

УДК 577.15

СОЗДАНИЕ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ГИБРИДНЫХ ИНТЕРФЕРОНОВ АЛЬФА-2 ЧЕЛОВЕКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТА ЭНТЕРОПЕПТИДАЗЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИНТЕРФЕРОНОВ БЕЗ N-КОНЦЕВОГО ОСТАТКА МЕТИОНИНА

© 2011 г. Д. А. Широков^{1*}, В. В. Рябиченко¹, Р. И. Акишина¹, Т. П. Оспельникова²,
А. В. Глазунов¹, Г. Г. Честухина¹, В. П. Вейко¹

¹Государственный научный центр “ГосНИИ генетика”, Москва, 117545

²Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Минздрава России, Москва, 123098

Поступила в редакцию 21.09.2010 г.

Принята к печати 14.10.2010 г.

Разработана технология получения интерферонов альфа-2а (IFN- α 2а) и альфа-2b (IFN- α 2b) человека, не содержащих N-концевого остатка метионина. Прежде всего, сконструировали плазмиды, содержащие гены гибридных IFN- α 2 под контролем различных промоторов; в проксимальной части этих генов содержались различные варианты последовательности, кодирующей сайт гидролиза фермента энтеро-пептидазы. В результате получено четыре штамма *Escherichia coli*, продуцирующих гибридные IFN- α 2, подобраны и оптимизированы условия ренатурации интерферонов и гидролиза их N-концевой части, а также хроматографической очистки безметиониновых IFN- α 2 человека.

Ключевые слова: интерферон-альфа2а, интерферон-альфа2b, энтеро-пептидаза, энтерокиназа.

DESIGNING OF HYBRID HUMAN INTERFERON ALFA-2 STRAIN-PRODUCERS AND THE USE OF ENTEROPEPTIDASE FOR OBTAINING N-TERMINAL METHIONINE-FREE INTERFERONS, by D. A. Shirokov^{1*}, V. V. Ryabichenko¹, R. I. Akishina¹, T. P. Ospel'nikova², A. V. Glazunov¹, G. G. Chestukhina¹, V. P. Veiko¹ (¹State Research Center “GosNII Genetika”, Moscow, 117545 Russia, *e-mail: lab19@genetika.ru; ²Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, 123098 Russia). A system for production of human interferon- α 2а (IFN- α 2а) and IFN- α 2b lacking N-terminal methionine has been developed. Plasmids containing genes of hybrid IFN- α 2 under the control of different promoters were constructed; a sequence encoding the enteropeptidase hydrolysis site being introduced in proximal part of the genes. As the result, 4 strains of *Escherichia coli* producing hybrid IFN- α 2 have been obtained. The methodology for IFN- α 2 renaturation, hydrolysis of its N-terminal part, chromatographic purification of N-terminal methionine-free IFN- α 2 has been developed.

Keywords: interferon- α 2а, interferon- α 2b, enteropeptidase, enterokinase.

ВВЕДЕНИЕ

Интерфероны альфа (IFN- α) принадлежат к семейству цитокинов позвоночных животных, секретируемых в ответ на вирусную инфекцию и индуцирующих антипролиферативный эффект при онкологических заболеваниях. В это семейство входит множество близкородственных полипептидов, каждый из которых состоит из 161–171 аминокислотных остатков (в зрелом белке). Действие IFN- α носит плейотропный характер; это, в частности, усиление экспрессии молекул МНС-1, синтез фермента 2',5'-олигоденилатсинтетазы, запускающего каскад ре-

акций расщепления вирусной РНК, индукция серин/треонинкиназы Р1, инактивирующей трансляционный фактор eIF-2, а, следовательно, и синтез белков в эукариотической клетке. Кроме того, IFN- α активируют клетки иммунной системы: макрофаги и НК-клетки, — действие которых направлено на лизис вирус-инфицированных клеток [1].

