

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПІДХОДІВ ДО ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ЦИТОКІНІВ ЛЮДИНИ У БАКТЕРІАЛЬНИХ СИСТЕМАХ ЕКСПРЕСІЇ

Т.О. Наточій, В.В. Мотроненко*

КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

*Corresponding author: motronenkovalya@gmail.com

Received 12 June 2019; Accepted 13 August 2019

Проблематика. Цитокіни забезпечують зв'язок між клітинами і відіграють важливу роль у модуляції вродженої та адаптивної імунної відповіді. Будучи медіаторами, вони активні в дуже невеликих кількостях і впливають на безліч біологічних процесів: ембріональний розвиток, неспецифічну та специфічну імунну відповідь, зміни когнітивних функцій тощо. Для отримання препаратів цитокінів зазвичай використовують рекомбінантні мікроорганізми. Перспективи терапевтичного застосування рекомбінантних цитокінів обумовлюють актуальність створення нових і вдосконалення існуючих технологій їх біосинтезу, виділення та очистки.

Мета. Аналіз і порівняння біотехнологічних підходів до отримання рекомбінантних цитокінів людини, на основі сучасних літературних даних, та визначення перспективних шляхів підвищення ефективності технологій їх одержання.

Методика реалізації. Аналіз і систематизація сучасних наукових праць, присвячених виробництву рекомбінантних цитокінів, із визначенням особливостей перебігу процесу їх біосинтезу та порівняльна характеристика різних продуцентів.

Результати. Найчастіше для отримання рекомбінантних цитокінів використовують системи експресії на основі бактерій *Escherichia coli*, оскільки вони найкраще досліджені, дають можливість забезпечити високий вихід цільового продукту. Їх біосинтез зазвичай здійснюється способом періодичної ферментації з підживленням, а до складу живильного середовища можна додавати стимулятори біосинтезу різного походження. Бактерійні продуценти мають низку недоліків: накопичення цільового білка найчастіше відбувається у формі тілець-включень і актуальним залишається питання контамінації таких препаратів бактеріальними ендотоксинами. Для невілювання цих недоліків вдаються до оптимізації процедур виділення та очистки рекомбінантних білків.

Висновки. Одним із перспективних напрямів сучасних досліджень з виробництва рекомбінантних цитокінів є різноманітні технології отримання цільового білка в розчинному вигляді. Проте складність цієї задачі полягає у відсутності можливості створення універсального методу і в необхідності індивідуального підходу залежно від продуцента і кінцевого продукту. Також перспективними є дослідження зі збільшення виходу цільового білка завдяки зміні умов культивування та складу живильного середовища, усуненню зараження його ендотоксинами та пошуку альтернативних бактеріальних систем експресії.

Ключові слова: цитокіни; бактеріальні продуценти; бактеріальні системи експресії; рекомбінантні білки; біосинтез.

Вступ

Цитокіни являють собою низькомолекулярні білки, або глікопротеїни, що секретуються багатьма різними типами клітин. Як сигнальні молекули цитокіни забезпечують зв'язок між клітинами і відіграють вирішальну роль у модуляції вродженої та адаптивної імунної відповіді. Вони є розчинними медіаторами, які активні в дуже невеликих кількостях і впливають майже на кожен біологічний процес: ембріональний розвиток, патогенез захворювання, неспецифічну відповідь на інфекцію, специфіч-

ну відповідь на антигени та зміни когнітивних функцій [1–6].

Сімейство цитокінів включає інтерферони (IFN) (мультигенне сімейство індукційних цитокінів з протівірусною, антипроліферативною та імуномодулювальною функціями; описується як ключовий компонент вродженої імунної відповіді та перша лінія захисту від вірусних інфекцій; впливають на процеси проліферації, диференціювання і апоптозу та, залежно від типу рецепторного комплексу, поділяються на три класи: тип I (IFN- α , IFN- β), тип II (IFN- γ) і тип III) [2, 3], інтерлейкіни (IL) (ві-

домо більше 40 інтерлейкінів із різними властивостями, які класифікуються на підставі гомології послідовностей, властивостей рецепторів, біологічної функції та походження) [1], хемокіни (сімейство білків, які спрямовують рух імунних клітин під час нормальної імунної функції і беруть участь у багатьох хворобливих станах) [6], сімейство факторів некрозу пухлин (TNF) (вважаються основними медіаторами запальної відповіді) [2], колоніестимулювальні фактори (CSF) (цитокіни, які регулюють проліферацію та диференціацію гемопоетичних клітин в організмі людини; розрізняють гранулоцитарні колоніестимулювальні фактори (G-CSF) і гранулоцитарно-макрофагальні колоніестимулювальні фактори (GM-CSF), які відповідно стимулюють утворення гранулоцитів та гранулоцитів і макрофагів із клітин-попередників) [4, 5], та інші.

Багато досліджень були зосереджені на цитокінах, які модулюють ріст і функціонування клітин імунної системи. Для промислового виробництва їх рекомбінантних аналогів використовуються різноманітні мікроорганізми та технологічні схеми виділення й очистки цільового продукту. Перспективи терапевтичного застосування рекомбінантних цитокінів обумовлюють актуальність вдосконалення і оптимізації всіх етапів їх виробництва.

Метою роботи були аналіз і порівняння біотехнологічних підходів отримання різноманітних рекомбінантних цитокінів людини, на основі сучасних існуючих літературних даних, та визначення перспективних можливих шляхів підвищення ефективності технологій їх одержання.

Використання *E. coli* для отримання рекомбінантних цитокінів

Незважаючи на те що в останні десятиліття було розроблено чимало систем експресії, для виробництва рекомбінантних продуктів дуже часто використовують саме *Escherichia coli*. Гетерологічні білки в клітинах *E. coli* можуть синтезуватись у кількостях від 5 до 50 % від загального вмісту білків [7]. У зв'язку з широким використанням *E. coli* існує багато молекулярних інструментів і протоколів для досягнення високого рівня експресії гетерологічних білків, таких як каталоги плазмід та велика кількість сконструйованих штамів і стратегій культивування.

