

УДК 615.012.8

## Способ получения рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека

© 2019 Т.И. ЕСИНА<sup>1,\*</sup>, Л.Р. ЛЕБЕДЕВ<sup>1</sup>, Е.А. ВОЛОСНИКОВА<sup>1</sup>, И.П. ГИЛЕВА<sup>1</sup>, Я.С. ГОГИНА<sup>1</sup>, Т.А. ТЕРЕЩЕНКО<sup>1</sup>, Г.В. КОЧНЕВА<sup>1</sup>, А.А. ГРАЖДАНЦЕВА<sup>1</sup>, Е.Д. ДАНИЛЕНКО<sup>1</sup>

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

\*e-mail: esina\_ti@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 27.04.2019 г.

После доработки 25.05.2019 г.

Принята к публикации 05.06.2019 г.

Показан способ получения рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (ГМ-КСФ). Он состоит из процессов наработки биомассы клеток штамма-продуцента, обогащенных целевым белком (до 30% от их суммарного содержания), выделения и очистки. Процесс выделения и очистки включает следующие стадии: дезинтеграцию клеток ультразвуком, отмывку телец включения буферными растворами, солубилизацию ГМ-КСФ из телец включения 6М раствором мочевины, денатурацию с последующей ренатурацией молекул белка и очистку при помощи хроматографии на DEAE-сефарозе и совмещенной хроматографии на CM-сефарозе и Q-сефарозе с последующим диализом. Разработанный способ позволяет из 1 г влажных клеток получить до 10 мг препарата с чистотой 98% и высокой активностью, показанной на линии клеток эритролейкоза человека.

*Ключевые слова:* ГМ-КСФ, штамм-продуцент, культивирование, хроматографическая очистка.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2019-35-3-68-73

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) стимулирует рост гранулоцитов и макрофагов, что позволяет использовать его в клинике для снижения побочных эффектов радио- и химиотерапии, усиления устойчивости к инфекции и для терапии побочных эффектов при трансплантации костного мозга [1]. Показано, что введение рекомбинантного ГМ-КСФ человека (рчГМ-КСФ) онкологическим больным приводит к активации эндогенных моноцитов и макрофагов. Для снижения стоимости препаратов на основе рчГМ-КСФ необходим простой способ производства их субстанции.

Цель исследования – получение биомассы клеток штамма-продуцента, обеспечивающее высокий уровень синтеза рчГМ-КСФ, а также выделение и очистка целевого белка с максимальной эффективностью.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Материал

В работе использовали штамм-продуцент *E. coli* SG20050/p280\_2GM из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (№ В-1369). Культивирование проводили в среде LB, г/л: пептон – 10, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 5.

### Получение биомассы клеток, обогащенных целевым белком

Компетентные клетки *E. coli* SG20050 трансформировали плазмидой p280\_2GM и высевали на агаризованную питательную среду, содержащую ампициллин (100 мкг/мл) и тетрациклин (25 мкг/мл), чашки помещали на ночь в термостат при 36 °С.

*Список сокращений:* ДСН додецилсульфат натрия; ОП – оптическая плотность при определенной длине волны (нм); ПААГ – полиакриламидный гель; рчГМ-КСФ – рекомбинантный человеческий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; DEAE – диэтиламиноэтил анионообменные группы; CM – карбоксиметил катионообменные группы; ED<sub>50</sub> – концентрация препарата, при которой достигается 2-кратный пролиферативный эффект; Q – анионообменная группа четвертичного аммония.

**Подготовка и ферментация посевного материала**

Клетки наиболее продуктивных клонов собирали смывом при помощи шпателя в 0,5 л среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и подращивали на качалке при 36 °С и скорости вращения 160 об/мин до середины логарифмической фазы роста ( $OP_{550} = 0,5-0,6$ ).

Ферментацию проводили в лабораторном ферментере вместимостью 15 л и с объемом питательной среды 10 л. Скорость вращения мешалки в ферментере от 100 до 200 об/мин, подача воздуха 1,0 л/мин на 1 л среды. В ферментер со стерильной питательной средой, содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, вносили посевной материал в количестве, составляющем 5% от объема питательной среды. В процессе ферментации в питательную среду дробно добавляли ампициллин (до 100 мкг/мл).

