

УДК 577.112.083

М.А. ЖУЧЕНКО*, Н.А. ШАМОНОВ, С.А. ЧЕРЕПУШКИН, Н.А. ГАВРИЛОВА

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», Москва, 117545

e-mail: axiflipper@gmail.com

Технология очистки гибридных рекомбинантных онкопротеинов E7 вируса папилломы человека 16 и 18 типов, конъюгированных с белком теплового шока 70

На начальном этапе работ использовали никель-хелат-аффинную хроматографию для извлечения гибридных белков E7-БТШ70 из дрожжевого лизата. Невысокая степень чистоты мономерной формы E7-БТШ70 в целевой фракции обусловлена наличием димерных и тетрамерных агрегатов целевого белка и низкомолекулярных примесей. Введение в процедуру очистки этапа добавления восстановленного L-глутатиона с целью снижения образования нежелательных дисульфидных связей позволило увеличить чистоту целевого белка за счет уменьшения уровня продуктов олигомеризации. Дальнейшие модификации очистки, предусматривающие снижение гидрофобных взаимодействий при введении глицерина, значительно сократили количество низкомолекулярных примесей. Для более тонкой очистки E7-БТШ70 использовали двухстадийный процесс анионообменной хроматографии, позволивший эффективно удалить низкомолекулярные примеси. Оценка финального материала методом электрофореза в невосстанавливающих условиях показала, что чистота мономерной формы обоих белков превышает 95%.

Ключевые слова: белок теплового шока, димеризация, онкобелок E7, хроматографическая очистка.

Гибридные белки E7(16)-БТШ70 и E7(18)-БТШ70 представляют собой слитые аминокислотные последовательности онкобелка E7 вируса папилломы человека 16 или 18 типа и фрагмента белка теплового шока БТШ70 бактерий *Mycobacterium tuberculosis*, 16 C-концевых аминокислот которого заменены полигистидиновым тагом His(6) (рис. 1).

Природа каждой из структурных единиц гибридного белка E7-БТШ70 оказывает влияние на его физико-химические свойства, которые следует учитывать при разработке технологии очистки рекомбинантного биофармацевтического продукта.

По данным литературы, склонность к олигомеризации свойственна как онкобелкам E7 различ-

ных серотипов, так и высокомолекулярным БТШ. При этом для БТШ существует закономерность увеличения количества олигомерных форм при повышении его концентрации [1].

Изучение структуры E7 показало, что опосредованное молекулой цинка формирование гидрофобного ядра приводит к димеризации белка [2]. Известно, что как димер, так и мономер E7 могут быть биологически активны *in vivo*, при этом димер способен подвергаться значительным конформационным изменениям внутри физиологического диапазона pH, формировать тетрамерные структуры, а в присутствии денатурирующих агентов он может диссоциировать до стабильного развернутого мономера [3].

Жученко Максим Андреевич, Шамонов Николай Алексеевич, Черепушкин Станислав Андреевич, Гаврилова Наталья Андреевна

Список сокращений: АФИ — активный фармацевтический ингредиент; БТШ70 — белок теплового шока 70 кДа; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ДТТ — дитиотреитол; E7 — онкопротеин 7 вируса папилломы человека; ПААГ — полиакриламидный гель; ПАВ — поверхностно-активные вещества; ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота; АТФ — аденозинтрифосфорная кислота; GSH — восстановленный L-глутатион; mAU (milli-absorption unit) — 0,001 единицы абсорбции; PMSF — фенилметилсульфонилфторид.

* Автор для переписки.

E7(16)-БТШ70

1	SMHGDTPTLH	EYMLDLQPET	TDLYCYEQLN	DSSEEEDEID	GPAGQAEPDR	AHYNIVTFCC
61	KCDSTLRLCV	EDLLMGTLGI	QSTHVDIRTL	VCPCSQKPG	SMARAVGIDL	GTTNSVVSVL
121	EGGDPVVVAN	SEGSRTTPSI	VAFARNGEVL	VGQPAKNQAV	TNVDRTVRSV	KRHMGSDWSI
181	EIDGKKYTAP	EISARILMKL	KRDAEAYLGE	DITDAVITTP	AYFNDAQRQA	TKDAGQIAGL
241	NVLRIVNEPT	AAALAYGLDK	GEKEQRILVF	DLGGGTFDVS	LLEIGEGVVE	VRATSGDNHL
301	GGDDWDQRVV	DWLVDKFKGT	SGIDLTKDKM	AMQRLREAAE	KAKIELSSSQ	STSINLPYIT
361	VDADKNPLFL	DEQLTRAEFQ	RITQDLLDRT	RKPFQSVIAD	TGHSVSEIDH	VVLVGGSTRM
421	PAVTDLVKEL	TGGKEPNKGV	NPDEVVAVGA	ALQAGVLKGE	VKDVLLEDVT	PLSLGIETKG
481	GVMTRLIERN	TTIPTKRSET	FTTADDNQPS	VQIQVYQGER	EIAAHNKLLG	SFELTGIPPA
541	PRGIPQIEVT	FDIDANGIVH	VTAKDKGTGK	ENTIRIQEGS	GLSKEDIDRM	IKDAEAHAEE
601	DRKRREEADV	RNQAETLVYQ	TEKFVKEQRE	AEGGSKVPED	TLNKVDAAVA	EAKAALGGSD
661	ISAKSAMEK	LGQESQALGQ	AIYEAQAAS	QATGAAHPGG	EPGGAHPGSA	LNSHHHHHHH