До основних переваг *E. coli* належать: швидкий ріст і розмноження (подвоєння хро-

мосоми займає приблизно 40 хв, а в сприятливих умовах – 20 хв); генетична, біохімічна й фізіологічна вивченість; досить високий вихід цільового продукту (100–2000 мг/л); ріст на дешевих живильних середовищах та, як наслідок, низька собівартість кінцевого продукту; простота умов культивування; можливість зміни багатьох параметрів з метою оптимізації експресії; здатність досягати високої густини культури – теоретична межа становить 200 г/л (у перерахунку на суху біомасу), або $1 \cdot 10^{13}$ життєздатних бактерій на 1 мл [8–10].

Як правило, для експресії рекомбінантних білків використовуються штами *E. coli* B і K12. Штами *E. coli* Rosetta (BLR (DE3)) і BL21 (DE3), які мають велику кількість рідкісних кодонів, унаслідок наявності яких можуть виникнути трансляційні помилки при синтезі білків [7, 8]. На прикладі синтезу IL-6 було досліджено штами Origami 2, що походить від K12, і BL21. Було встановлено, що і розчинний білок, і білок, який утворюється у вигляді тілець-включень, у більшій кількості синтезуються штамом BL21. Застосування штаму Origami 2 не сприяло підвищенню розчинності та біологічної активності IL-6. Крім того, штам BL21 мав значно вищі темпи росту, а Origami 2 потребував у два-три рази більше часу, щоб досягти необхідної для індукції густини. На ріст похідних K12, таких як Origami 2, негативно впливає накопичення ацетату під час культивування. Штами B більш ефективні в утилізації глюкози. Також перевагами BL21 є дефіцит двох основних цитоплазматичних протеаз та більша стійкість до стресу, що виникає у відповідь на високі швидкості синтезу чужорідного білка [11].

E. coli BL21 (DE3) – добре вивчений штам, що використовується для отримання рекомбінантних продуктів. До особливостей, що роблять його придатним для ролі промислового продуцента, належать: швидкий ріст клітин на мінімальних середовищах, низька кількість протеаз, здатність досягати високої густини культури, низький вміст ацетату при вирощуванні за високого вмісту глюкози, що запобігає підкисленню культури і підвищує ефективність використання глюкози для накопичення біомаси [10, 12]. Штам *E. coli* BL21 (DE3) має специфічний фермент – РНК-полімераза фага T7. Також цей штам характеризується дефіцитом протеази *lon*, яка розпізнає та руйнує неправильно згорнуті або агреговані білки, та протеази *ompT*, яка роз-

щеплює чужорідні білки при їх потраплянні в клітину [14].

Варіантом виробництва цитокнів є використання відкритих безклітинних систем синтезу (OCFS) на основі *E. coli*. Безклітинні системи синтезу білка мають деякі переваги порівняно з традиційними методами отримання білка *in vivo*. Відсутність необхідності підтримувати життєздатність клітин дає змогу оптимізувати систему для виробництва одного білка. Відсутність клітинної стінки дає можливість додавати неприродні фактори у відкриту систему, щоб маніпулювати транскрипцією, трансляцією і згортанням для забезпечення точної модуляції процесу експресії; відсутність стадії лізису клітин забезпечує швидку і послідовну оптимізацію очищення білка. До факторів, що обмежують використання OCFS, налягають коротка тривалість і низька швидкість реакції активного синтезу білка, витрати на дорогі реагенти, обмежена здатність правильно скласти білки, що містять множинні дисульфідні зв'язки. Глікозильовані терапевтичні білки на сьогодні не входять до сфери застосування OCFS. Проте останні технічні досягнення дали змогу покращити системи OCFS для задоволення зростаючих потреб у синтезі білка. Нещодавно було продемонстровано економічно ефективний безклітинний синтез білка: при використанні оптимізованої системи OCFS вдавалося отримувати до 700 мг/л GM-CSF протягом 10 год у об'ємі до 100 л [14]. Хоча безклітинний синтез білка має певні переваги, ця система все ще не достатньо підходить для великомасштабного виробництва [3].

Стратегії подолання основних недоліків системи експресії на основі *E. coli*. Експресія еукаріотичних білків у системах на основі *E. coli* розглядається як швидкий та економічно ефективний метод для великомасштабного виробництва рекомбінантних білків.

Однак недоліками прокаріотичних систем є відсутність посттрансляційних модифікацій у поєднанні з наявністю ендотоксинів грамнегативних бактерій [15, 16]. Крім того, надекспресія гетерологічних білків часто призводить до утворення нерозчинних тілець-включень, що відбувається за рахунок конкуренції між процесами складання і агрегації, викликаної більш високими темпами синтезу білків та недостатнім вмістом шаперонів для підтримки правильного згортання білків [17]. Як правило, тілець-включення утворюються, коли рівень експресії білка перевищує 2% від загальної

кількості клітинних білків [16]. В умовах масштабного виробництва накопичення білка у нерозчинній формі має переваги як у плані можливості отримання більш високого виходу продукту, так і з точки зору зручності роботи з нею і зберігання, але тривають дослідження в напрямі одночасного підвищення розчинності білка і збереження високого виходу [18].

Існує низка способів, завдяки яким можливо подолати деякі недоліки *E. coli*. Для уникнення утворення тілець-включень використовуються такі стратегії, як зниження температури культивування, коекспресія шаперонів, використання слабких або помірних промоторів, використання сигнальних послідовностей для експорту білка. Кожна з них частково покращує розчинність білка [19].

Правильне (природне) формування дисульфідних зв'язків є основною посттрансляційною модифікацією, яка забезпечує правильне укладання білка. Формування дисульфідних зв'язків потребує окисно-відновного середовища, виявленого в периплазмі *E. coli*, та ферментів, що полегшують їх утворення, таких як дисульфід-ізомераза (білки Dsb) та пептидил-пропіл-ізомераза (PPIase).

