фермента приблизиться к сайту гидролиза. В данной работе между сайтом расщепления энтеропептидазой и полигистидиновым доменом был введен нейтральный полилинкер, представленный 4 глициновыми остатками. Такой участок, состоящий из простых линейных аминокислот, не образующих жесткие структуры, является конформационно гибкой кон-

струкцией, которая улучшает условия для приближения крупной молекулы энтеропептидазы к сайту гидролиза.

Вирусные векторы были доставлены в листья растений методом агроинъекции с помощью культуры клеток *A. tumefaciens*, предварительно трансформированной конструкциями рА-IFN-S или рА-IFN-A.

Для стимуляции продуктивности и повышения уровня экспрессии вектора, в котором ген целевого белка находится под контролем сильного вирусного 35S-промотора, опыты проводили в условиях совместной агроинъекции смесью агробактерий, несущих вектор с геном чИФН- α -2b, и агробактерий, содержащих ген белка р19 из вируса карликовой кустистости томатов. Белок р19 является супрессором противовирусной реакции клеток растения-хозяина, связанной с «умолканием генов» вирусной РНК. Эффект ингибирования достигается за счет способности белка р19 образовывать комплекс с короткими интерферирующими РНК, которые служат для передачи сигнала к «умолканию генов». Тем самым агроинъекция гена р19 позволяет повысить стабильность РНК, кодирующей чИФН- α -2b [21].

В случае с вирусным вектором, в котором ген целевого белка находится под контролем активного промотора, не было необходимости в совместной агроинъекции по следующим причинам. Данный вектор создан на основе вирусного генома, адаптированного к прохождению ядерной стадии (в природе этот РНК-содержащий вирус не находится в ядре, так как все процессы его развития проходят в цитоплазме), путем удаления критических интронов и вставки природных. После транскрипции и сплайсинга осуществляется экспорт вирусного вектора из ядра в цитоплазму, где происходит характерная именно для вирусов репликация. Эффективность подобного вектора значительно выше, чем невирусного вектора, каковым является конструкция с целевым геном под контролем 35S-промотора.

Для определения времени максимального накопления рекомбинантного белка проводили сравнительный анализ содержания ИФН в зараженных листьях каждые 24 ч после агроинъекции. Установили, что содержание чИФН- α -2b достигает своего максимума на 5-е сутки. Более длительное культивирование растений приводит к гибели зараженного листа, а соответственно и разрушению рекомбинантного белка. В процессе сравнения уровня экспрессии целевого гена при использовании двух разных конструкций стало ясно, что 35S-промотор обеспечивает значитель-

но более низкую продукцию чИФН- α -2b, чем актиновый промотор (до 20 мг растворимого чИФН- α -2b на 1 кг сырой зеленой массы — в первом случае и до 200 мг растворимого белка на 1 кг сырой зеленой массы — во втором). При классическом выращивании растений (в горшках с почвой) экспрессия не была стабильной: выход продукта варьировал от 70 до 200 мг растворимого белка на 1 кг листьев в случае актинового промотора. Мы связываем данную проблему с невозможностью использования стандартизированной почвы, что отражается на скорости роста и развитии растений. Гораздо показательнее в данном контексте использование гидропоники — системы выращивания растений на питательной среде без почвы, которое обеспечивает более равномерное развитие растений. Наши предварительные результаты (данные не опубликованы) также свидетельствуют о более стабильной продукции рекомбинантного белка при сохранении ее высокого уровня в растениях при их росте на искусственной среде (170 \pm 30 мг/кг листьев).

В результате транзитной экспрессии был получен рекомбинантный белок размером 18,5 кДа, что соответствовало нашим ожиданиям: полученный белок несколько тяжелее контрольного чИФН- α -2b за счет наличия полигистидинового домена (рис. 4). чИФН- α -2b был полностью растворим, что исключало необходимость проведения рефолдинга, так часто встречающуюся при использовании бактериального продуцента.