E7(18)-БТШ70

1	SMHGPKATLQ	DIVLHLEPQN	EIPVDLLCHE	QLSDSEEEND	EIDGVNHQHL	PARRAEPQRH
61	TMLCMCKCKE	ARIELVVESS	ADDLRAFQQL	FLNTLSFVCP	WCASQCGSMA	RAVGIDLGTT
121	NSVVSVEGG	DPVVVANSEG	SRTTPSIVAF	ARNGEVLVGQ	PAKNQAVTNV	DRTVRSVKRH
181	MGSDWSIED	GKKYTAPEIS	ARILMKLKR	AEAYLGEDIT	DAVITTPAYF	NDAQRQATKD
241	AGQIAGLNVL	RIVNEPTAAA	LAYGLDKGEK	EQRILVFDLG	GGTFDVSLEL	IGEGVVEVRA
301	TSGDNHLGGD	DWDQRVVDWL	VDKFKGTSIG	DITKDKMAMQ	RLREAAEKAK	IELSSSQSTS
361	INLPYITVDA	DKNPLFLDEQ	LTRAEFQRT	QDLLDRTRKP	FQSVIADTGI	SVSEIDHVV
421	VGGSTRMPAV	TDLVKELTGG	KEPNKGNPD	EVVAVGA ALQ	AGVLKGEVKD	VLLLDVTPLS
481	LGKETKGGVM	TRLIERNTTI	PTKRSETFTT	ADDNQPSVQI	QVYQGEREIA	AHNKLLGSFE
541	LTGIPPAPRG	IPQIEVTFDI	DANGIVHVTA	KDKGTGKENT	IRIQEGSGLS	KEDIDRMKD
601	AEAAAEEDRK	RREEADVRNQ	AETLVYQTEK	FVKEQREAEQ	GSKVPEDTLN	KVDAAVAQAK
661	AALGGSDISA	IKSAMEKLGQ	ESQALGQAIY	EAAQAASQAT	GAHPGGGEPG	GAHPGSA LNS
721	HHHHHHH					

Рис. 1. Аминокислотные последовательности E7(16)-БТШ70 и E7(18)-БТШ70. Серым выделены участки соединения аминокислотной последовательности онкобелка E7 с последовательностью БТШ и полигистидиновые фрагменты

Обозначенные биохимические характеристики E7 во многом определяют выбор стратегии его очистки. Так, в нескольких источниках описывается использование для этой цели комбинации аффинной хроматографии и гель-фильтрации [4, 3]. Имеется также информация об очистке рекомбинантного E7 методом ионообменной хроматографии [5]. В качестве компонентов рабочих буферов и добавок в материал, наносимый на колонки при хроматографической очистке E7, рекомендуется применение денатурирующих и восстанавливающих агентов, среди которых наиболее часто используют мочевины и гуанидин гидрохлорид.

Высокомолекулярные белки теплового шока характеризуются иной природой. Они обладают функциональными особенностями белков-шаперонов и содержат АТР-связывающий и субстрат-связывающий домены, позволяющие регулировать фолдинг белков за счет гидрофобных взаимодействий [6]. Наличие АТР-связывающего сайта послужило предпосылкой для использования при очистке БТШ70 аффинной хроматографии на АТР-агарозной колонке, описанной в ряде работ. Кроме того, встречается информация о применении для очистки БТШ ионообменной хроматографии и гель-фильтрации; многократно описано использование глицерина в составе уравнивающих и элюирующих буферных растворов [1, 7—10].

Аналогичные методы хроматографии могут быть применены для получения очищенных хроматографических фракций гибридных белков, содержащих онкогены папилломы и белок теплового шока. В частности, для очистки гибридного белка E7 16 типа, конъюгированного с белком теплового шока 65 [10], использовали никель-хелатную и анионообменную хроматографию. Однако данные о чистоте полученного рекомбинантного продукта авторами не приведены.

Склонность E7 и БТШ70 к «захвату» низкомолекулярных пептидов, связанная с их шаперонной природой, может приводить к появлению примесей клеточных белков в элюате. Можно предположить, что с этой проблемой сталкивались авторы статей в работах [3—12], проводившие очистку в денатурирующих условиях с использованием специализированных агентов.

Хроматографическая очистка гибридного белка E7(16)-БТШ70, проведенная авторами на ранних этапах изучения его физико-химических свойств, была основана на избирательном связывании целевого рекомбинантного белка с металл-хелатным или АТР-аффинным сорбентами [11]. В обоих случаях чистота белка при оценке окрашенных электрофореграмм в полиакрилмидном геле в присутствии 2%-ного додецилсульфата натрия не превышала 70%, а профиль примесей получен-

ного материала был представлен как низкомолекулярными продуктами гидролиза E7(16)-БТШ70, так и фрагментами белков штамма-производителя *Saccharomyces cerevisiae*. Кроме того, были обнаружены олигомеры целевой молекулы.

В работе [11] приведены результаты использования сильной восстанавливающей пары — додецилсульфата натрия и дитиотреитола — при эксклюзионной хроматографии выделенных фракций E7(16)-БТШ70, позволившей получать элюаты рекомбинантного продукта с чистотой не менее 97%. В то же время, следует отметить, что в рамках разработки терапевтической вакцины для иммунизации человека, действующим веществом которой является рекомбинантный белок E7(16)-БТШ70, использование высокотоксичных анионогенных ПАВ при препаративной хроматографии неприемлемо.

Целью настоящей работы была разработка эффективной технологии очистки гибридных белков E7(16)-БТШ70 методами ВЭЖХ. В разработанном виде она состоит из трех этапов. Первый этап представляет собой захват целевого белка из лизата штамма-производителя на основе избирательного связывания полигистидинового участка E7-БТШ70 с никель-хелатным сорбентом. На втором этапе использовали анионообменную хроматографию для очистки элюата белка. С целью перевода целевого белка в буфер для активной субстанции применяли гель-фильтрационную ВЭЖХ. В работе исследовали влияние восстанавливающих агентов на склонность E7-БТШ70 к олигомеризации с целью их последующего введения в рабочие буферные растворы. Очистку от низкомолекулярных примесей проводили путем изменения состава буферных растворов.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве исходного сырья использовали клеточный лизат штамма *Saccharomyces cerevisiae* SCR-702-E7(16)-HSP70 и SCR-702-E7(18)-HSP70 (ГосНИИгенетика) [12]. Выращивание продуцентов проводили в ферментере Biostat C30 (BBI, Германия) с внесением стерильных подпиток. Биомассу продуцента диспергировали в буфере ЛБ (100 мМ трис-HCl (Sigma, США), pH 8,0, 30 мМ имидазол (Sigma), 500 мМ NaCl (Panreac, Испания), 4 М мочевины (Sigma), 0,1 % полисорбата 20 (Panreac), 1 мМ ЭДТА (Sigma), 5 мМ дитиотреитол (Sigma), 2 мМ PMSF (Sigma), pH 8,0. Клетки разрушали в дезинтеграторе APV 1000 (APV, Дания); общее число циклов дезинтеграции определялось результатами фазово-контрастной микрос-

копии (Carl Zeiss AxioStar, Германия): не менее 95% клеток должно было быть разрушено.