Один зі способів одержання правильних дисульфідних зв'язків у білках *E. coli* включає орієнтацію гетерологічних білків до периплазми додаванням сигнального пептиду до N-кінця рекомбінантного білка. Це дає змогу полегшити обробку, оскільки периплазма містить менше ендогенних білків, ніж цитоплазма, включаючи протеази [20, 21]. Для збільшення розчинності білка до N-кінця можуть приєднувати такі мітки, як тіоредоксин (Trx), мальтозозв'язувальний білок (MBP), убіквітин-подібний модифікатор (SUMO), N-утилізуюча речовина (NusA) [20]. Спільним позитивним ефектом об'єднання будь-якого з них із цільовим білком є певне підвищення ступеня захисту від протеолітичної деградації та можливість підвищення розчинності, при цьому кожен із них вносить у гібридний білок індивідуальні особливості. Крім того, утворення гібридного попередника також дає змогу вирішити проблему наявності N-кінцевого метіоніну в молекулі білка, що заважає його правильному укладанню і робить продукт імуногенним.

Найбільш зручною технологією для видалення N-кінцевого метіоніну є SUMO-технологія, суть якої полягає в тому, що спочатку в бактеріальній клітині експресується SUMO-попередник, який складається з молекули

цільового білка і дріжджового білка SUMO-1. Далі отриманий білок-попередник піддається ренатурації та розщепленню специфічною до SUMO1 ULP-протеїназою, сайт розщеплення якої міститься в самій молекулі [22]. Відомим є гібридний білок 10His-SUMO-IFN α 2b, де SUMO комбінується з His-тагом, що вводиться для очистки гібридного білка за допомогою металохелатної хроматографії [18].

До біотехнологічних підходів, що забезпечують позаклітинне накопичення цільового продукту, відносяться системи з використанням так званих секреторних векторів на основі бактеріофагів. Описані приклади успішного використання фагів λ і T4 для отримання інтерферону. Бактеріофаг заражає бактеріальну клітину, розмножується в ній, багаторазово копіюючи свою ДНК і вбудований у неї ген інтерферону. На певній стадії розвитку бактеріофаг лізує клітину, інтерферон виходить у культуральну рідину у водорозчинній формі, не утворюючи тілець-включень. Проте при генно-інженерному конструюванні векторів, що забезпечують ефективну експресію цільового гена, маніпулювати з плазмідами набагато легше, ніж з фагами. Тому дослідники віддають перевагу створенню векторів експресії на основі мультікопійних плазмід, а літичну здатність бактеріофагів використовують лише для руйнування клітин [23].

Було досліджено можливість вирішення проблеми формування тілець-включень і покращення експресії hIL-7 у *E. coli* у розчинній формі через оптимізацію кодонів та блокування N-кінця з використанням різних тегів злиття і лідерної послідовності пектатліази pelB. Крім того, вихід продукту вдалося підвищити завдяки оптимізації умов культивування при періодичній ферментації з підживленням. Використання послідовності pelB призводило до утворення тілець-включень і нижчого рівня експресії. Використання стратегії оптимізації кодонів дало змогу підвищити експресію до 80 ± 5 мг/л при культивуванні в лабораторних масштабах.

Злиття N-кінця з убіквітин-подібним модифікатором SUMO, тіоредоксином (Trx) та NusA-тегом збільшувало експресію до 90–140 мг/л, при цьому більше 90 % злитих білків було отримано у розчинній формі. При цьому найвищий вихід спостерігався при використанні конструкції SUMO-hIL-7.

Періодична ферментація з підживленням для експресії hIL-7 із SUMO-міткою була оп-

тимізована на рівні біореактора, де висока об'ємна концентрація продукту – 2,65 г/л – була досягнута завдяки контролю нестабільності плазмиди з використанням високої концентрації антибіотика. Питомий вихід продукту та об'ємна концентрація були в 1,38 та 2,55 рази вищі порівняно з результатами, що досягались при культивуванні без підживлення, відповідно [19].

Також були здійснені спроби підвищити розчинність схильного до агрегації IL-6 через злиття з MBP і NusA. Однак видалення мітки включає кілька етапів протеолітичного розщеплення і хроматографії та є трудомістким. Крім того, загальний вихід білка був різко знижений, оскільки вдалося виділити лише десяту частину IL-6. Експресія злитого з глутатіон-S-трансферазою (GST) білка також не дала позитивних результатів. Найбільш ефективною стратегією підвищення розчинності IL-6 була коекспресія шаперонів [11].

Спроби отримання рекомбінантного фактору стовбурових клітин людини (rhSCF) у розчинній формі коекспресією з тіоредоксином показали, що розчинність білка зростає, але рівень експресії знижується. Тому було розроблено нову систему експресії без тіоредоксину, в якій для згортання hSCF у цитоплазмі використовувались персульфіди – глутатіон персульфід або цистеїн персульфід, які покращували розчинність за рахунок прискорення реакцій дисульфідного обміну. Крім того, персульфіди підвищували рівень експресії, ймовірно, через активізацію ферментативної активності РНК-полімерази T7 [24].

Також суттєвим недоліком *E. coli* є можливість забруднення продукту пірогенними компонентами, що є проблемою для клінічного використання [19]. Зовнішня мембрана *E. coli* містить імуностимулювальні молекули ліпополісахариду (LPS), яких на одну клітину припадає близько 2×10^6 молекул, що становить 30 % від загальної маси зовнішньої мембрани [26]. Видалення ендотоксину і тестування з метою демонстрації того, що його рівні нижче мінімального порога, вимагають зусиль і збільшують витрати на розробку і виробництво [26]. Існує низка способів видалення ендотоксинів, проте кожен із них має певні недоліки, основна характеристика яких наведена в табл. 1 [25].