Основным методом очистки в данной работе стала аффинная хроматография на колонке Ni²⁺-сефарозы, к которой проявляет сродство полигистидиновый домен, введенный в рекомбинантную конструкцию. В своих предыдущих работах [22] мы сравнивали аффинные домены His₆ и His₁₂ по нескольким показателям: влияние на уровень экспрессии, растворимость, эффективность адсорбции на сорбенте и уровень гидролиза энтеропептидазой. Мы продемонстрировали, что лучшим вариантом является последовательность, состоящая из 6 гистидиновых остатков, и именно поэтому она была нами выбрана для данного исследования. Наши исследования показали также, что эффективность связывания рекомбинантного белка с аффинным сорбентом увеличивается после проведения предварительной очистки, заключающейся в центрифугировании, фильтровании через пре-фильтр и фильтр с размером пор 1,2 и 0,45 мкм. Нанесение на колонку проводили при комнатной температуре. Весь процесс занимал около 4 ч. Аффинная хроматография обеспечивает высокий уровень очистки рекомбинантных белков, в нашем случае — более, чем 90%-ный. Такая чистота дос-

таточна для исследования противовирусных и противоопухолевых свойств полученного продукта на культурах клеток.

На заключительном этапе проводили удаление полигистидинового домена путем гидролиза энтеропептидазой. В работе использовали легкую цепь L-NEP; эффективность гидролиза составила порядка 50% (рис. 5). В настоящее время ведутся работы по увеличению эффективности работы L-NEP и переносу процесса на аффинную колонку.

Для подтверждения биологической активности полученного белка использовали два метода: изучение противовирусной активности (стандартный) и оценка противоопухолевой активности (использованный в данной работе). Стандартный метод состоял в оценке подавления ЦПД вируса энцефаломиокардита на культуре перевиваемых диплоидных фибробластов легкого эмбриона человека. В качестве сравнения использовали международный стандарт чИФН- α , полученный с помощью бактериального продуцента.

Установлено, что противовирусная активность рекомбинантного чИФН- α -2b, выделенного из растительного продуцента, составляет $2 \cdot 10^6$ МЕ/мг белка. Это означает, что данные методы получения и очистки рекомбинантного белка не приводят к потере его биологической активности.

Биологически активные интерфероны получали из разных видов растений и ранее: с использованием стабильной ядерной трансформации [23, 24], хлоропластной трансформации [25, 26] и транзитной экспрессии [27, 28]. К сожалению, не всегда удается сравнить противовирусную активность препаратов, полученных разными методами. Прежде всего это касается тех случаев, когда исследуется не очищенный белок, а экстракт [28], что по сути некорректно, так как такая система не исключает влияния белков растительной клетки. Однако стоит все же отметить, что по неясным пока для автора причинам в пересчете на мг очищенного белка использование бактериального продуцента или культур клеток животных позволяет получить чИФН- α -2b, активность которого выше, чем у белка из растения ($(1-2,5) \cdot 10^8$ МЕ/мг и $2 \cdot 10^8$ МЕ/мг, соответственно) [29—31].

В соответствии с литературными данными, интерфероны обладают прямым противоопухолевым действием. В связи с этим был проведен МТТ-тест на культурах опухолевых клеток человека линии *melKor*. Результаты исследований представлены на рис. 6. Показана динамика ЦТД рекомбинантного белка в сравнении с фармацевтическим аналогом (Реаферон-ЕС, НПО «Вектор», Россия) через 24 и 48 ч. Все результаты показаны в %