Металл-хелат-аффинная хроматография. В качестве сорбентов использовали IMAC Sepharose 6 FF (GE Healthcare) и IMAC Sepharose 6 HP (GE Healthcare) (размер каждой колонны 50 мм × 20 см).

Отфильтрованный лизат дрожжевых клеток, полученный при дезинтеграции 100 г биомассы, наносили на колонну, промывали 2 л буферного раствора VHP IMAC A1: 20 мМ тригидроксиаминометан гидрохлорид (Sigma), 30 мМ имидазол, 500 мМ хлорид натрия, 0,1% полисорбата 20, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0. Элюцию осуществляли градиентом от 0 до 60 % буфера VHP IMAC A1 и буфера VHP IMAC B1, содержащего 20 мМ тригидроксиаминометан гидрохлорид, 500 мМ имидазол, 500 мМ хлорид натрия, 0,1% полисорбата 20 и 1 мМ ЭДТА, pH 8,0.

Начиная с оптической плотности 30 MAU (длина волны 280 нм) собирали фракцию, содержащую очищенный целевой белок. Измененная схема очистки и факторы, определившие эти изменения, отражены в разделе «Результаты и обсуждение».

Ионообменная хроматография. Для ионного обмена использовали хроматографический сорбент Q HP Sepharose (GE Healthcare) и YMC BioPro Q30 (YMC Co.) (размер каждой колонны 50 мм × 20 см).

Разведенный раствор целевого белка с предыдущей стадии наносили на колонны со скоростью 50 мл/мин, промывали 480 мл буфера VHPQA1: 20 мМ тригидроксиаминометан гидрохлорид, 0,1% полисорбата 20, pH 8,0. Элюцию с колонны осуществляли градиентом (23—45%) буфера VHPQA1 и буфера VHPQB1, содержащего 20 мМ тригидроксиаминометан гидрохлорид, 1 М хлорид натрия и 0,1% полисорбата 20, pH 8,0.

Начиная с оптической плотности 10 MAU (длина волны 280 нм) собирали фракцию, содержащую очищенный целевой белок, элюируемую при содержании буфера VHPQB1 в подвижной фазе от 23% до 45%. Колонну регенерировали 200 мл буфера VHP Q B1 при скорости потока 50 мл/мин.

Изменения в схеме очистки с помощью ионообменной хроматографии отражены в разделе «Результаты и обсуждение».

Концентрирование проводили на сорбенте Q HP Sepharose. Колонну уравнивали 600 мл буферного раствора VHP Q CONC A: 20 мМ тригидроксиаминометан гидрохлорид, 10 мМ восстановленный L-глутатион (Apply Chem), 1 мМ ЭДТА и 0,1 % полисорбата 20, pH 8,0; скорость потока 50 мл/мин. Разведенный раствор целевого белка с пре-

дыдущей стадии наносили на колонну со скоростью 50 мл/мин. Элюцию с колонны осуществляли градиентом (0—100%) буфера VHP Q CONC A и буфера VHP Q CONC B, содержащего 20 мМ тригидроксиаминометан гидрохлорид, 50 мМ восстановленный L-глутатион, 1 мМ ЭДТА и 0,1 % полисорбата 20, pH 8,0.

Начиная с оптической плотности 150 мАУ (длина волны 280 нм) собирали целевую фракцию, которая содержала концентрат очищенного целевого белка и была элюирована при содержании буфера VHP Q CONC B в подвижной фазе 100%. Колонну регенерировали 200 мл буфера VHP Q CONC B при скорости потока 50 мл/мин.

Гель-фильтрационная хроматография. В качестве сорбента использовали Superdex 200 (GE Healthcare) (размер каждой колонны 16 мм × 60 см).

Хроматографию проводили в несколько циклов, нанося каждый раз на колонну не более 5 мл концентрированного раствора целевого белка, полученного на предыдущей стадии. Колонны уравнивали 150 мл буферного раствора VHP SE: 0,86 мг/мл натрия дигидрофосфатмогидрата (Sigma), 6,72 мг/мл натрия гидрофосфатдодекагидрата (Sigma), 8,77 мг/мл натрия хлорида, 50 мг/мл сахарозы (Panreac), 0,005 мг/мл полисорбата 80 (Fluka), pH 7,0 [13]; скорость потока 1,5 мл/мин. Затем наносили еще 5 мл концентрированного раствора целевого белка со скоростью потока 1,5 мл/мин. Колонну промывали 130 мл буферного раствора VHP SE при скорости потока 1,5 мл/мин; целевую фракцию собирали начиная с оптической плотности 100 мАУ (длина волны 280 нм). Целевые фракции объединяли и фильтровали через поливинилиденфторидную мембрану с размером пор 0,2 мкм.

Гель-электрофорез в полиакриламидном геле. Электрофорез проводили по стандартной методике Лэммли в невосстанавливающих условиях в 8 %-ном ПААГ с последующим окрашиванием кумасси R250 (Thermo Scientific) или нитратом серебра (Sigma).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально разработку технологии очистки проводили с использованием E7(16)-БТШ 70. Затем полученные результаты были подтверждены и для гибридного белка E7(18)-БТШ 70.

На первом этапе очистки для захвата из лизата дрожжевых клеток применили аффинную хроматографию. В качестве аффинных сорбентов для очистки белка E7(16)-БТШ70 использовали IMAC Sepharose 6 FF и IMAC Sepharose 6 HP, раз-

личающиеся размером гранул, но обладающие высокой селективностью и емкостью в отношении белков, имеющих полигистидиновую группу на N-конце, минимальной утечкой лиганда, биобезопасностью и стабильностью в широком диапазоне pH [14, 15].