Використання описаних стратегій часто призводить до зниження виходу продукту, збільшення вартості або втрати біологічної активності бажаного білка [25]. Комерційно

Таблиця 1: Недоліки та обмеження способів видалення бактерійних ендотоксинів [25]

Спосіб видалення ендотоксинів	Недоліки
Ультрафільтрація	<ul style="list-style-type: none"> • Підходить тільки для білків з <i>невеликою молекулярною масою</i>. • Ендотоксинові мономери можуть проникати крізь мембрану внаслідок взаємодії з <i>цільовим</i> білком. • Неефективний для білків, які механічно пошкоджуються в процесі культивування
Активоване вугілля	<ul style="list-style-type: none"> • Адсорбує не лише ендотоксин, а й <i>цільовий білок</i>
Сурфактанти	<ul style="list-style-type: none"> • Висока вартість. • Можливий вплив на активність білка. • Складність видалення реагенту. • Видалення може призвести до <i>зниження виходу продукту</i>
Іонообмінна хроматографія	<ul style="list-style-type: none"> • Можлива адсорбція як ендотоксину, так і <i>цільового білка</i>. • Низька селективність до ендотоксину
Сефароза, іммобілізована гістаміном та гістидином	<ul style="list-style-type: none"> • Ступінь вилучення залежить від іонної сили. • Біологічна активність гістаміну
Поліміксин В-іммобілізована сефароза	<ul style="list-style-type: none"> • Втрати <i>цільового білка</i> внаслідок іонної взаємодії між поліміксином В і білком. • Поліміксин В є фізіологічно активним

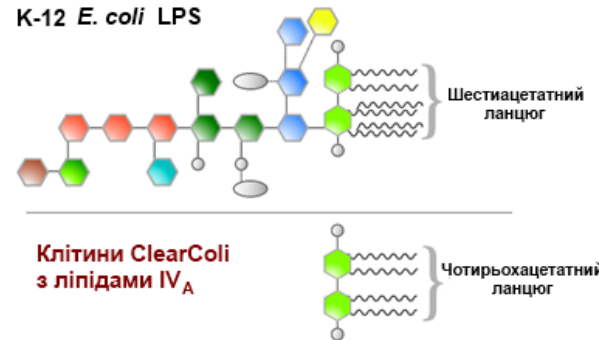
доступні рекомбінантні білки, отримані з *E. coli*, можуть містити залишковий ендотоксин у низьких, але все ж достатніх для активації імунних клітин людини кількостях.

Для вирішення цієї проблеми Lucigen і Research Corporation Technologies розробили нову лінію компетентних клітин *E. coli* під назвою ClearColi. Ці клітини були генетично модифіковані для видалення тригерів імунної відповіді, пов'язаних з LPS, що є технічно більш ефективним способом для отримання рекомбінантних білків, які не містять ендотоксинів [Mamat2013]. Модифікація синтезу LPS була досягнута завдяки внесенню семи генетичних делецій, які запобігають модифікації ліпиду IV_A (неглікозильований попередник синтезу LPS) ферментами (рис. 1, 2), у той час як компенсуючі мутації дають клітинам *E. coli* K-12 і BL21 (DE3) змогу підтримувати життєздатність [25, 26].

Клітини ClearColiBL21 (DE3) продукують білок на рівнях, аналогічних тим, що отримуються з такої ж кількості звичайних клітин BL21 (DE3). Очищені білки були протестовані на рівні ендотоксину за допомогою LAL-тесту і на стимуляцію імунної відповіді. Просте очищення на Ni-колонці знижує рівні LAL-відгуку на 95% і більше (рис. 2). Рівні залишкового ендотоксину, ймовірно, пов'язані з неспецифічною природою аналізу LAL, який реагує і на структури, що не є імуногенними. Навіть за наявності рівнів ендотоксину вище порогових значень, на які зазвичай націлені дослідження, фактичні імуногенні ефекти від білків, отриманих з ClearColi, відсутні [25].

Порівняння структури LPS з ліпідами IV_A

K-12 *E. coli* LPS

Рисунок 1: Порівняльна структура нормальних ліпопідсахаридів K-12 *E. coli* з ліпідами IV_A клітин ClearColi [25]

Порівняння стимулюючої активності після очищення: ClearColi та BL21(DE3)

Eu/мг білка

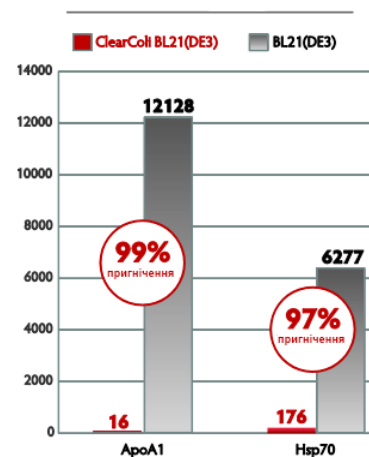


Рисунок 2: Порівняння відповіді LAL-тесту для білка, отриманого з клітин BL21 (DE3) і клітин ClearColi BL21 (DE3) після очищення на Ni-колонці без етапів видалення ендотоксину [25]

Розробка штамів *E. coli* без ендотоксинів сприятиме впровадженню рентабельного та універсального виробництва терапевтичних білків із вищим рівнем біобезпеки і зниженням виробничих витрат [27]. Це є актуальним при виробництві цитокінів, оскільки було доведено, що на імунні клітини, зокрема на дендритні клітини CD1c+, впливають навіть мінімальні кількості LPS у діапазоні від 0,002 до 2 нг/мл, що еквівалентні рівням забруднення ендотоксинами, які виявляються в комерційних рекомбінантних цитокінах. Також було протестовано вплив п'яти комерційних рекомбінантних цитокінів людини, отриманих від трьох різних виробників. Наявної в них кількості ендотоксинів було достатньо для активації різних імунних клітин, тому для підвищення безпеки препаратів цитокінів доцільно було б використовувати штами ClearColi [28].

Система ClearColi® BL21 (DE3) була випробувана для виробництва rhSCF. Перед цим було досліджено використання *E. coli* BL21 (DE3) для отримання злитого білка з міткою Profinity eXact, що забезпечує просту очистку. Було виявлено, що наявність ендотоксинів погіршує очистку за рахунок перешкоджання зв'язуванню зі смолою, яке спричиняється маскуванням позитивно заряджених груп білка негативними ендотоксинами, тому їх видалення є вирішальним етапом для досягнення належного ступеня чистоти. У зв'язку з цим доцільним було використання ClearColi. Було підтверджено, що характеристики зв'язування rhSCF, отриманого з ClearColi, були значно покращені. Однак у крупномасштабній культурі зв'язуванню перешкоджали негативно заряджені молекули нуклеїнових кислот, але цю проблему вдалось вирішити завдяки додаванню 0,5 М L-аргініну [24].