Использование интерферонов в медицинской практике позволяет добиться значительных успехов в терапии онкологических и вирусных заболеваний [2, 3]. В настоящее время широчайшее применение находят рекомбинантные IFN- α , полученные экспрессией в бактериях *Escherichia coli* [4]. Однако стадии выделения и очистки таких рекомбинантных

* Эл. почта: lab19@genetika.ru

белков затруднены из-за гетерогенности по N-концу: в одних молекулах рекомбинантного белка сохраняется формилированный N-концевой метионин (fMet), а в других его нет. В норме в клетках *E. coli* N-концевой fMet удаляют два фермента: пептидилдеформилаза убирает с Met остаток муравьиной кислоты, а метионинаминопептидаза — N-концевой метионин. Однако в условиях суперэкспрессии рекомбинантных белков в бактериальной клетке количество этих ферментов оказывается недостаточным для обеспечения полного отщепления fMet [5].

В таких случаях в белковой инженерии достаточно давно и с успехом используют фермент энтеропептидазу (энтерокиназу) [6]. Субстратом фермента служит аминокислотная последовательность Asp-Asp-Asp-Lys↓ (D₄K в однобуквенном коде) [7]. Введя такой пентапептид в заданную позицию полипептидной цепи (в случае IFN-α это будет N-концевой fMet) и затем, обработав полученный полипептид энтеропептидазой, получают белки, лишенные N-концевой части (в случае IFN-α получим лишенный fMet рекомбинантный белок — далее: безметиониновый IFN-α).

На настоящий момент в научной литературе отсутствуют статьи, посвященные получению безметиониновых IFN-α с помощью энтеропептидазы. Недавно Ли и Хуанг (Li & Huang, [8]) описали получение IFN-λ, лишенного с помощью энтеропептидазы N-концевого fMet, а Семихин с коллегами [9], также с помощью энтеропептидазы, получили безметиониновый IFN-β. Но ни в одной из этих работ условия гидролиза рекомбинантных белков энтеропептидазой подробно не описаны.

В данной работе детально описана методология использования энтеропептидазы для получения безметиониновых интерферонов и предложены способы преодоления проблем, которые могут возникнуть при проведении экспериментов такого рода.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Конструирование плазмид, содержащих гены IFN-α2a или IFN-α2b. Исходный ген IFN-α2b в составе плазмидного вектора pSX50 получен от ООО “Фармапарк” (Россия) [10]. Ген IFN-α2a, отличающегося от IFN-α2b аминокислотной заменой Arg23Lys, получили с помощью сайт-направленного мутагенеза, используя следующие праймеры:

5'-CACAGATGCGTAAAATCTCTCTTTTC-3' и 5'-GAAAAGAGAGATTTTACGCATCTGTG-3'. Мутагенез проводили методом ПЦР, более быстрым и эффективным, чем ранее использованный в нашей лаборатории метод получения мутантных форм интерферонов [11].

Для дизайна генов IFN-α2, содержащих последовательность, кодирующую на N-конце белковой молекулы сайт расщепления энтеропептидазой, синтезировали следующие олигонуклеотиды:

5'-GCCTCTAGATGGCGGATGATGATGATAAATGTGATCTGCCTCAAACC-3' и 5'-CGACCATGGCGCATCATCATCACCATCACCATGATGATGATAAATGTGATCTGC-3'. Эти олигонуклеотиды, кодирующие соответствующие пептиды: Met-Ala-(Asp)₄-Lys и Met-Ala-(His)₆-(Asp)₄-Lys, — использованы для получения с помощью ПЦР генов гибридных интерферонов. Гибридные гены клонировали в составе плазмиды pSX50 по сайтам XbaI и PstI и в составе плазмиды pET16b (“Novagen”, США) по сайтам NcoI и BamHI. Последовательность генов подтверждена автоматическим секвенированием. Все олигонуклеотиды, использованные в работе, синтезированы на ДНК-синтезаторе ASM 800 (“Биоссет”, Россия).

Ферментация штаммов. Полученными плазмидами трансформировали штаммы *Escherichia coli* BL21 и BL21(DE3) [12], для культивирования бактериальных клеток использовали 2-л ферментеры Bio-stat B-DCU (“B. Braun Biotech”, США).