Для элюции была выбрана стандартная схема с градиентом имидазола, позволяющая снизить неспецифическое взаимодействие нецелевых белков с лигандами сорбента и характеризующаяся менее значительной утечкой лиганда с колонны по сравнению с элюцией белка при низких значениях pH. Подвижные фазы были представлены буферными растворами VHP IMAC A1 и VHP IMAC B1.

Значение pH использованных буферных растворов было выбрано равным 8,0 и обусловлено спецификой применяемого сорбента, увеличение емкости которого прямо пропорционально росту pH. Трис использовали из-за его высокой буферной емкости при работе вблизи pH 8,0, хлорид натрия вводили в качестве агента, препятствующего неспецифической сорбции примесных белков по ионообменному механизму, ЭДТА — для дезактивации металлопротеиназ лизата, а полисорбат 20 — для устранения нежелательных гидрофобных взаимодействий.

Эффективность очистки оценивали путем сопоставления чистоты фракций и емкости выбранных сорбентов, рассчитанной по величине площади целевого пика. Анализ результатов чистоты фракций целевого пика, лизата и проскока нанесения (рис. 2) продемонстрировал лучшую разделяющую способность для сорбента IMAC Sepharose FF. Следует отметить, что хотя иллюстративный материал здесь и далее приводится для одного из гибридных белков (E7(16)-БТШ 70 или E7(18)-БТШ 70), другой рекомбинантный белок при очистке ведет себя аналогично. При приблизительно одинаковом количестве олигомеров в целевых фракциях IMAC Sepharose FF обладает большей эффективностью удаления низкомолекулярных примесей, что является приоритетным для получения био-препаратов высокого качества. Вместе с тем, при оценке емкости (данные не приведены) наблюдалось незначительное превосходство IMAC Sepharose HP над IMAC Sepharose FF. Таким образом, для проведения первой стадии очистки рекомбинантных белков E7-БТШ70 целесообразно использование сорбента IMAC Sepharose FF.

В ходе оптимизации очистки, направленной на увеличение емкости сорбента IMAC Sepharose FF за счет понижения концентрации имидазола в промывочном буфере, было установ-

лено, что уменьшение содержания имидазола с 30 мМ до 10 мМ (VHP IMAC A2) приводит к дополнительному загрязнению фракций белка неспецифическими примесями, т.е. минимальная концентрация имидазола в элюирующем буфере для достижения требуемой чистоты составляет не менее 30 мМ.

Для снижения доли олигомерных форм E7-БТШ70 в очищенном рекомбинантном продукте использовали диссоциирующие и хаотропные агенты, которые вносили как в исходный лизат до нанесения на сорбент, так и в элюирующий буфер. Известны два основных механизма агрегации, протекающей посредством образования дисульфидных мостиков и за счет гидрофобных взаимодействий между молекулами [16]. Для удаления дисульфидных мостиков использовали восстанавливающие агенты — восстановленный L-глутатион (GSH), дитиотреитол (ДТТ) и цистин (ApplyChem). Для устранения нежелательных гидрофобных взаимодействий применяли мочевины.

Диссоциирующие агенты вносили в клеточный лизат в концентрации от 10 до 30 мМ и оставляли на ночь при температуре 2—8° и постоянном перемешивании с частотой 200 об/мин. Соотношения моно-, ди- и олигомерных форм целевого белка в обработанных детергентами клеточных лизатах приведены в табл. 1. Содержание различных форм белка в лизате устанавливали по интенсивности окрашенных нитратом серебра белковых полос соответствующей молекулярной массы после электрофореза в ПААГ.

Наибольшую эффективность восстановления продуктов олигомеризации E7-БТШ70 продемонстрировали GSH и ДТТ, а также комбинация этих агентов с мочевиной. Внесение обоих восстановителей в минимальной концентрации 10 мМ позволяет практически в два раза сократить содержание олигомеров в лизате. Добавление в лизат только мочевины без детергентов не является эффективным (см. табл. 2).

Для оценки чистоты целевого белка и его выхода на данной стадии при использовании восстанавливающих пар были проведены два сравнительных процесса очистки — при внесении детергентов в лизаты до нанесения на колонку и при добавлении их в буферы при хроматографической очистке. Буферные растворы VHP IMAC A3, B3 содержали 4 М мочевины и 10 мМ GSH; растворы VHP IMAC A4 и B4 содержали 10 мМ GSH. Количество GSH в буферных растворах было жестко регламентировано спецификацией на сорбент IMAC Sepharose FF, согласно которому его содержание не должно превышать 10 мМ.

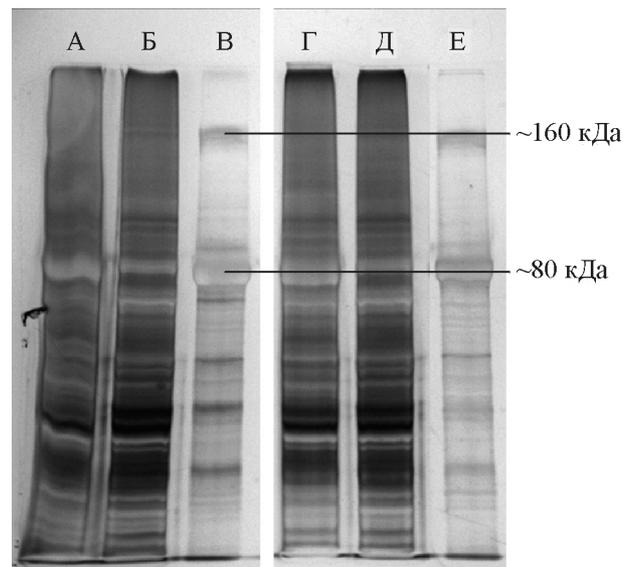


Рис. 2. Контроль чистоты фракций целевого пика после очистки E7(18)-БТШ70 путем металл-хелат-аффинной хроматографии на IMAC Sepharose HP и IMAC Sepharose FF (электрофорез в 8%-ном ПААГ, окраска нитратом серебра): А — лизат, нанесенный на Sepharose HP; Б — пропуск нанесения на Sepharose HP; В — элюат с Sepharose HP; Г — лизат, нанесенный на Sepharose FF; Д — пропуск после нанесения на Sepharose FF; Е — элюат с Sepharose FF

Анализ целевых фракций, полученных при проведении хроматографии по двум указанным протоколам (данные не приведены), подтвердил данные, представленные в табл. 1, показав, что использование обоих буферных растворов позволяет заметно снизить количество продуктов олигомеризации E7(16)-БТШ70, что лишь незначительно снижает выход белка по сравнению со стандартным процессом. Буфер с восстановленным глутатионом в концентрации 10 мМ (VHP IMAC A4, B4) является наиболее эффективным для проведения хроматографической очистки белков E7-БТШ70.