Отримання цитокінів культивуванням *E. coli*

Процес ферментації у виробництві цитокінів включає дві стадії: отримання інокуляту та індукцію синтезу цільового білка. Середовище для вирощування *E. coli* повинно містити іони Na⁺, K⁺, Mg⁺, NH₄⁺, Cl⁻, HPO₄²⁻, SO₄²⁻, мікроелементи і джерело вуглецю. Для культивування *E. coli* можуть бути використані середовища: Luria-Bertani (LB) (1% триптон, 0,5% дріжджового екстракту, 1% NaCl); 2YT (1,7% бактотриптон, 1% дріжджового екстракту, 0,5% MgSO₄); SOC (2% бактотриптон,

0,55% дріжджового екстракту, 1% NaCl, 0,25% KCl). До складу стандартного середовища додають джерело вуглецю і відповідний антибіотик для селекції трансформованого штаму [29].

Два найбільш поширених джерела вуглецю для промислового культивування *E. coli* – це глюкоза і гліцерин, проте найчастіше використовується саме глюкоза. Вона має деякі недоліки, наприклад, в умовах обмеженого вмісту кисню піддається ферментації з утворенням ацетату, лактату, формиату, сукцинату, етанолу і водню в різних кількостях, що призводить до підкислення культури і зниження ефективності процесу. Також глюкоза може реагувати з аміногрупами в реакціях Майяра і повинна автоклауватися окремо від живильного середовища. Гліцерин не так легко перетворюється в ацетат і тому може бути використаний у більш високих концентраціях, що забезпечує триваліший період росту, також він не вступає у реакції Майяра. Однак гліцерин дорожчий, ніж глюкоза, і темпи росту, як правило, нижчі [12].

Використання складних середовищ при культивуванні з високою густиною клітин призводить до початку експресії без індукції, що викликає погіршення стану клітин. Необмежена доступність поживних речовин і експоненціальний ріст у системах періодичного типу призводять до утворення побічних метаболітів і підкислення культур. Дезамінування амінокислотних субстратів, яке відбувається при використанні пептонів або дріжджового екстракту, може викликати підвищення рН унаслідок виділення в середовище аміаку [30]. Використання мінімальних середовищ дає змогу вирішити ці проблеми і досягти вищого рівня синтезу [19].

Режими культивування. У промислових умовах для культивування *E. coli* можуть бути використані два режими: періодичне культивування та періодичне культивування з підживленням.

Періодична ферментація є найпростішою доступною технікою культивування і являє собою одностадійний процес, при якому живильне середовище та посівний матеріал вносяться одноразово. Максимальна кількість біомаси, яка може бути отримана, обмежена. Періодичну ферментацію в більшості випадків здійснюють при 37 °C; рН 6,8 підтримується додаванням 28% аміаку або 50% розчину ортофосфорної кислоти; концентрацію розчиненого кисню на рівні 40% підтримують регулюванням швидкості перемішування; для контролю піноутворення додають піногасник.

У процесі періодичного культивуванні з підживленням після виснаження вихідного середовища додають концентровані поживні речовини, в першу чергу – джерело вуглецю, але можуть бути й інші компоненти живлення [12]. При періодичній ферментації з підживленням підтримують параметри на аналогічному рівні зі звичайною періодичною ферментацією; при цьому здійснюють експоненціальне підживлення культури, підтримуючи питому швидкість росту до індукції на рівні $0,3 \text{ год}^{-1}$. Розчин для підживлення містить 50 %-ний розчин глюкози з додаванням $20 \text{ г/л MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, слідові кількості металів, індуктор синтезу. Концентрацію глюкози після індукції підтримують на рівні $1\text{--}5 \text{ г/л}$ [19].

Обидва режими були досліджені при виробництві hEGF. При цьому було випробувано кілька варіантів режимів. Вихідне середовище для культивування *E. coli* містило 2 г/л глюкози; кожного разу, коли її рівень падав нижче $0,5 \text{ г/л}$, додавали розчин підживлення, що містить 200 г/л глюкози і $20 \text{ г/л MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. В іншому способі регулювання подачі підживлення здійснювали залежно від показника рН, який змінюється при вичерпанні джерела вуглецю – швидкість подачі розчину глюкози регулювали таким чином, щоб рН підтримувався приблизно на рівні $6,8$. Використання цих двох режимів, порівняно зі звичайною періодичною ферментацією, сприяло підвищенню виходу продукту на $25,5$ та $28,1 \%$ відповідно [19].

Третій режим передбачав постійну автоматичну подачу розчину підживлення із заданою швидкістю. Було продемонстровано, що, порівняно з переривчастим або рН-статним підживленням, постійна подача глюкози була більш ефективною для посилення експресії hEGF і стабільності плазмиди, а висока продуктивність hEGF ($69,4 \text{ мг/мл}$) була досягнута постійним додаванням розчину глюкози з концентрацією 200 г/л зі швидкістю $0,11 \text{ мкл/хв}$. Це дослідження показало, що продуктивність виробництва позаклітинного hEGF і стабільність плазмиди можуть бути значно покращені за рахунок оптимізації керування процесом і застосування стратегії культивування з підживленням [31].

Вибір оптимальної температури. Добре відомим підходом для обмеження агрегації рекомбінантних білків *in vivo* є культивування за зниженої температури росту [11]. Оптимальна температура для росту *E. coli* – 37°C – сприяє максимальному накопиченню цільового білка, але призводить до утворення тілець-включень.

Зниження температури до 25 або 16°C зазвичай сприяє експресії рекомбінантних білків у розчинній формі [19]. Ріст за нижчої температури знижує швидкість синтезу білка і, таким чином, запобігає накопиченню проміжних продуктів у цитоплазмі. Крім того, він також зменшує агрегацію білка за рахунок запобігання між- і внутрішньомолекулярним гідрофобним взаємодіям, що зводять до мінімуму утворення тілець-включень [32].