В случае штамма BL21 с плазмидами pSX ферментацию проводили в аэробных условиях на минеральной среде M9, содержащей 1% казаминовых кислот, 1% глюкозы и 40 мг/л канамицина. Клетки культивировали при pH 7.0–7.4 и температуре 38–39°C до оптической плотности 20 о.е. при длине волны 600 нм.

В случае штамма BL21(DE3) с плазмидами pET, в состав которых входит индуцибельный промотор, ферментацию проводили в аэробных условиях на среде LB (с добавлением микроэлементов из среды M9), содержащей 1% фруктозы и 150 мг/л ампициллина. Клетки культивировали при pH 7.0–7.4 и температуре 37°C до оптической плотности 12 о.е. (при 600 нм), после чего, для индукции биосинтеза интерферона, к клеткам добавляли лактозу (в количестве 20 г/л) и культивировали до 18–20 о.е. (при 600 нм). Наличие целевого белка подтверждали методом электрофореза в 12%-ном ПААГ в присутствии SDS [13].

Вестерн-блоттинг. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану Hybond (“Amersham”, Великобритания) осуществляли с помощью аппарата для блоттинга Transblot SD (“BioRad”, США) с ограничением по току (20 мА) в течение 1.5 ч в буфере для переноса (47.9 мМ Трис, 38.6 мМ глицин, 0.04% SDS и 20% метанол). Далее, в течение ночи при +4°C, мембрану инкубировали в 1% BSA. Затем мембрану последовательно обрабатывали мышинными моноклональными антителами к IFN-α2 (клон ММНА-2, “Pierce”, США) и кроличьими антителами к конъюгированным с пероксидазой хрена (“Имтек”, Россия). Мембрану тщательно промывали фосфатным буфером, содержащим 0.05% Tween-20. В качестве субстрата использовали тетраметилбензидин (“Sigma”, США).

Ренатурация рекомбинантных белков. После завершения процесса ферментации бактериальные

клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин при температуре +4°C, полученный осадок ресуспендировали в буфере: 50 мМ Трис, рН 8.0, 1% Triton X-100, — после чего выделяли фракцию телец включения по методике [12]. Тельца включения растворяли в 6 М растворе гуанидин-НСl, через 30 мин добавляли растворы 1 М Трис, рН 8.0 (до конечной концентрации 20 мМ), и 0.5 М DTT (до конечной концентрации 40 мМ) и инкубировали 3 ч при 20°C. Далее проводили частичную ренатурацию белка-предшественника путем 200-кратного разведения полученного раствора буфером следующего состава: 20 мМ Трис, рН 4.8, 0.2 М мочевины, 20 мМ NaCl, 0.1% Triton X-100 — с последующей инкубацией при температуре 4°C в течение 2 ч.

Энтеропептидазная реакция. В ренатурирующий раствор белка-предшественника добавляли энтеропептидазу и CaCl₂ (конечные концентрации 0.2 ед/мл и 2 мМ соответственно).

В работе использовали энтеропептидазу, выделенную из слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки свиней и очищенную путем последовательных хроматографических процедур: на DEAE-целлюлозе, бензоамидин-агарозе и Butyl-Toyorearl; на финальной стадии очистки использовали гель-фильтрацию на сорбенте Toyorearl HW55. Удельная активность полученного препарата фермента составляла 330 ед/мг белка, или 12 ед/мл (за 1 ед энтеропептидазной активности принято количество фермента, способного продуцировать за 1 мин при рН 5.0 и 25°C 1.0 нмоль трипсина из трипсиногена). Препараты энтеропептидазы хранили при -20°C в 50 мМ Трис (рН 8.0), содержащем 0.5 М NaCl и 50%-ный глицерин.

Гидролиз предшественников безметиониновых IFN- α 2 энтеропептидазой проводили в течение 16 ч при температуре 7–11°C. Ферментативную реакцию останавливали, добавляя в реакционную смесь раствор мочевины до конечной концентрации 1 М.

Специфичность протеолиза интерферонов энтеропептидазой по сайту D₄K↓ определяли методом MALDI путем подсчета молекулярной массы белков с точностью до 1 Да.