Наличие гидрофобных взаимодействий между целевым и низкомолекулярными белками дрожжевой природы может оказывать значительное влияние на чистоту получаемого продукта. Особенности молекулярного строения белков E7 и БТШ70 могут обуславливать подобные взаимодействия. Для их снижения было выбрано два направления. Первое заключалось в увеличении концентрации полисорбата 20 в буферных растворах до 2% (VHP IMAC A5 и B5). Второе предусматривало изменение коформации белка при введении в буферные растворы компонента, более полярного, чем вода. В качестве такого компонента использовали глицерин (Fluka) в концентрации 10% (VHP IMAC A6 и B6). Оба вещества — и полисорбат, и

Таблица 1

Зависимость доли олигомерных, мономерных форм и низкомолекулярных примесей в препарате E7(16)-БТШ70 от введения восстанавливающих и хаотропных агентов на стадии металл-хелат-аффинной хроматографии

№ серии	Концентрация тестируемого агента				Содержание форм E7(16)-БТШ70 и примесей, %		
	GSH, мМ	ДТТ, мМ	Цистин, мМ	Мочевина, М	Олигомеры	Мономеры	Примеси
1*	–	–	–	–	20	68	12
2	–	–	–	4	18	71	11
3	10	–	–	–	10	80	10
4	30	–	–	–	10	81	9
5	10	–	–	4	11	79	10
6	30	–	–	4	11	80	19
7	–	10	–	–	11	77	11
8	–	30	–	–	12	79	9
9	–	10	–	4	12	77	11
10	–	30	–	4	11	78	11
11	–	–	10	–	15	75	10
12	–	–	30	–	17	73	10
13	–	–	10	4	15	74	11
14	–	–	30	4	15	75	10

*Стандарт сравнения.

глицерин — также добавляли в клеточный лизат до концентраций 2% и 10%, соответственно.

Полученные результаты показали, что изменение концентрации полисорбата не влияет на чистоту целевых фракций при металл-хелат-аффинной хроматографии. Выход продукта также остается неизменным. Использование же полисорбата с глицерином приводило к увеличению чистоты целевого белка. Так, в этом случае значительное количество низкомолекулярных примесей было обнаружено в проскоке после нанесения лизата на сорбент; чистота целевой фракции была оценена приблизительно равной 85% при содержании олигомерных форм 10% (рис. 3).

Для дополнительной очистки гибридных белков использовали ионообменную хроматографию. Необходимым условием сорбции белка на катионообменном сорбенте является поддержание рН буфера ниже рI. При значении рI E7(16)-БТШ70 и E7(18)-БТШ70, близком к 5,0 [13], для сорбции белка был необходим кислый диапазон рН, что может приводить к разрушению и инактивации белка. Исходя из этого очистку проводили на сорбентах анионного обмена. В работе

тестировали сорбенты Q HP Sepharose и YMC BioPro Q30 с матрицей из 6%-ной перекрестно-сшитой агарозы, незначительно различающиеся по размеру гранул.

Для определения границ выхода целевого белка был поставлен предварительный опыт с использованием обоих сорбентов и буферных растворов VHP Q A1 и VHP Q B1.

Результаты сравнительной очистки целевого белка на сорбентах Q HP Sepharose и YMC BioPro Q30 (рис. 4) демонстрируют лучшую способность к разделению целевого и примесных пиков у сорбента Q HP Sepharose. Контроль чистоты фракций показал, что при удалении ЭДТА и GSH из буферных растворов на стадии анионообменной хроматографии E7(16)-БТШ70 повторно подвергается олигомеризации. Для диссоциации олигомеров в буферные растворы по аналогии с первой стадией очистки вносили 10 мМ GSH и 1 мМ ЭДТА (VHP Q A2 и B2).

Анализ суммарной фракции после очистки целевого белка на Q HP Sepharose с использованием буферных растворов VHP Q A2 и B2 показал, что применение анионообменной хроматографии

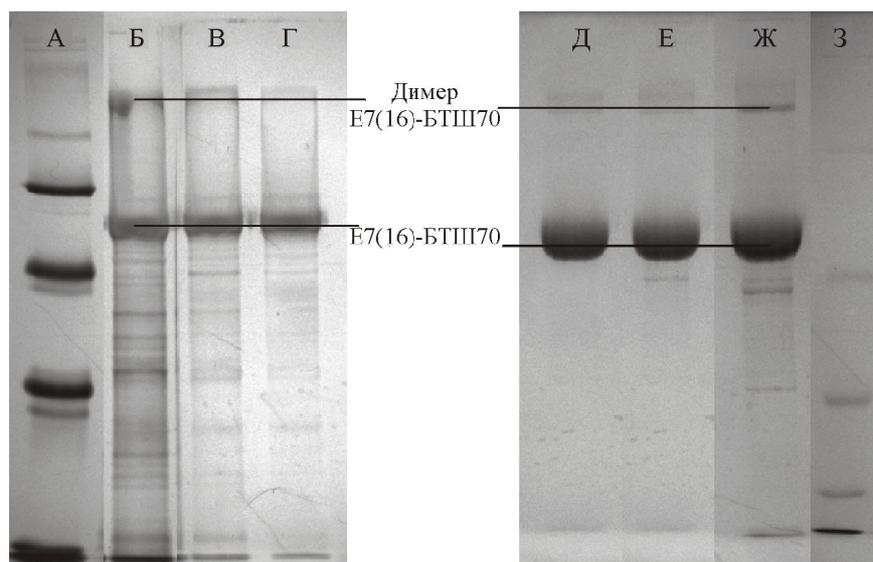


Рис. 3. Сравнительная оценка чистоты элюатов E7(16)-BTSH70 после металл-хелат-аффинной хроматографии при электрофорезе в 8%-ном ПААГ и окрашивании геля нитратом серебра (Б, В, Г) и кумасси (Д, Е, Ж): А, З — маркеры молекулярной массы; Б, Ж — элюат после очистки на IMAC Sepharose FF (буферные растворы IMAC A6 и B6); В, Е — элюат после первичной очистки на Q HP Sepharose (буферные растворы VHP Q A2 и B2); Г, Д — элюат после дополнительной очистки на Q HP Sepharose (буферные растворы VHP Q A7 и B7)

позволило увеличить чистоту целевого белка до 90% при остаточном количестве олигомеров не более 6% (см. рис. 3, В, Е).