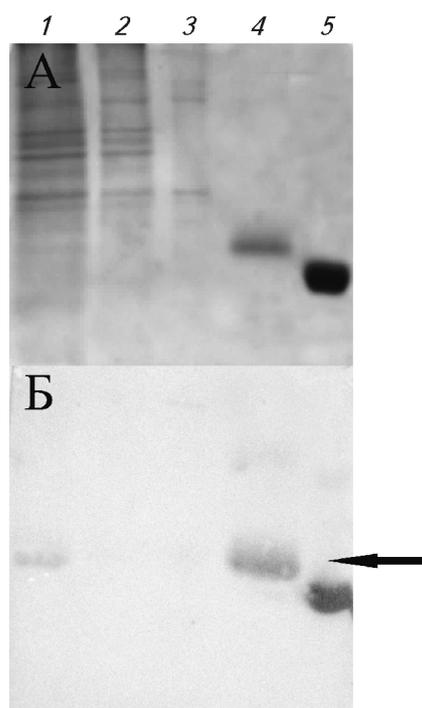


Рис. 4. Анализ продукции и эффективности очистки чИФН- α -2b, полученного из растительного продуцента: А — электрофорез образцов в 12%-ном ПААГ; Б — вестерн-блот-анализ. Стрелкой отмечены белковые полосы, соответствующие чИФН- α -2b-6His: 1 — экстракт листьев, содержащих чИФН- α -2b-6His; 2 — растительные белки, не связавшиеся с Ni^{2+} -сефарозой; 3 — сорбент после элюции целевого белка; 4 — элюат целевого белка; 5 — контроль — чИФН- α -2b без полигистидинового домена

от контроля (без интерферона) для каждого эксперимента. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии статистически значимого эффекта через 24 ч после инкубации опухолевых клеток с рекомбинантными белками, хотя и наблюдается тенденция к снижению количества опухолевых клеток по сравнению с контролем (до 90—95%). Увеличение времени инкубации до 48 ч приводит к возникновению ЦТД, равного примерно 20% (см. рис. 6). При этом рекомбинантный белок не проявляет цитотоксическое действие на нормаль-

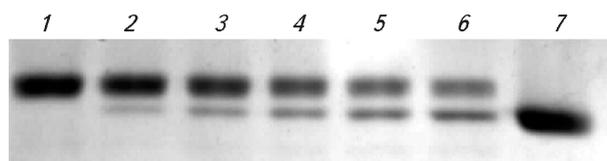


Рис. 5. Электрофорез в 12%-ном ПААГ проб, полученных при подборе условий функционирования L-NEP: 1 — 6 — результаты работы L-NEP при различной концентрации фермента, ед./мг белка (0; 0,3; 0,6; 1,2; 2,5 и 5,0); 7 — контроль, чИФН- α -2b без полигистидинового домена

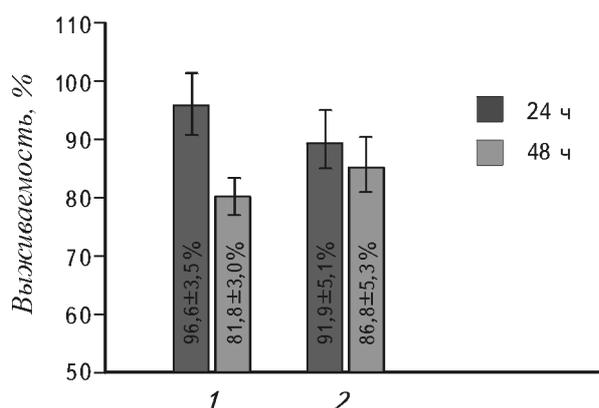


Рис. 6. Противоопухолевое действие чИФН-α-2b-6His, полученного из растительного продуцента, на клетки линии *melKor* (1) в сравнении с действием коммерческого аналога, полученного из бактерий (2), через 24 и 48 ч после внесения в среду интерферона. За 100% принято количество клеток в контроле

ные клетки, в качестве которых мы использовали сперматозоиды быка (данные не приведены). Это свидетельствует о наличии прямого противоопухолевого действия чИФН-α-2b, полученного из растений, на опухолевые клетки линии *melKor*. Нашей дальнейшей целью станет расширение панели опухолевых клеточных линий разного происхождения для изучения специфичности действия исследуемого цитокина и выявления более чувствительной линии.

Таким образом, были получены вирусные векторы, обеспечивающие при использовании транзитной экспрессии продукцию рекомбинантного цитокина чИФН-α-2b, по биологической активности сопоставимого с современным фармацевтическим аналогом. Благодаря использованию вирусной экспрессионной системы, в которой ген чИФН-α-2b находится под контролем промотора гена актина, достигнут высокий уровень продукции рекомбинантного белка — до 200 мг на 1 кг сырой зеленой массы. Дальнейшее увеличение этого показателя возможно в результате оптимизации условий культивирования и очистки. Это делает использование растительной системы экспрессии на основе вирусов перспективной альтернативой существующим методам.