Хроматографическое разделение белков. Полученный в результате ферментативной реакции продукт — безметиониновый IFN- α — очищали от исходного субстрата (негидролизованной формы белка), используя ионообменную хроматографию на карбоксиметил-сефарозе (КМ-сефароза; CM Sepharose Fast Flow, “GE Healthcare”, США). Разделение проводили в градиенте концентраций NaCl на колонке 0.5 см × 6.0 см. Буфер А: 50 мМ ацетат натрия (рН 4.5), 1 мМ ЭДТА; буфер Б: 50 мМ ацетат натрия (рН 5.5), 1 М NaCl, 1 мМ ЭДТА. Исследуемую пробу наносили на колонку при температуре не выше 16°C. Скорость нанесения 1 мл/мин. Хро-

матографию проводили на приборе АКТАpurifier “Amersham Biosciences” (Швеция).

Безметиониновый IFN, полученный из предшественника с шестью остатками гистидинов, выделяли, используя аффинную хроматографию на Ni-NTA-агарозе (“Qiagen”, Германия). Хроматографию проводили следующим образом: после реакции протеолиза рН реакционной смеси доводили до значения 8.0 (с помощью NaOH) и наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой, уравновешенной буфером (20 мМ Трис, рН 8.0, 0.2 М мочевины, 20 мМ NaCl, 0.1% Triton X-100). Безметиониновый IFN- α 2 выходил в свободном объеме, а оставшийся негидролизованным субстрат элюировали, используя градиент имидазола. Буфер А: 50 мМ фосфат натрия (рН 8.0), 10 мМ имидазол, 300 мМ NaCl; буфер Б: 50 мМ фосфат натрия (рН 8.0), 250 мМ имидазол, 300 мМ NaCl. Скорость нанесения 1 мл/мин. Фракции элюата анализировали в 12%-ном SDS-ПААГ.

Полученные препараты интерферонов концентрировали, используя высокоэффективную жидкостную хроматографию на колонке Vydac Protein & Peptide C₁₈ 218TP54 (размер 4.6 мм × 250 мм, зернение 5, размер пор 300 Å) фирмы “Grace” (США). Количество целевого белка оценивали, сравнивая площадь пика поглощения (при длине волны 280 нм) анализируемого образца с площадью пика стандартного образца IFN- α 2b (“Фармапарк”, Россия).

Определение активности интерферонов. Для оценки биологической активности интерферонов применяли стандартный метод определения цитопатогенного действия (ЦПД) вируса энцефаломиокардита мышей (EMCV) в культуре диплоидных клеток фибробластов легких эмбриона человека (ФЛЭЧ). Клетки предварительно выращивали в 96-луночных плоскостонных планшетах в среде DMEM с добавлением 10%-ной эмбриональной сыворотки телят, глутамина (0.3 мг/мл) и гентамицина (0.08 мг/мл) в CO₂-инкубаторе. Титрование интерферонов проводили в культуре клеток ФЛЭЧ (в 3-х параллелях), принимая за единицу активности интерферона (Ед/мл) такую его минимальную концентрацию (численно равную величине, обратной его максимальному разведению), при которой под действием 100 ЦПД₅₀ вируса сохраняется 50% клеток. В каждом эксперименте использован референс-препарат IFN- α 2 с активностью 8000 МЕ, полученный в НИИЭМ имени Н.Ф. Гамалеи и оттитрованный по стандартному образцу ОСО 42-28-90-93 П (предоставлен ГИСК имени Л.А. Тарасевича) для перевода полученного значения активности в международные единицы (МЕ) [14].

Материалы. В работе использованы реактивы фирм “Sigma” (США), “Merck” (Германия), “Acros Organics” (Бельгия), “Becton Dickinson” (США), а также “Химмед” (Россия). Рестриктазы, ДНК-полимераза Taq, T4 ДНК-лигаза, набор для экстрак-