Ферментацию рекомбинантного цитокина заканчивали в конце логарифмической фазы роста. Культуральную жидкость охлаждали до 5–10 °С, клетки собирали центрифугированием (8000 g, 20 мин) и хранили при температуре –70 °С.

**Анализ содержания целевого белка**

Концентрацию белка в растворах определяли по методу Бредфорда [2]. Белковый состав образцов анализировали с помощью электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с окрашиванием красителем Кумасси G-250 («SIGMA», США). При анализе содержания целевого белка в клетках их собирали микробиологической петлей и суспендировали в 200 мкл буфера для подготовки проб (125 мМ трис-НСl, рН 6,8; 20%-ный глицерин; 3%-ный ДСН; 3%-ный 2-меркаптоэтанол и 0,005%-ный бромфеноловый синий), прогревали 10 мин на кипящей водяной бане и аликвоты по 10 мкл вносили в карманы геля. После проведения электрофореза, окраски и отмывки геля каждую дорожку сканировали при 550 нм, используя лазерный сканометр UltroScan XL (LKB, Швеция). Отбор высокопродуктивных клонов проводили, анализируя данные в программе GelPro3.1.

**Анализ количества плазмидосодержащих клеток**

В процессе культивирования одинаковые аликвоты культуры высевали на чашки с агаризованной средой с ампициллином и без него, культивировали в течение 18 ч при 36 °С, подсчитывали выросшие колонии. Процент плазмидосодержащих клеток рассчитывали делением числа

колоний, выросших на среде с антибиотиком, на число колоний, выросших без селективного давления (без ампициллина).

**Выделение и очистка белка ГМ-КСФ**

10 г влажных клеток суспендировали в 100 мл буферного раствора А (10 мМ трис-НСl, рН 8,0), содержащего 1 мМ фенолметилсульфонилфторида (ингибитор протеиназ). Суспензию помещали в ледяную баню, стенки клеток разрушали при помощи ультразвука до снижения  $OP_{550}$  до 40–45% от ее исходного значения. Затем суспензию центрифугировали (10000 g, 30 мин, 4 °С). Осадок представлял собой тельца включения, содержащие целевой белок ГМ-КСФ и обломки клеточных стенок.

Отмывка телец включения является одним из важных этапов в очистке целевого белка, позволяющим удалить значительные количества примесей. Осадок гомогенизировали в 50 мл буфера А, содержащего 5 мМ ЭДТА, в течение 15–20 мин и суспензию центрифугировали (1-я отмывка).

Полученный осадок гомогенизировали в 50 мл буфера А, содержащего 0,5%-ный детергент тритон X-100, в течение 15–20 мин и центрифугировали (2-я отмывка).

Полученный осадок вновь гомогенизировали в 50 мл буфера А, в течение 15–20 мин и центрифугировали (3-я отмывка).

Отмывку телец включения, содержащих ГМ-КСФ, проводили центрифугированием при 10000 g, 30 мин, 4 °С.

В работе использовали сорбенты для хроматографии DEAE-, CM- и Q-сефарозы (GE Healthcare Bio-Sciences, Швеция) и растворимый DEAE-декстран 500 («Serva», Германия). Реактивы (мочевина, натрия хлорид, натрия фосфат) квалификации х.ч.; фенолметилсульфонилфторид (PMSF, «Gerbu», Германия); набор белковых маркеров (10–250 кДа) («Thermo scientific», Литва).

**Оценка биологической активности ГМ-КСФ человека**

Тест был основан на способности ГМ-КСФ-зависимых клеток линии TF-1 пролиферировать только в присутствии ГМ-КСФ [3]. Пролиферативную активность оценивали по уровню стимуляции пролиферации клеток эритролейкоза человека TF-1 микрометодом на 96-луночных культуральных планшетах с использованием реагента ХТТ (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид) (AppliChem, Германия) [4].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выросшие колонии трансформированных клеток засеивали отдельными секторами на агаризованную среду с антибиотиками. Содержание рекомбинантного ГМ-КСФ в выросших клетках каждого из 12 секторов определяли, как описано в «Условиях эксперимента». Ниже приведена доля (%) целевого белка (ГМ-КСФ) в клетках, выросших из отдельных колоний в секторах (1–12), от количества суммарных клеточных белков:

1 . . . . .	30,7	7 . . . . .	26,3
2 . . . . .	<b>35,4</b>	8 . . . . .	23,4
3 . . . . .	31,9	9 . . . . .	33,3
4 . . . . .	33,2	10 . . . . .	33,8
5 . . . . .	<b>34,2</b>	11 . . . . .	25,6
6 . . . . .	<b>36,5</b>	12 . . . . .	27,2

Из клеток наиболее продуктивных клонов (сектор 2, 5 и 6) готовили посевной материал.

Содержание целевого белка в образцах биомасс составило до  $30 \pm 3\%$ , при этом накопление рчГМ-КСФ составило 90–120 мг на 1 л питательной среды.

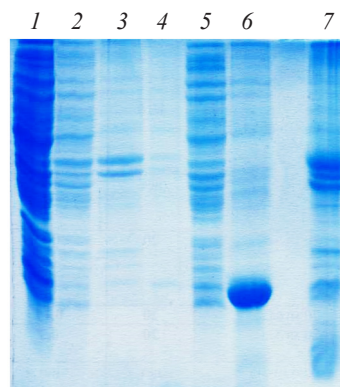
Как видно из табл. 1, дробное добавление ампициллина в процессе ферментации позволило сохранить количество плазмидосодержащих клеток в культуре, и тем самым ее продуктивность.

### Получение телец включения

На электрофореграмме видно (рис. 1), что растворы, полученные в результате отмывок тел включения буфером А, содержащим 5 мМ ЭДТА

(дорожка 1) и 0,5%-ный детергент тритон X-100 (дорожка 2) и чистым буфером А (дорожка 3), практически не содержали целевого белка, при этом в процессе отмывок удалось удалить значительное количество примесного белкового материала.

Для удаления примесей нуклеиновых кислот и липополисахаридов после 3-й отмывки тельца включения дополнительно промывали 0,1%-ным



**Рис.1.** Электрофореграмма надосадочного раствора разрушенных клеток *E. coli* и отмывок телец включения, а также экстракта целевого белка в 15%-ном ПААГ. 1 – раствор после разрушения клеток; 2 – 1-я отмывка; 3 – 2-я отмывка; 4 – 3-я отмывка; 5 – объединенная отмывка; 6 – экстракт целевого белка из телец включения; 7 – состав конечного осадка после экстракции целевого белка

**Fig.1.** SDS-PAGE analysis (15%) of the results of washes of inclusion bodies, lanes: (1), solution after cell lysis; (2), wash № 1; (3), wash № 2; (4), wash № 3; (5), combined wash; (6), extract of the target protein from inclusion bodies; (7), the composition of the final pellet after the target protein extraction

Таблица 1

### Содержание плазмидосодержащих клеток (Ap<sup>r</sup>) популяции в ходе ферментации

#### *E. coli* 20050/p280\_2GM

The content of plasmid-containing cells (Ap<sup>r</sup>) of the population during the fermentation of *E. coli* 20050/p280\_2GM

Продолжительность роста, ч	Без добавления Ap		С добавлением Ap в процессе ферментации	
	ОП <sub>550</sub>	Ap <sup>r</sup> клетки, %	ОП <sub>550</sub>	Ap <sup>r</sup> клетки, %
0	0,18	–	0,17	–
1	0,22	86	0,23	85
3*	0,40	81	0,41	82
4	0,55	80	0,54	82
5*	0,68	77	0,66	80
6	1,10	70	0,95	81
8	1,40	57	1,30	78
9	1,80	47	1,70	74
10,5	2,20	36	2,10	68

\*Ферментация с дробным добавлением в питательную среду ампициллина в концентрации 100 мкг/мл (Fermentation with fractional addition of ampicillin in a nutrient medium at a concentration of 100 µg/mL).

DEAE-декстраном и 0,2 М NaCl (по 50 мл) в буфере А. Важно было, чтобы оптическая плотность  $OP_{260}$  и  $OP_{280}$  в надосадочной жидкости при последней отмывке составляла менее 0,1 отн.ед/мл.