Для увеличения степени чистоты материала, полученного после очистки на Q HP Sepharose, было решено подвергнуть его дополнительной

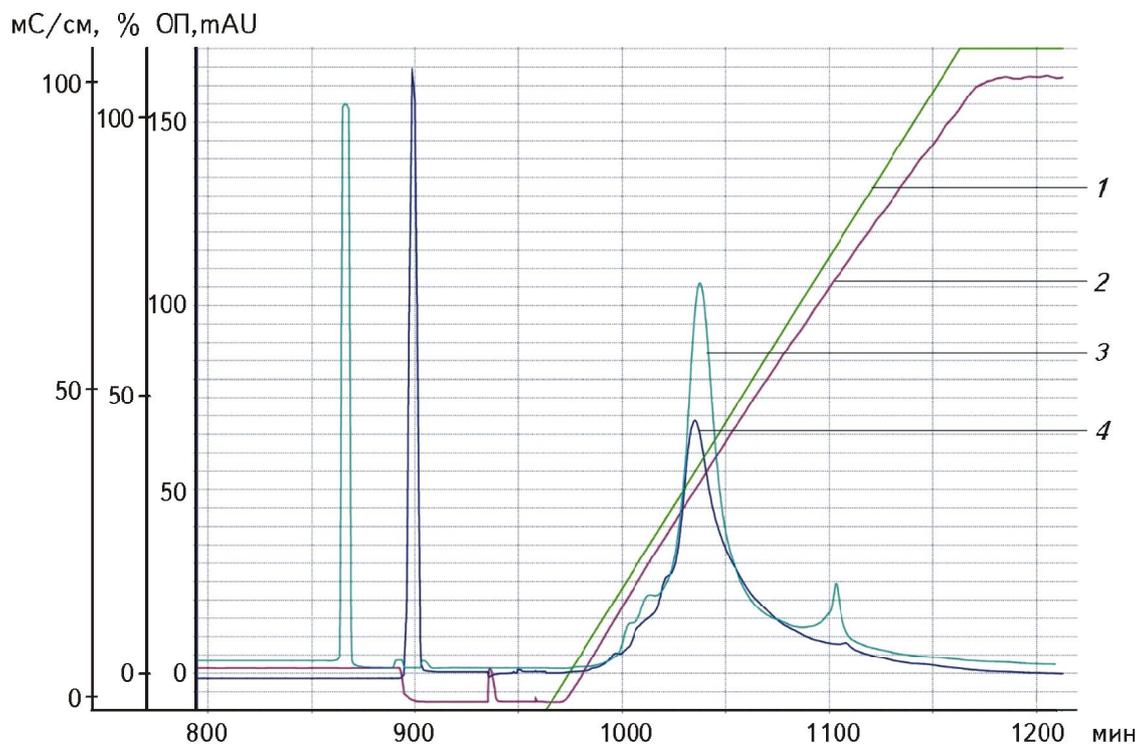


Рис. 4. Хроматограммы, полученные при очистке E7(16)-BTSH70 на анионообменных сорбентах в буферных растворах VHP Q A1 и B1: 1 — содержание элюирующего буферного раствора в подвижной фазе, %; 2 — проводимость, мС/см; 3 — ОП₂₈₀ фракций при очистке на Q HP Sepharose, мАУ; 4 — ОП₂₈₀ фракций при очистке на YMC BioPro Q30, мАУ

очистке на этом же сорбенте. Для перевода низкомолекулярных примесей в проскок нанесения очистку проводили при пониженных значениях pH. Такой подход основан на различиях в значениях изоэлектрической точки целевого и примесных белков. Так, при значении pH выше pI целевой белок имеет отрицательный заряд, необходимый для связывания с анионообменным сорбентом, при этом все примесные белки со значением pI, превышающим pI целевых белков, положительно заряжены и оказываются в проскоке нанесения, не связавшись с сорбентом.

Снижение pH буферных растворов проводили добавлением 2,5 М ацетата натрия (Sigma) до pH от 8,0 до 4,8; в качестве материала нанесения использовали элюат первичной очистки на Q HP Sepharose. Результаты оценивали по показателям чистоты целевых фракций, среднему поглощению в проскоке и наличию в проскоке мономерной формы целевого белка. Результаты отражены в табл. 2 и на рис. 5.

Исходя из данных табл. 2 можно сделать вывод, что при значении pH буферных растворов, равном 5,0 (буферные растворы VHP Q A7 и B7), практически все примесные белки уходят в проскок нанесения, чистота суммарной целевой фракции составляет более 95%, а приблизительное содержание олигомеров — 4%.

Для перевода E7-БТШ70 в буфер хранения АФИ проводили концентрирование с последующим использованием гель-фильтрационной ВЭЖХ. На стадии концентрирования содержание GSH в буферных растворах увеличили до 50 мМ из-за высокой вероятности агрегации целевого белка при росте его концентрации. Гель-фильтрацию осу-

ществляли на сорбенте Superdex 200, эффективно работающем в диапазоне масс 5—250 кДа при приблизительных значениях массы E7(16)-БТШ70 и E7(18)-БТШ70 80 кДа и ориентировочной массе димерных форм 160 кДа.