Прикладом успішного використання цієї стратегії є отримання рекомбінантного ІЛ-6 людини. Знижена температура культивування (22°C) у поєднанні з наявністю С-шаперонів була ефективною для виділення великих кількостей розчинного та функціонального ІЛ-6. Кінцевий вихід розчинного білка становить у середньому приблизно $2,6 \text{ мг/л}$ клітинної культури. Знижена температура також сприятливо впливає на розчинність злитого білка GST-IL6, але вихід був нижчим, ніж при використанні шаперонів [11].

Також є приклад застосування системи pETSUMO, що являє собою лінеаризований бактеріальний вектор для індукцибельної експресії 6xHis-SUMO-міченого білка. Така система дає змогу отримувати інтерферон як у вигляді тілець-включень, так і у розчинній формі: за температури 25 і 37°C утворюється нерозчинна форма, а зниження температури до 16°C збільшує експресію SUMO-IFN- $\alpha 2$ у вигляді розчинного білка [33]. Проте при зниженні температури до 21°C швидкість накопичення IFN значно менша. Тому для досягнення максимального виходу необхідно збільшити тривалість культивування, але навіть у цьому випадку вихід нижчий, ніж при культивуванні за 37°C : вміст продукту становить $10\text{--}11 \%$ від сумарних білків клітини [34]. Крім того, для деяких білків низькотемпературна ферментація виявилася неефективною, наприклад, зниження температури не сприяло отриманню розчинного ІЛ-7.

Для сприяння виробництву розчинних рекомбінантних білків у *E. coli* важливо оптимізувати одразу кілька параметрів, таких як вибір штамів продуцентів, склад живильного середовища, використання певних векторів експресії та промоторів, застосування різних тегів злиття, швидкість синтезу білка, концентрація індуктора і тривалість індукції [19].

Індукція синтезу цільового білка. Індукцію синтезу цитокінів у системах із використанням промотору T7 можна проводити двома спосо-

бами: додаванням ізопропіл- β -D-1-тіоґалактопіранозиду (ІПТГ) у концентрації від 0,1 до 2,0 мМ або ферментацією на середовищі для аутоіндукції з лактозою. Перевагами аутоіндукції є досягнення високої густини клітин; відсутність необхідності постійного контролю росту клітин для індукції; зниження вартості процесу [29]. Найбільш часто для індукції застосовують ІПТГ у кінцевій концентрації 1 мМ. Оптимальна концентрація індуктора для різних систем біосинтезу може коливатись у широких межах і залежати від безлічі факторів, таких як сила використовуваного промотору, нуклеотидна послідовність клонованого гена, токсичність цільового продукту, склад живильного середовища, фізіологічний стан клітин у момент індукції.

Мінімальна концентрація індуктора, яка забезпечує ефективний синтез, може залежати від температурного режиму культивування клітин штаму-продуцента. За температури 37 °С повна індукція досягається за кінцевої концентрації ІПТГ 0,06 мМ, за 21 °С – 0,1 мМ, а в системі з використанням бактеріофага λ – 0,2 мМ [34]. Було показано, що на синтез цитокінів у розчинній формі може позитивно впливати зниження концентрації індуктора. Концентрація ІПТГ, що використовується найчастіше, становить 1 мМ, але для повної індукції достатньо вже 0,4 мМ. У досліді з отримання ІЛ-6 було запропоновано використовувати концентрацію 0,1 мМ, що, як і понижена температура, знижує швидкість синтезу білка, але у поєднанні з використанням шаперонів, які покращують правильне укладання, призводить до збільшення розчинності. Такий підхід може бути альтернативою використанню різних міток [11]. Також з'ясовано, що зниження концентрації індуктора не сприяє накопиченню ІFN у розчинній формі, що може бути характерним для інших продуктів [34].

Хімічні індуктори, такі як ІРТГ, дорогі і можуть бути токсичними, а їх наявність у кінцевому продукті або в стічних водах є небажаною. Відповідно, можуть знадобитися додаткові засоби контролю та операції для видалення хімічних індукторів, особливо з білків фармацевтичного призначення, що ускладнює процес і збільшує його вартість [35].

Було розроблено аутоіндукційний процес для отримання рекомбінантних білків під контролем промотору T7 в *E. coli*. Аутоіндукційні середовища готуються зі збалансованого поєднання різних джерел вуглецю та інших необ-

хідних поживних речовин, що дає культурам можливість рости до високої густини клітин і підтримувати високий рівень експресії цільового білка. Глюкоза сприяє швидкому росту на початку культивування і є інгібітором *lacUV5* промотору. Лактоза також споживається після вичерпання глюкози, викликаючи експресію рекомбінантного білка. Для досягнення стійкого росту під час фази індукції в середовище разом із лактозою вводять гліцерин [3]. Було розроблено спеціальні аутоіндукційні середовища, наприклад компанією Novagen [36].

Встановлено, що при періодичному культивуванні система аутоіндукції з лактозою сприяла більш високому виходу ІFN- α (270 мг/л), ніж системи з додаванням ІРТГ (150 мг/л) або тепловою індукцією (70 мг/л). Ще вищий вихід спостерігався у випадку культивування з підживленням (300 мг/л). Позитивний ефект лактози можна пояснити тим, що лактоза є не тільки індуктором, а й джерелом вуглецю та енергії. Навпаки, при використанні ІРТГ клітини зазнають голодування, що впливає на експресію білка. А теплова індукція призводить до утворення тілець-включень, які потребують рефолдингу *in vitro* перед очищенням, що збільшує втрати продукту [3].

Іншим варіантом індукції є індукована термоіндукція. Система експресії, що індукується температурою, заснована на промоторах фага λ -pL та/або pR, регульованих термолабільним репресором cI857, і досить широко використовується для отримання рекомбінантних білків у прокаріотичних клітинах (табл. 2). У цій системі експресія інгібується за температур 28–32 °С, а індукція досягається за рахунок інактивації мутантного репресора при підвищенні температури культивування, як правило, понад 37 °С [35].