Для экстракции рчГМ-КСФ из телец включения было экспериментально выбрано значение рН буферного раствора, при котором происходит максимальное извлечение целевого белка при его минимальном загрязнении экстрагируемыми примесями. Экспериментально была определена концентрация мочевины 6М при рН 8,3±0,3.

Осадок телец включения суспендировали в 50 мл буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl, рН 8,3 и 6 М мочевины, до гомогенности в течение 2 ч. Затем суспензию центрифугировали (20000 g, 50 мин, 4 °С) и собирали надосадочный раствор, содержащий целевой белок (рис. 1, дорожка б), который практически полностью экстрагировался в буферный раствор. Чистота белка достигала 70–75 %.

#### Денатурация и ренатурация белка рчГМ-КСФ

К полученному экстракту добавляли буферный раствор, содержащий 10 мМ трис-НСl, рН 8,0 и 6М мочевины, до конечной концентрации белка 1–2 мг/мл. Для разрыва неправильно замкнутых дисульфидных связей в раствор вносили 2-меркаптоэтанол до конечной концентрации 20 мМ и инкубировали 18–20 ч при температуре 20±2 °С.

Далее раствор денатурированного и восстановленного белка охлаждали на ледяной бане и добавляли при интенсивном перемешивании девять объемов буфера А, содержащего 5 мМ ЭДТА, охлажденного до 6±2 °С. Полученную смесь перемешивали при температуре (6±2) °С в течение 24±2 ч.

#### Хроматографическая очистка белка рчГМ-КСФ

Раствор ренатурированного белка центрифугировали (10000 g, 30 мин, 4 °С). Надосадочную жидкость разбавляли в 2 раза буфером А и нано-

сили на колонку (50 мл) с анионообменным сорбентом (DEAE-сефароза), уравновешенную тем же буфером. После нанесения раствора ренатурированного белка колонку промывали буфером А. Белки, связавшиеся с сорбентом, элюировали градиентом концентрации NaCl от 0 до 1 М в буфере А. Белок рчГМ-КСФ полностью сорбировался, и затем его элюировали с колонки при достижении концентрации соли в буфере 0,2–0,3 М. Фракции с  $OP_{280}$  выше 0,25 о.е. анализировали при помощи электрофореза в денатурирующих условиях в 15%-ном ПААГ. Объединенную фракцию, содержащую целевой белок, диализовали против 1 л буфера А в течение ночи при 6±2 °С.

Для более полной очистки целевого белка раствор наносили на соединенные последовательно колонки с катионообменным (СМ-сефароза, 25 мл) и анионообменным (Q-сефароза, 10 мл) сорбентами, уравновешенными буфером А. После нанесения колонки промывали буфером А. Затем колонку с сорбентом СМ-сефароза, на которую рчГМ-КСФ не сорбируется в этих условиях (рН 8,0), отсоединяли, а белки, связавшиеся с сорбентом Q-сефароза, элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 1 М в буфере А. Фракции, с  $OP_{280}$  выше 0,25 о.е. анализировали при помощи электрофореза в денатурирующих условиях в 15% ПААГ и содержащие белок рчГМ-КСФ, объединяли. Раствор высокоочищенного белка диализовали против буфера А, содержащего 50 мМ NaCl. Полученный раствор белка подвергали стерилизующей фильтрации через фильтры с размером пор 0,22 мкм и хранили порциями при –18...–20 °С. Суммарные данные по очистке (в %) и выходу рчГМ-КСФ(мг) из 10 г биомассы приведены в табл. 2.

Из данных таблицы видно, что выход целевого белка с чистотой 98% составляет более 10 мг в пересчете на 1 г влажных клеток.