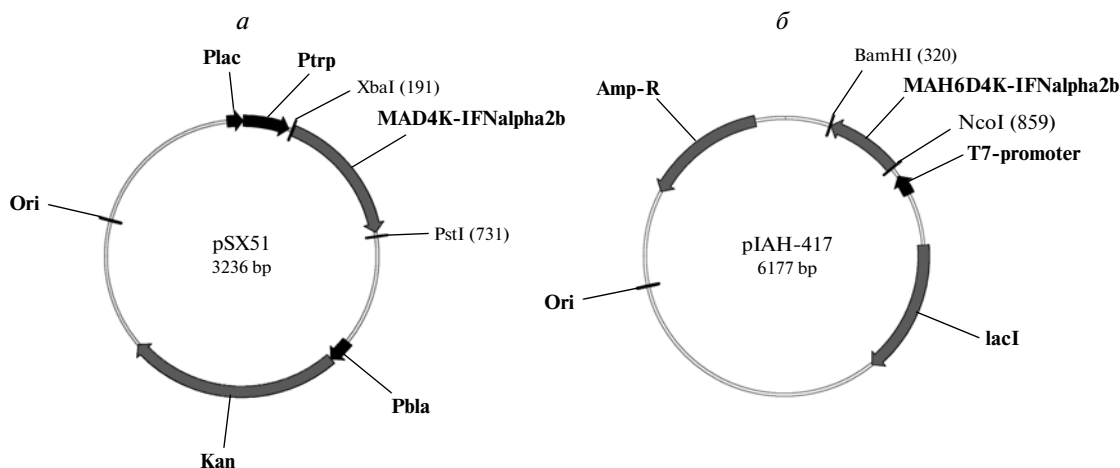


Рис. 1. Схемы плазмид, содержащих ген IFN- α 2b. а – Плазмида pSX51, содержащая ген MAD₄K-IFN- α 2b; б – плазмида pIAH-417, содержащая ген MAH₆D₄K-IFN- α 2b.

ции ДНК из геля и набор для выделения плазмидной ДНК получены от фирмы “Fermentas” (Литва).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование плазмид и экспрессия белков в *E. coli*

В процессе работы для экспрессии каждого из гибридных интерферонов: IFN- α 2a и IFN- α 2b – сконструировано по 2 типа плазмидных векторов. Один тип вектора содержал ген гибридного интерферона под контролем триптофанового и лактозного промоторов, другой тип – под контролем индуцибельного промотора поздних генов фага Т7 (в дальнейшем – промотор Т7) (рис. 1а,б). В последнем случае в гены гибридных интерферонов введены также последовательности, кодирующие шесть остатков His. В итоге получено четыре плазмиды с генами гибридных интерферонов со следующими вариациями N-концевых пептидов (аминокислотные последовательности приведены в однобуквенном коде): pSX51 (MAD₄K-IFN- α 2b), pSX61 (MAD₄K-IFN- α 2a), pIAH-417 (MAH₆D₄K-IFN- α 2b), pIAH-503 (MAH₆D₄K-IFN- α 2a) и 4 соответствующих штамма *E. coli*: BL21/pSX51, BL21/pSX61, BL21(DE3)/pIAH-417 и BL21(DE3)/pIAH-503. Выяснилось, что в клетках, содержащих плазмиды с двумя промоторами целевого гена, выход рекомбинантного белка выше, чем для плазмид с промотором Т7: 200 мг против 100 мг на 1 л культуры. Во всех полученных штаммах интерферон находился во фракции телец включения. Интересно, что, несмотря на то, что аминокислотные последовательности гибридных IFN- α 2 отличаются от нативной формы всего шестью или двенадцатью дополнительными аминокислотными остатками, различия в подвижности этих белков в 12%-ном ПААГ вполне достоверны (рис. 2а,б).

Из литературных источников известно, что глюкоза может полностью или частично блокировать промотор Т7 [14, 15], что подтверждено и нами. Так, штаммы BL21(DE3)/pIAH-417 и BL21(DE3)/pIAH-503 не продуцировали рекомбинантный белок в присутствии глюкозы. Проведен анализ пяти сахаров как потенциальных источников углерода при ферментации: крахмала, мальтозы, маннита, фруктозы и кукурузного экстракта. Наилучшие результаты по росту культуры получены в присутствии маннита или фруктозы. В дальнейшем при ферментации штаммов с индуцибельным промотором Т7 в качестве источника углерода использована фруктоза. В качестве индуктора при наращивании культуры в пробирках и колбах использован изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид, а при культивировании в ферментерах более дешевый реактив – лактоза.