Перевагами системи термоіндукції є те, що в ній наявний сильний і точно регульований промотор, а також уникається використання спеціальних середовищ, токсичних або дорогих хімічних індукторів. Крім того, обробка культур і ризику контамінації зведені до мінімуму, оскільки температуру у ферментерах можна легко змінити за допомогою зовнішніх засобів.

Проте одночасно з надекспресією гетерологічного білка підвищення температури також викликає різні складні стресові реакції. На додаток до клітинного стресу надлишкова експресія білка сама по собі також може викликати стресові реакції. Як наслідок, питома

Таблиця 2: Цитокини, отримані за допомогою термоіндукованої системи λ pL/pR/cI857 [35]

Цитокин	Плазмід	Умови культивування, стратегія індукції	Продуктивність	Система
IFN- β	pPLc245-HFIF25	BC; 28–42 °C	4 % TSP	λ pL/cI857
INF α , β	pPlhima-1, pPLhipohim A-s	BC; 31–42 °C	3 мг/л	λ pL/cI857
TNF- α	pCY-TNF	BC, SF; 30–42 °C	12 %-ний розчинний TSP	λ pRpL, cI857
	pCY-TNF	BC, 30–42 °C (6 год)	11 %-ний розчинний TSP	λ pRpL, cI857
IFN- γ	pPL-1	BC, SF; 28–42 °C	0,3 г/л	λ pL/cI857
	pPL-1	FB; 28–42 °C	7,43 г/л	λ pL/cI857
IFN- α	pMYW-a	FB; 30–42 °C	4 г/л	λ pL/cI857
BMP-2	pCYTEXP3-BMP-2	BC, SF 30–42 °C	25 % TSP	λ pL/cI857
	pCYTEXP3-BMP-2	FB; 30–42 °C	20 % TSP	λ pL/cI857
FGF-2	pIFGFB	FB; 30–42 °C (6–8 год)	5-6 г/л	λ pRPL cI857
IFN- α 2b	pRSET-INF α 2b; pGP1-2	BC, SF; 30–42 °C (5, 10 і 15 хв)	650 мг/л	λ PL, T7 RNA pol, cI857

Примітки. BC (Batch culture) – періодичне культивування; FB (Fed-batch culture) – періодичне культивування з підживленням; TSP (total cell protein) – загальний білок клітини.

швидкість росту зменшується і можуть відбуватися деградація рибосом та зміни в центральному вуглецевому обміні. В цілому ці ефекти можуть змінити кількість і якість білка. Рекombінантний білок може досягати високих концентрацій, але накопичуватися у вигляді тілець-включень. Однак, на відміну від інших систем експресії, термоіндукція також запускає реакцію теплового шоку (HSR), яка включає швидкий і селективний синтез білків теплового шоку (hsp). Після цього настає період адаптації з нижчою швидкістю синтезу білка, яка досягає нового стійкого рівня.

Рекombінантні цитокини, які продукуються в термоіндукованій системі експресії λ pL/pR-cI857, можуть утворювати агрегати в цитоплазмі, накопичуватися в розчинній формі в цитоплазмі чи в периплазмі або секретуватись у середовище. Місце накопичення білка залежить від сигналів локалізації.

Транспорт рекombінантних білків до периплазми має кілька переваг, таких як знижена протеолітична активність порівняно з цитоплазмою, полегшення правильного формування дисульфідних зв'язків, простіші протоколи очистки, а також мінімальні кількості або навіть відсутність небажаних ізоформ білка, тому доцільним є створення злитих із міткою білків [35].

Виділення та очистка рекombінантних цитокінів

Залежно від особливостей продуцента цитокінів і умов культивування можливі два

варіанти розміщення цільового білка: в першому випадку він секретується в культуральну рідину, в другому – цільовий білок сконцентрований усередині клітини у вигляді тілець-включень.

Першим етапом виділення є відділення клітинної біомаси від культуральної рідини центрифугуванням. У разі пілотного або заводського масштабу виробництва для видалення клітин використовуються безперервні центрифуги.

Для отримання тілець-включень необхідно зруйнувати клітини. Найпоширенішими методами є гомогенізація високого тиску, руйнування в кульових млинах, ультразвукова обробка, осмотичний шок, заморожування-відтаювання, ферментативний лізис та хімічний лізис. Для великомасштабних процесів найчастіше використовуються гомогенізатор високого тиску та кульовий млин. Хімічний лізис має переваги порівняно з механічними методами, такими як ультразвукова обробка або гомогенізація, що призводять до агрегації білкових молекул, які спочатку були частиною розчинної фракції [37].

Тільця-включення внаслідок їх високої густини порівняно з іншими клітинними компонентами можуть бути відділені від них центрифугуванням. Для цього використовується мікрофільтрація в поперечному потоці [37]. Для підвищення ефективності рефолдингу здійснюють додаткову очистку ізольованих тілець-включень від компонентів клітин проведенням кількох етапів промивання з використанням

низьких концентрацій детергентів, таких як дезоксихолієва кислота і тритон X-100 [37, 38]. Далі тільця-включення розчиняють із використанням високих концентрацій (6–8 М) сильних денатуруючих або хаотропних агентів, таких як 8 М сечовина, гуанідин гідрохлорид, додецилсульфат натрію (SDS), а також дитіотреїтолу (DTT), *b*-меркаптоетанолу або цистеїну як відновників. Також були спроби здійснити солюбілізацію з використанням буфера, що містить низькі концентрації хаотропного агента з екстремальними значеннями рН або температури.

Після цього проводять рефолдинг, при якому відбувається відновлення дисульфідних зв'язків, що приводить до відновлення біологічної активності білка [39, 40]. Для ренатурації денатурованих білків використовуються різні способи рефолдингу, такі як швидке розведення, діаліз, діафільтрація з використанням ультрафільтраційної мембрани, рефолдинг на колонці з використанням афінності, іонного обміну, гідрофобної взаємодії або ексклюзійної хроматографії, технології з високим гідростатичним тиском [39]. Швидке розведення солюбілізованого білка безпосередньо в буфері не вимагає високих витрат на обладнання. Проте при цьому відбувається зниження концентрації білків, що мінімізує їх здатність до міжмолекулярних взаємодій. Дисульфідні зв'язки, як правило, утворюються за рахунок використання суміші відновленого/окисненого глутатіону, гліцерину, L-аргініну або низької концентрації сечовини (2–4 М), щоб запобігти агрегації білків. Негативним наслідком використання зазначених сумішей є знижена якість отриманих білків і їх менший загальний вихід. Також існує проблема збільшення об'єму розчину та необхідності додаткових стадій ультрафільтрації для концентрування після рефолдингу. Зменшити об'єми буферів можна за допомогою використання імпульсної ренатурації, при якій невеликі кількості солюбілізованого білка додаються до ренатураційного буферу через певні проміжки часу [41, 42].