В ходе финального этапа очистки было определено, что перевод белков в буфер АФИ не влияет на показатели чистоты белка. Полученную субстанцию E7-БТШ70 хранили при температуре -20°.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках разработки технологии очистки рекомбинантных белков E7(16)-БТШ70 и E7(18)-БТШ70 было установлено, что физико-химические свойства гибридных молекул E7-БТШ70, в частности, склонность к образованию агрегатов и связыванию неспецифических низкомолекулярных примесей, аналогичны свойствам каждой из структурных единиц рекомбинантного белка. Захват гибридных белков при хроматографии на никель-хелат-аффинном сорбенте позволил получить первичный материал, отделенный от компонентов клеточного лизата. Контроль чистоты элюата наряду с мономерной формой выявил большое количество низкомолекулярных примесей и агрегированных форм.

Анализ литературы указывает на склонность E7 и БТШ70 к формированию димерных и тетрамерных форм, что соответствует данным, полученным при контроле чистоты препарата. Для сокращения количества олигомерных форм очистки белков на IMAC Sepharose 6 FF модифицировали за счет введения восстанавливающих агентов в состав буферных растворов. В ходе сравнительно-

Таблица 2

Влияние pH буферных растворов целевого белка на эффективность дополнительной очистки E7(16)-БТШ70 на Q HP Sepharose

№ VHP Q A или B	pH	Поглощение в проскоке, мAU	Наличие мономера в проскоке	Чистота целевой фракции, %
2	8,0	0,1	—	~90,0%
3	6,5	6,0	—	~90,5%
4	6,0	7,3	—	~90,7%
5	5,5	7,68	—	~91,1%
6	5,2	8,75	—	~92,8%
7	5,0	8,71	±*	~97,0%
8	4,8	9,77	+	—

* (±) — незначительные количества.

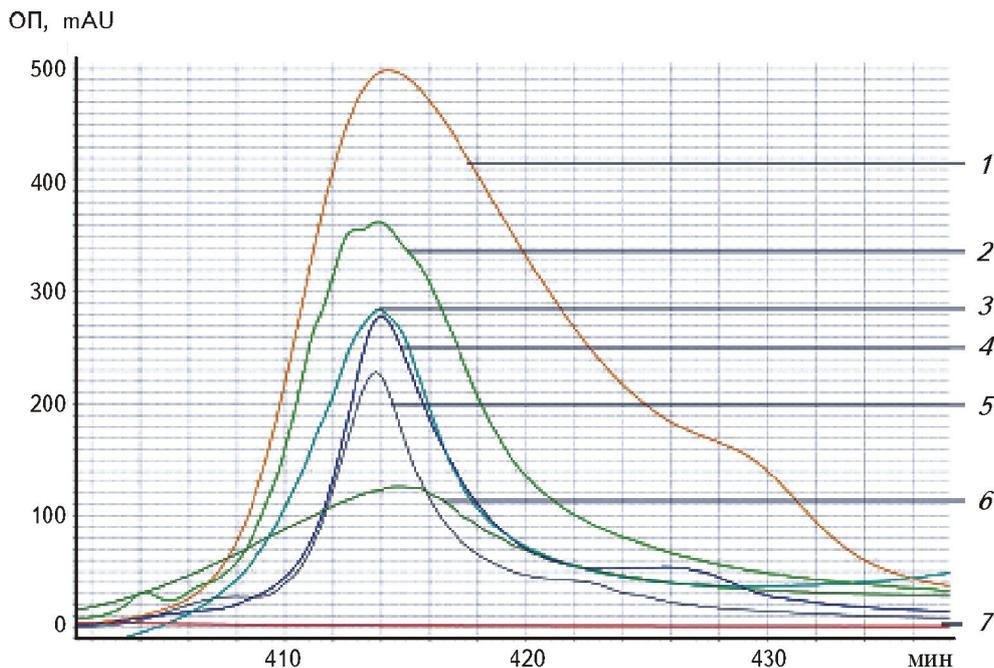


Рис. 5. Хроматограммы дополнительной ионообменной очистки E7(16)-БТШ70 на Q HP Sepharose в буфере с различными значениями pH (см. табл. 2): 1 — VHP Q A2 и B2; 2 — VHP Q A3 и B3; 3 — VHP Q A4 и B4; 4 — VHP Q A5 и B5; 5 — VHP Q A6 и B6; 6 — VHP Q A7 и B7; 7 — VHP Q A8 и B8

го изучения влияния этих агентов на соотношение олигомерных и мономерной форм было установлено, что использование GSH в концентрации 10 мМ способствует эффективной диссоциации агрегатов; при проведении контрольного процесса очистки было показано, что количество олигомеров сократилось вдвое.

Шаперонная активность, свойственная E7 и высокомолекулярным БТШ, как оказалось, также свойственна и гибридной молекуле E7(16)-БТШ70. Гидрофобные взаимодействия, ответственные за эту активность, могут объяснить наличие множества низкомолекулярных примесей дрожжевого происхождения как результат их взаимодействия со специфичными сайтами связывания E7-БТШ70. Глицерин, введенный как в материал нанесения, так и в состав буферных растворов для снижения гидрофобных взаимодействий, позволил значительно понизить количество низкомолекулярных примесей в препарате. Таким образом, после оптимизации процесса очистки на никель-хелат-аффинном сорбенте чистота целевых форм гибридного белка была увеличена на 15%.

Анионообменная хроматография, проведенная с использованием буферных растворов, содержащих GSH, позволила значительно сократить количество олигомерных форм и низкомолекулярных примесей. Дополнительная очистка на анионообменном сорбенте при пониженных значениях pH, проведенная для перевода примесей в про-

сток нанесения, способствовала получению материала с чистотой мономерной формы более 95% и содержанием агрегированных форм 4%.

Разработанная технология трехэтапной очистки во многом совпадает с данными, опубликованным в научной литературе для E7 и белков теплового шока. Однако соотношение диссоциирующих компонентов и диапазон их концентраций для получения биофармацевтической субстанции гибридной молекулы E7(16)-БТШ70 описаны впервые. Важно отметить, что технология одинаково применима к белкам как 16, так и 18 типа, демонстрируя значительную схожесть их свойств.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства промышленности и торговли РФ в рамках государственного контракта № 2012-2.5-16-N08-0016 по теме «Доклинические исследования отечественной терапевтической вакцины против рецидивирующего респираторного папилломатоза и аногенитального кондиломатоза, произведенной на основе клеток эукариот».