Ренатурация белков, энтеропептидазная реакция и хроматографическая очистка

В процессе оптимизации условий ферментативного гидролиза гибридных IFN- α 2 выяснено, что протеолиз не происходит в условиях сохранения дисульфидных связей в молекуле интерферона. С нашей точки зрения, это обусловлено тем, что в образовании одного из дисульфидных мостиков IFN- α 2, а именно: Cys1-Cys98, – задействован остаток Cys в позиции 1. При сворачивании белка этот цистеин, а вместе с ним и N-конец IFN- α 2, может оказаться внутри белковой молекулы. В случае гибридных IFN- α 2 это ведет к экранированию сайта протеолиза энтеропептидазы – последовательности D₄K, расположенной на N-конце белка. По этой причине ренатурацию белков до обработки энтеропептидазой проводили в присутствии восстановителя (DTT). После обработки энтеропептидазой создавали условия, благоприятные для формирования дисульфидных связей в молекулах белка: реакцион-

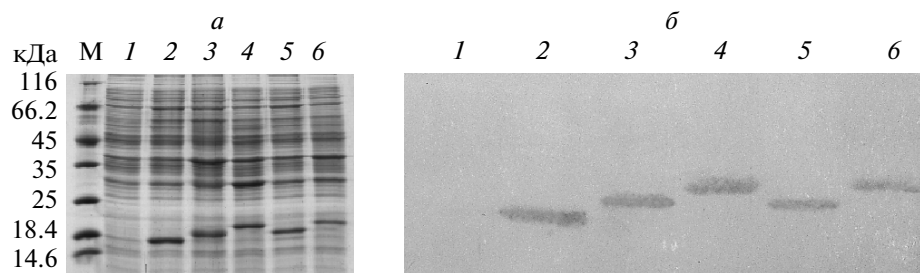


Рис. 2. Разделение и анализ белков в клеточных лизатах штаммов-продуцентов IFN- α 2. *a* – Электрофоретическое разделение в 12%-ном ПААГ фракций клеточных лизатов штаммов-продуцентов IFN- α 2. *б* – Вестерн-блот фракций клеточных лизатов штаммов-продуцентов IFN- α 2. М – маркеры молекулярного веса белков, 1 – *E. coli* BL21; 2 – *E. coli* BL21/pSX50; 3 – *E. coli* BL21/pSX51; 4 – *E. coli* BL21(DE3)/pIAH-417; 5 – *E. coli* BL21/pSX61; 6 – *E. coli* BL21(DE3)/pIAH-503.