Таблица 2

#### Данные по выходу из 10 г биомассы очищенного белка рчГМ-КСФ

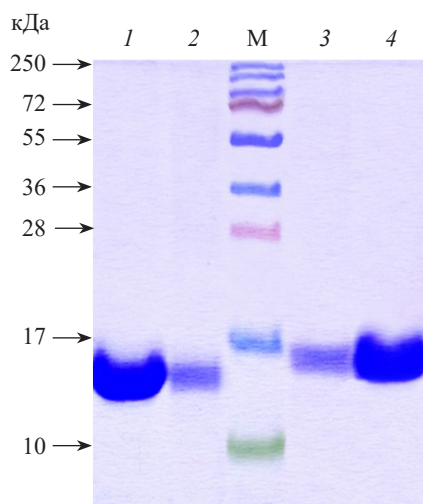
Yield of the protein rhGM-CSF in the process of purification from 10 g of biomass

Стадия очистки белка рчГМ-КСФ	Раствор белка, мл	Суммарный белок		Белок рчГМ-КСФ	
		мг/мл	мг	%	мг
Солюбилизация	160	2,22	355,2	72,8	258,6
Денатурация	160	1,92	306,9	77,9	239,1
Ренатурация	2400	0,09	203,5	86,1	175,2
Хроматография белка на DEAE-сефарозе	198,8	0,60	119,3	93,8	111,9
Хроматография белка на Q-сефарозе	44,1	2,58	113,8	97,7	111,2
Диализ	44,2	2,46	108,7	98,0	106,6

Чистоту и гомогенность субстанции белка рчГМ-КСФ определяли методом электрофореза в 15%-ном ПААГ с последующим сканированием дорожек геля и анализом данных в программе GelPro3.1 (рис. 2).

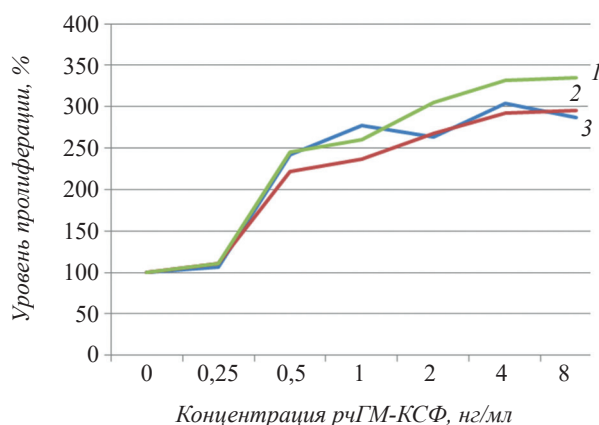
На электрофореграмме (рис. 2, дорожки 3, 4) видно, что подвижность полос белка, обработанного 2-меркаптоэтанолом, снижается, вероятно, за счет разрыва дисульфидных связей и утраты компактной структуры, тогда как без обработки меркаптоэтанолом молекулы имеют замкнутые дисульфидные связи, более компактную структуру, которая позволяет им быстрее продвигаться в порах ПААГ. Гомогенность полос белка при денситометрическом анализе дорожек электрофореграммы без обработки меркаптоэтанолом свидетельствует о том, что все молекулы белка в процессе ренатурации образуют правильно замкнутые внутримолекулярные дисульфидные связи. Содержание мономерной формы белка рчГМ-КСФ с молекулярной массой  $15,2 \pm 0,5$  кДа в редуцирующих условиях при окрашивании составляло не менее 98%.

Биологическую активность рчГМ-КСФ оценивали по уровню стимуляции пролиферации клеток эритролейкоза человека TF-1, как описано в Условиях эксперимента. На рис. 3 показаны ре-



**Рис. 2.** Электрофореграмма очищенного рчГМ-КСФ в 15%-ном ПААГ. Дорожки 1, 2 – 40 и 10 мкг белка, нередуцирующие условия (без 2-меркаптоэтанол); 3, 4 – 10 и 40 мкг белка, редуцирующие условия (обработка 2-меркаптоэтанолом); М – маркер молекулярной массы

**Fig. 2.** Electrophoregram of purified rhGM-CSF in 15% polyacrylamid gel. Lanes 1, 2 – 40 and 10 µg of protein, non-reducing conditions (without mercaptoethanol); 3, 4 – 10 and 40 µg of protein, reducing conditions (treated with mercaptoethanol); M – molecular weight protein markers



**Рис. 3.** Зависимость уровня пролиферации клеток эритролейкоза человека TF-1 от концентрации рчГМ-КСФ после каждой из трех серий (1–3)

**Fig. 3.** Dependence of the level of proliferation of human erythroleukemia TF-1 cells on the concentration of three series (1–3) of rhGM-CSF

зультаты оценки гемостимулирующей активности рчГМ-КСФ (серии 1–3), полученные в результате проведения трех процессов выделения и очистки целевого белка.