Получено 12.06.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Ершов Ф.И. Пять десятилетий интерферона / Интерферону — 50 лет: Мат. науч. конф. — М., 2007. — С.11 — 34.
2. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). — М.: ГЕОТАР — Медиа, 2005. — 368 с.
3. Рафальский В.В. Клиническое применение препаратов интерферона. — Смоленск: СГМА, РусичПринт, 1997. — 120 с.
4. Кособокова Е.Н. Интерфероны в онкологии / Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков // Врач. — 2010. — № 11. — С. 18 — 21.
5. Asmana Ningrum, R. Human interferon alpha-2b: a therapeutic protein for cancer treatment // Scientifica (Cairo). (<http://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Asmana+Ningrum+2014>).
6. Bracarda, S. Redefining the role of interferon in the treatment of malignant diseases / S. Bracarda, A.M. Eggermont, J. Samuelsson // Eur. J. Cancer. — 2010. — V. 46(2). — P.284—297.
7. Li, L.F. Factors associated with efficacy of pegylated interferon-α plus ribavirin for chronic hepatitis C after renal transplantation / L.F. Li, K.Q. Shi, Y.Q. Lin, L.R. Wang, J.P. He, M. Braddock, Y.P. Chen, M.H. Zheng // Gene. — 2014. — V. 544(2). — P.101—106.
8. Picanco-Castro, V. Patents in therapeutic recombinant protein production using mammalian cells / V. Picanco-Castro, M.C. de Freitas, S. Bomfim Ade, E.M. de Sousa Russo // Recent. Pat. Biotechnol. — 2014. — V.8(2). — P. 165—171.
9. Kusnadi, A.R. Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations / A.R. Kusnadi, Z.L. Nikolov, J.A. Howard // Biotechnol. Bioeng. — 1997. — V. 56(5). — P. 473 — 484.
10. Gomord, V. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production / V. Gomord, A.C. Fitchette, L. Menu-Bouaouiche, C. Saint-Jore-Dupas, C. Plasson, D. Michaud, L. Faye // Plant Biotechnol. J. — 2010. — V. 8(5). — P. 564 — 587.
11. Demain, A. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms / A.L. Demain, P. Vaishnav // Biotechnol. Adv. — 2009. — V. 27(3). — P. 297 — 306.
12. Desai, P.N. Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression / P.N. Desai, N. Shrivastava, H. Padh // Biotechnol. Adv. — 2010 — V. 28(4). — P. 427—435.
13. Mett, V. Plants as biofactories / V.Mett, C.E. Farrance, B.J. Green, V. Yusibov // Biologicals. — 2008. — V.36(6). — P. 354—358.
14. Dorokhov, Y.L. Reciprocal dependence between pectinmethyltransferase gene expression and tobamovirus reproduction effectiveness in *Nicotiana benthamiana* / Y.L. Dorokhov, E.V. Skurat, O.Y. Frolova, T.V. Gasanova, A.A. Smirnov, S.D. Zvereva, P.A. Ivanov, N.V. Ravin, L.I. Zamchuk, I.G. Atabekov // Dokl. Biochem. Biophys. — 2004. — V. 394. — P. 30 — 32.
15. Gleba, Y. Magniffection — a new platform for expressing recombinant vaccines in plants / Y.Gleba, V. Klimyuk, S. Marillonnet // Vaccine. — 2005. — V. 23(17—18). — P. 2042 — 2048.
16. Lico, C. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants / C. Lico, Q. Chen, L. Santi // J. Cell. Physiol. — 2008. — V. 216(2). — P. 366 — 377.
17. Santi, L. Virus-like particles production in green plants / L. Santi, Z. Huang, H. Mason // Methods. — 2006, — V. 40(1). — P. 66 — 76.