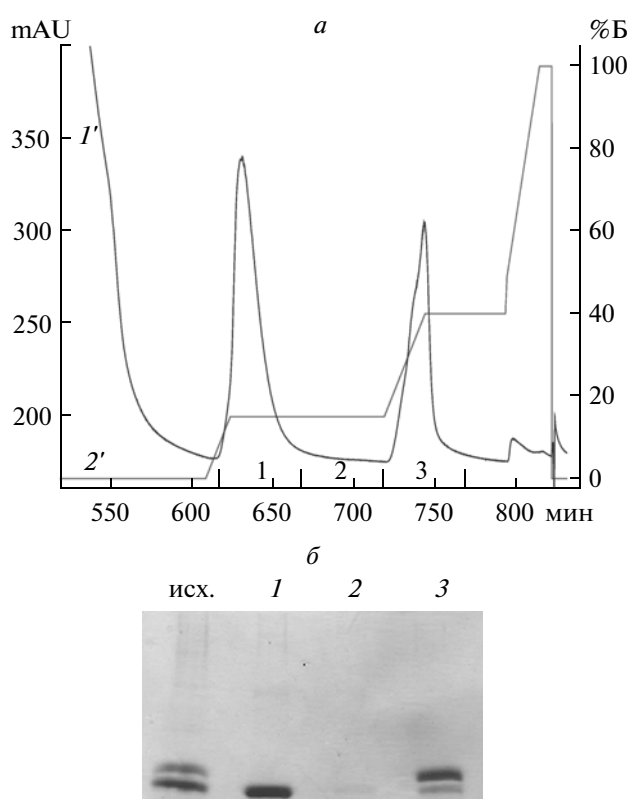


Рис. 3. Выделение и оценка чистоты препарата IFN- α 2b. *a* – Разделение безметионинового IFN- α 2b и негидролизованного предшественника методом ионообменной хроматографии на КМ-сефарозе. Линия 1' – профиль элюции белков, линия 2' – градиент концентрации NaCl (буфер А: 50 мМ ацетат натрия, рН 4.5, 1 мМ EDTA; буфер Б: 50 мМ ацетат натрия, рН 5.5, 1 М NaCl, 1 мМ EDTA). По оси ординат слева указана оптическая плотность (в тысячных долях единиц поглощения при длине волны 280 нм), справа приведена шкала концентрации буфера Б. *б* – Электрофоретический анализ фракций, полученных в результате ионообменной хроматографии на КМ-сефарозе. Номера соответствуют номерам фракций на рис. 3*a*; исх. – нанесенный на колонку исходный образец.

ную смесь, рН которой доводили до 8.0, инкубировали с цистином в течение 18 ч при 7°C.

Нами изучено влияние компонентов ренатурирующего буфера на активность энтеропептидазы. Выяснилось, что, во-первых, сильное ингибирующее влияние на энтеропептидазу оказывают денатурирующие агенты: гуанидингидрохлорид и моче-

вина. Конечная концентрация гуанидина-НСl в ренатурирующем буфере не должна превышать 0.06 М, при более высоких концентрациях активность фермента резко падает. Оптимальная концентрация мочевины составляет 0.2 М.

Во-вторых, на активность энтеропептидазы отрицательно влияет наличие DTT, но это негативное

действие можно компенсировать снижением рН реакционной смеси до 5.0. Влияние остальных компонентов ренатурирующего буфера оказалось незначительным.

В целом, понижение рН реакционной среды позитивно влияет на эффективность энтеропептидазной реакции: через 4 ч при рН 5.0 наблюдается 90%-ный гидролиз предшественника IFN- α , в то время как при рН 8.0 такой выход достигается только через 10 ч. Следует учитывать, что приведенные результаты получены для холофермента энтеропептидазы свиньи, который использован нами в приведенных экспериментах. При использовании рекомбинантных легких цепей энтеропептидазы (в частности, энтеропептидазы быка) оптимум рН может быть смещен в щелочную зону (рН 7–8) (собственные неопубликованные данные).

При разделении безметиониновых IFN- α 2 и негидролизованых исходных белков нами использована катионообменная хроматография на КМ-сефарозе. Заметим, что в подобранных условиях энтеропептидаза выходит в свободном объеме, не задерживаясь на сорбенте. Элюцию интерферонов проводили в градиенте концентраций NaCl. В условиях линейного градиента буфера Б безметиониновый интерферон начинает элюироваться при 8% буфера Б, а негидролизованная форма – при 18% буфера Б. На рис. 3а представлена хроматограмма, полученная при разделении на КМ-сефарозе безметионинового IFN- α 2b (элюируется при 15% буфера Б) и его предшественника МАН₆Д₄К-IFN- α 2b (элюируется при 40% буфера Б) – для наглядности на колонку нанесен препарат, содержащий все компоненты энтеропептидазной реакции, выход которой составил 60% (по IFN- α 2b).

Предшественники IFN- α 2, полученные из штаммов *E. coli* BL21(DE3)/pIAH-417 и BL21(DE3)/pIAH-503, имеют на N-конце 6 остатков His, а полученные из них продукты энтеропептидазной обработки (безметиониновые IFN- α 2) уже не содержат His₆-тэга, поэтому для разделения продукта и субстрата успешно использована Ni-NTA-агароза.

В будущем, в случае применения разработанной нами методологии для получения высокоочищенных препаратов IFN- α 2 (лекарственных форм), стоит подумать о последовательном использовании обеих хроматографических систем.