Из рис. 3 видно, что значение  $ED_{50}$  для всех образцов препаратов составляет 0,3–0,4 нг/мл. Это сопоставимо с литературными данными: для рекомбинантного белка рчГМ-КСФ диапазон значений  $ED_{50}$  составляет 0,1–0,6 нг/мл ([5], <http://sci-store.ru/rostovye-factory-i-citokiny/granulocitarnomakrofagalnyu-kolonie-stimuliruyushchiy-faktor-cheloveka-rhgm-csf-rekombinantnyy-belok.html>).

Таким образом, показан способ получения субстанции рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека, состоящий из процессов наработки биомассы клеток штамма-продуцента, обогащенных целевым белком до 30% от их суммарного содержания, выделения и очистки. Процесс выделения и очистки включал следующие стадии: дезинтеграцию клеток ультразвуком, отмывку телец включения буферными растворами, солюбилизацию ГМ-КСФ из телец включения 6М раствором мочевины, денатурацию с последующей ренатурацией молекул белка и очистку при помощи хроматографии на DEAE-сефарозе и совмещенной хроматографии на CM-сефарозе и Q-сефарозе с последующим диализом. Разработанный способ позволяет получить до 10 мг препарата с чистой 98% из 1 г влажных клеток и высокой активностью, показанной на линии клеток эритролейкоза человека.

Работа проводилась в рамках выполнения темы государственного задания «Отработка технологии препаративной наработки и очистки рекомбинантных белков» № 13/18.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Половинкина В.С., Косоруков В.С. Рекомбинантный чГМ-КСФ в онкологии. *Российский биотерапевтический журнал*, 2009, 8(1), 29–39.
2. Bradford M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1–2), 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
3. Топоркова Л.Б., Орловская И.А., Сенников С.В. и др. Изучение *in vitro* биологических свойств рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора. *Иммунология*, 2009, 4, 203–206.
4. Гражданцева А.А., Сиволобова Г.Ф., Ткачева А.В. и др. Высокоэффективная продукция биологически активного секретлируемого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека рекомбинантным вирусом осповакцины. *Биотехнология*, 2015, 31(5), 13–21.
5. Hercus T. R., Bagley, C. J., Cambareri B., et al. Specific human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sci.*, 1994, 13, 5838–5842. doi: 10.1073/pnas.91.13.5838

## Method for Obtaining Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

T.I. ESINA<sup>1,\*</sup>, L.R. LEBEDEV<sup>1</sup>, E.A. VOLOSNIKOVA<sup>1</sup>, I.P. GILEVA<sup>1</sup>, Ya.S. GOGINA<sup>1</sup>, T.A. TERESHCHENKO<sup>1</sup>, G.V. KOCHNEVA<sup>1</sup>, A.A. GRAZHDANTSEVA<sup>1</sup>, E.D. DANILENKO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 630559, Koltsovo, Novosibirsk oblast

\*e-mail: esina\_ti@vector.nsc.ru

Received April 27, 2019

Revised May 25, 2019

Accepted June 05, 2019

**Abstract**—A suggested method for obtaining recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) includes the accumulation of the producer strain biomass enriched with the target product up to 30% of total protein content, its isolation and purification. The later consists of the following stages: ultrasound cell disintegration, washing of inclusion bodies with buffer solutions, GM-CSF solubilization from inclusion bodies by 6 M urea, denaturation–renaturation of protein molecules and purification by chromatography on DEAE-Sepharose and combined chromatography on CM-Sepharose and Q-Sepharose followed by dialysis. The proposed method makes it possible to yield up to 10 mg of the protein preparation from 1 g of wet cells with the purity of 98% and high activity shown on the human erythroleukemia cell line.

**Key words:** granulocyte-macrophage colony-stimulating, GM-CSF, producer strain, cultivation, chromatographic purification.

**Acknowledgements**—The work was performed in the framework of the State Assignment «Adjustment of the Technology of Preparative Obtaining and Purification of Recombinant Proteins» (no. 13/18).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-3-68-73