Получено 21.04.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Palleros, D. R. DnaK ATPase activity revisited / D. R. Palleros, K. L. Reid, L. Shi, A. L. Fink // FEBS Lett. — 1993. — V. 336. — N. 1. — P. 124—128.

2. *Ohlenschläger, O.* Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7 / O. Ohlenschläger, T. Seiboth, H. Zengerling, L. Briese, A. Marchanka, R. Ramachandran, M. Baum, M. Korbas, W. Meyer-Klaucke, M. Dürst, M. Görlach // *Oncogene*. — 2006. — V. 25. — N. 44. — P. 5953—5959.
3. *Alonso, L. G.* High-risk (HPV16) human papillomavirus E7 oncoprotein is highly stable and extended, with conformational transitions that could explain its multiple cellular binding partners / L. G. Alonso, M. M. Garcia-Alai, A. D. Nadra, A. N. Lapeña, F. L. Almeida, P. Gualfetti, G. D. Prat-Gay // *Biochemistry*. — 2002. — V. 41. — N. 33. — P. 10510—10518.
4. *Alonso, L. G.* Chaperone holdase activity of human papillomavirus E7 oncoprotein / L. G. Alonso, C. Smal, M. M. Garcia-Alai, L. Chemes, M. Salame, G. de Prat-Gay // *Biochemistry*. — 2006. — V. 45. — N. 3. — P. 657—667.
5. *Liu, X.* Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor / X. Liu, A. Clements, K. Zhao, R. Marmorstein // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281. — N. 1. — P. 578—586.
6. *Bukau, B.* The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines / B. Bukau, A.L. Horwich // *Cell*. — 1998. — V. 92. — N. 3. — P. 351—366.
7. *McCarty, J. S.* DnaK as a thermometer: threonine-199 is site of autophosphorylation and is critical for ATPase activity / J. S. McCarty, G. C. Walker // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1991. — V. 88. — N. 21. — P. 9513—9517.
8. *Cegielska, A.* Functional domains of the *Escherichia coli* dnaK heat shock protein as revealed by mutational analysis / A. Cegielska, C. Georgopoulos // *J. Biol. Chem.* — 1989. — V. 264. — N. 35. — P. 21122—21130.
9. *Brown, C. R.* The constitutive and stress inducible forms of hsp 70 exhibit functional similarities and interact with one another in an ATP-dependent fashion / C. R. Brown, R. L. Martin, W. J. Hansen, R. P. Beckmann, W. J. Welch // *J. Cell. Biol.* — 1993. — V. 120. — N. 5. — P. 1101—1112.
10. *Chu, N. R.* Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG) hsp65 and HPV16 E7 / N. R. Chu, H. B. Wu, T. Wu, L. J. Boux, M. I. Siegel, L. A. Mizzen // *Clin. Exp. Immunol.* — 2000. — V. 121. — N. 2. — P. 216—225.
11. *Жученко М.А.* Выделение и идентификация гибридного рекомбинантного онкопротеина E7 вируса папилломы человека 16 типа, конъюгированного с белком теплового шока 70 / М. А. Жученко, Н. А. Шамонов, М. В. Серебрякова, С. А. Черепушкин // *Биотехнология*. — 2015. — № 1. — С. 29—37.
12. *Козлов Д. Г., Чеперегин С. Э., Губайдуллин И. И., Ефремов Б. Д., Тюрин О. В., Залуни И. А.* Способ получения белка E7-HSP70 и штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для его осуществления // Патент РФ № 2489481, С12 1/19, С12N15/62, С12N 15/81, СО7К 14/35, СО7К 14/01, А61Р 31/20. 2013.
13. *Жученко М. А.* Разработка компонентного состава активных фармацевтических субстанций на основе гибридных рекомбинантных белков E7-БТШ70 / М. А. Жученко, Н. А. Гаврилова, С. А. Черепушкин, А. А. Клишин, А. Е. Кухаренко // *Биотехнология*. — 2015. — №1. — С. 38—48.
14. IMAC Sepharose™ 6 Fast Flow [электронный ресурс]. URL: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314787424814/litdoc28404622_AD_20110831150217.pdf
15. IMAC Sepharose™ High Performance [электронный ресурс]. URL: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314787424814/litdoc28404620_20140518231426.pdf
16. *Morris, A. M.* Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature / A. M. Morris, M. A. Watzky, R. G. Finke // *Biochim. Biophys. Acta*. — 2009. — V. 1794. — N. 3. — P. 375—397.

M.A. ZHUCHENKO*, N.A. SHAMONOV,
S.A. CHEREPUSHKIN, and N.A. GAVRILOVA

The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (GosNIIgenetika), 117545, Moscow Russia
e-mail: axiflipper@gmail.com

A Technique for Purification of Hybrid Recombinant E7 Oncoproteins of 16 and 18 Types of Human Papilloma Virus Conjugated with Heat Shock Protein70

A nickel-chelate affinity chromatography has been used to isolate fused proteins of Hsp70-E7 from yeast lysate at the initial stage of the work. The low purity of the monomeric Hsp70-E7 in the final fraction was associated with the occurrence of dimeric and tetrameric forms of the target protein and low-molecular impurities. A modification of the purification process by the addition of reduced L-glutathione to inhibit the formation of unwanted disulfide bonds permitted to increase the purity of the target protein by reducing the content of the oligomerized products. Further changes in the purification protocol, namely the reduction of hydrophobic interactions by the introduction of glycerol, significantly reduced the amount of low-molecular impurities. For a finer purification of E7-HSP70, a two-stage process of anion-exchange chromatography that made it possible to effectively eliminate low-molecular impurities was used. The assessment of the final material by electrophoresis under non-reducing conditions showed that the purity of the monomeric forms of either of the proteins was higher than 95%.

Key words: chromatographic purification, dimerization, E7 oncoprotein, heat shock protein.

* Author for correspondence.