Оценка биологической активности полученных безметиониновых IFN- α 2 проведена по стандартной методике ингибирования цитопатогенного действия EMCV в клетках ФЛЭЧ. Показано, что уровень активности безметиониновых IFN- α 2a и IFN- α 2b различается: удельная активность IFN- α 2a составляет 0.8×10^7 МЕ/мг, в то время как удельная активность IFN- α 2b в 20 раз выше и равна 16×10^7 МЕ/мг.

Таким образом, нами создано по 2 штамма-производителя каждого из двух интерферонов: IFN- α 2a и IFN- α 2b. Каждый из полученных нами штаммов

обладает своими преимуществами. Так, штаммы BL21/pSX51 и BL21/pSX61 обеспечивают высокий уровень экспрессии рекомбинантного белка (200 мг на 1 л культуры), а штаммы BL21DE3/pIAH417 и BL21DE3/pIAH503 хороши тем, что экспрессируемый в них белок можно эффективно отделить от негидролизованного предшественника на Ni-NTA-агарозе. Показано, что по удельной активности безметиониновый IFN- α 2b существенно превосходит безметиониновый IFN- α 2a.

Работа поддержана ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы” (Госконтракт №02.531.11.9003).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. 2000. *Иммунология*. М.: Медицина, С. 193–195.
2. Pestka S., Krause C.D., Walter M.R. 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors *Immunol. Rev.* **202**, 8–32.
3. Masci P., Bukowski R.M., Patten P.A., Osborn B.L., Borden E.C. 2003. New and modified interferon alphas: preclinical and clinical data. *Curr. Oncol. Rep.* **5**, 108–113.
4. Baron E., Narula S. 1990. From cloning to a commercial realization: human alpha interferon. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10**, 179–190.
5. Meinnel T., Mechulam Y., Blanquet S. 1993. Methionine as translation start signal: a review of the enzymes of the pathway in *Escherichia coli*. *Biochimie.* **75**, 1061–1075.
6. Михайлова А.Г., Шибанова Е.Д., Румш Л.Д., Антонов В.К. 1994. Энтеропептидаза и ее применение для расщепления химерных белков. *Биоорганическая химия.* **20**, 883–893.
7. Mann N.S., Mann S.K. 1994. Enterokinase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **206**, 114–118.
8. Li M., Huang D. 2007. Purification and characterization of prokaryotically expressed human interferon- λ 2. *Biotechnol. Lett.* **29**, 1025–1029.
9. Семихин А.С., Ляшук А.М., Мезенцева М.В., Трегуובה М.И., Сергиенко О.В., Полетаева Н.Н., Народицкий Б.С., Карягина А.С., Лунин В.Г., Гинцбург А.Л. 2009. Получение рекомбинантного интерферона- β человека на основе технологии аффинных доменов. *Молекуляр. генетика, микробиол. вирусол.* **4**, 38–41.
10. Могутов М.А., Яроцкий С.В., Скрыпин В.И., Яковенко А.Р., Чежгалова Н.А., Селищев С.В. 2006. Раствор для инъекций, рекомбинантная плазмидная ДНК рSX50, кодирующая синтез рекомбинантного человеческого альфа-2b интерферона, штамм *Escherichia coli* SX50 – промышленный штамм-производитель рекомбинантного человеческого альфа-2b интерферона и способ промышленного получения интерферона альфа-2b. Патент Российской Федерации RU 2319502C1.
11. Шехтер И.И., Вейко В.П., Буленков М.Т., Ратманова К.И., Дебабов В.Г. 1991. Сайт-направ-

- ленный мутагенез в урацил-репарационной системе. Получение мутантных форм интерферона $\alpha 2$ человека. *Молекуляр. биология.* **25**, 153–161.
12. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
13. Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685.
14. Ершов Ф.И., Тазулахова Э.Б., Наровлянский А.Н., Григорян С.С., Мезенцева М.В., Щербенко В.Э. 2005. Методические указания по изучению специфической активности индукторов интерферона. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению фармакологических веществ*. Ред. Хабриев Р.У. М.: Медицина, с. 558–571.
15. Pan S.H., Malcolm B.A. 2000. Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3). *BioTechniques.* **29**, 1234–1238.
16. Grossman T.H., Kawasaki E.S., Punreddy S.R., Osburne M.S. 1998. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene.* **209**, 95–103.