18. Verch, T. Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector / T. Verch, V. Yusibov, H. Koprowski // J. Immunol. Methods. — 1998 — V. 220(1—2). — P. 69 — 75.
19. Gasparian, M.E. Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in *Escherichia coli* / M.E. Gasparian, V.G. Ostapchenko, A.A. Schulga, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov // Protein Expr. Purif. — 2003. — V. 31(1). — P. 133 — 139.
20. Meager, A. Biological assays for interferon // J. Immunol. Methods. — 2002. — V.261. — P. 21 — 36.
21. Voinnet, O. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus / O. Voinnet, S. Rivas, P. Mestre, D. Baulcombe // Plant J. — 2003. — V.33(5). — P. 949—956.
22. Кособокова Е.Н. Исследование влияния поли-His доменов на уровень экспрессии и эффективность очистки Интерферона- α -2b человека / Е.Н.Кособокова, В.С. Косоруков // Рос. биотерапевтич. ж. — 2010. — № 4. — С. 107—112.
23. Chen, T.L. Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures / T.L. Chen, Y.L. Lin, Y.L. Lee, N.S. Yang, M.T. Chan // Transgenic Res. — 2004. — V.13(5). — P. 499—510.
24. Sawahel, W.A. The production of transgenic potato plants expressing human alpha-interferon using lipofectin-mediated transformation // Cell Mol. Biol. Lett. — 2002. — V. 7(1). — P. 19—29.
25. Arlen, P.A. Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-alpha2b / P.A. Arlen, R. Falconer, S. Cherukumilli, A. Cole, A.M. Cole, K.K. Oishi, H. Daniell // Plant Biotechnol. J. — 2007. — V.5(4). — P. 511—525.
26. Daniell, H. Chloroplast-derived vaccine antigens and other therapeutic proteins / H. Daniell, S. Chebolu, S. Kumar, M. Singleton, R. Falconer // Vaccine. — 2005. — V. 23(15). — P. 1779—1783.
27. Song, L. Transient expression of chicken alpha interferon gene in lettuce / L. Song, D. G. Zhao, Y.J. Wu, Y. Li // J. Zhejiang Univ. Sci. B. — 2008. — V. 9(5). — P. 351—355.
28. Sindarovska, Y.R. Production of human interferon alfa 2b in plants of *Nicotiana excelsior* by *Agrobacterium*-mediated transient expression / Y.R. Sindarovska, I.M. Gerasymenko, Y.V. Sheludko, Z.M. Olevinskaya, N.Y. Spivak, N.V. Kuchuk // Tsitol. Genet. — 2010. — V.44(5). — P. 60—64.
29. Babu, K.R. Production of interferon-alpha in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli* and its single step purification from refolded inclusion body proteins / K.R. Babu, S. Swaminathan, S. Marten, N. Khanna, U. Rinas // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2000 — V. 53(6). — P. 655—660.
30. Neves, F.O. Overexpression of a synthetic gene encoding human alpha interferon in *Escherichia coli* / F.O. Neves, P.L. Ho, I. Raw, C.A. Pereira, C. Moreira, A.L. Nascimento // Protein Expr. Purif. — 2004. — V. 35. — P. 353—359.
31. Slocombe, P. High-level expression of an interferon alpha 2 gene cloned in phage M13mp7 and subsequent purification with a monoclonal antibody / P. Slocombe, A. Easton, P. Boseley, D.C. Burke // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. — 1982. — V. 79(18). — P. 5455—5459.

E.N. KOSOBOKOVA*, M.V. PINIUGINA,
and V.S. KOSORUKOV

The Blokhin Russian Oncologic Research Center, 115478, Moscow Russia

e-mail: ekkos@mail.ru

Obtaining of Biologically Active Human Interferon- α -2b from *Nicotiana benthamiana* Plants

A method for the production and purification of biologically active recombinant human interferon- α -2b (rhIFN- α -2b) that was synthesized as a result of expression in *Nicotiana benthamiana* plants has been developed. A genetic construct containing the modified gene of hIFN- α -2b was cloned in either of two vectors, first based on tobacco mosaic virus driven by the actin promoter of *Arabidopsis thaliana* (pA-IFN-A), and second, on cauliflower mosaic virus driven by the 35S promoter (pA-IFN-S). The expression vectors were delivered into the plant cells by agroinjection. The maximal synthesis rate was detected 5 days after the injection and was up to 200 mg and 20 mg per kg of fresh leaves for pA-IFN-A and pA-IFN-S, respectively. The recombinant plant-made hIFN- α -2b had as high antiviral and antitumor activity as a commercial drug.

Key words: His-tag, production in plants, rhIFN- α -2b.

* Author for correspondence.