Рефолдинг у поєднанні з хроматографічними методами був розроблений з метою поліпшення продуктивності без зниження виходу. Імобілізація білкових молекул на хроматографічних матрицях сприяє просторовій ізоляції білків один від одного, тим самим зменшуючи міжмолекулярні взаємодії проміжних продуктів. Проведення рефолдингу разом із хроматографічною очисткою є оптимальним, оскільки деякі високомолекулярні агрегати і

сторонні речовини можуть бути спільно очищені за одну стадію [17].

Хроматографічні методи, як правило, забезпечують кращу якість білків і вищий вихід, але вимагають дорогого обладнання [42]. Агрегація білків через міжмолекулярну взаємодію зводиться до мінімуму, тому що молекули зв'язуються з матрицею носія та ізолюються [39, 41].

Методи хроматографії використовують три основні стратегії, спрямовані на видалення денатурантів і рефолдинг. Однією з них є заміна розчинника методом ексклюзійної хроматографії (size-exclusion chromatography – SEC). Частково молекули денатурованого білка мають високу схильність до агрегації, коли вони є вільними в розчині. Гелева матриця, що використовується для SEC, обмежує агрегацію за рахунок фізичної ізоляції молекул і часто дає можливість успішно відновити біологічно активний білок. За типовою процедурою ізолювані тільця-включення солюбілізують у денатуранті (наприклад, гуанідин гідрохлорид або сечовина) і завантажують у колонку, урівноважену або з денатуратом, або з кінцевим буфером. Для елюювання білка використовується буфер без денатурату.

У літературі описана процедура очистки ІЛ-7, яка полягає в тому, що очищені тільця включень спочатку денатурують та відновлюють, а потім завантажують до колонки Superdex 200. Для проведення рефолдингу ІЛ-7 були оцінені різні окисно-відновні умови. Рефолдинг при нейтральному або основному рН у Tris-буфері забезпечує правильне формування дисульфідних зв'язків. Додавання 0,5 М L-аргініну до буферу запобігає агрегації та збільшує вихід біологічно активного мономерного ІЛ-7 у 10 разів. Температура має підтримуватись на рівні від 2 до 8 °С. Концентрацію білка підтримують на рівні 0,1 мг/мл. Після рефолдингу білок додатково очищують хроматографією гідрофобної взаємодії, іонообмінною і гельфільтрацією [39, 42].

Також використовується рефолдинг на колонці (оборотна іммобілізація денатурованих білків на твердому носії та повільне видалення денатуранту заміною розчинника). Найбільш поширеною стратегією є використання гістидинових міток, які зв'язуються зі смолою, що містить нікель. Зв'язок білка з нікелем дуже стійкий у діапазоні рН 6,4–8,5 і, як правило, стійкий до денатурантів, неіоногенних детергентів (1–2 %), високих концентрацій солі (<1 М NaCl) і низьких (5–10 мМ) концентра-

цій редукуючих агентів, таких як DTT, глутатіон або похідні фосфіну. Білки зазвичай зв'язуються зі смолою в денатурованому стані, а потім повільно укладаються при поступовому видаленні денатуранту. Відновлений білок елююється високою (100–500 мМ) концентрацією імідазолу.

Третій метод – рефолдинг із використанням шаперонів, у якому шаперон іммобілізований на твердому носії, а частково денатурований білок пропускається через носій для полегшення згортання [42]. Для терапевтичного застосування необхідно отримати білок із високим ступенем чистоти. Для цього широко використовуються методи хроматографії: афінної, іонообмінної, гідрофобної, а також гель-фільтрація [39].

Для очистки білків, отриманих з *E. coli*, часто застосовується іонообмінна хроматографія. Найбільш широко використовуваними комерційно доступними іонообмінними смолами є сульфопропіл (SP), Q-сефароза, Unosphere S, Unosphere Q або диетиламіноетил (DEAE) сефароза. Елювання зі збільшенням концентрації солі або збільшенням/зменшенням рН буфера є найбільш часто використовуваною стратегією в іонообмінній хроматографії. Чим вищий сумарний заряд білка, тим вища іонна сила, необхідна для елювання [39, 43]. Афінна хроматографія є простим методом для високого ступеня очистки рекомбінантних білків за одну стадію. Матеріал для матриці повинен бути інертним і легко піддаватись модифікаціям, найчастіше використовують агарозу або сефарозу. Елювання зв'язаного білка здійснюють із використанням високої концентрації солі, сильних хелатотвірних агентів та/або низьких рН (<4,5) [39]. Рекомбінантний ІЛ-38, що містить С-гексагістидинову мітку, експресували в *E. coli* BL21 (DE3). Отриманий злитий білок очищували за допомогою афінної хроматографії Ni-NTA. Білок ІЛ-38 був виявлений в основному у розчинній фракції. Вихід ІЛ-38 становив 4 мг/л бактеріальної культури, а чистота – понад 98 % за низького рівня ендотоксину (<0,1 EU/мкг) [44].

З метою збільшення виходу до рефолдингу може бути здійснена попередня хроматографічна очистка білка. Для цього тільця-включення солюбілізують і отриманий розчин очищують катіонообмінною хроматографією з SP-сефарозою (SP-CEX) із використанням буфера, що містить 7 М сечовини, рН 5,0. Елюцію здійснюють градієнтом хлориду натрію.

Далі проводять рефолдинг: ІЛ-7 розчиняють у буфері з 6 М гуанідин гідрохлориду та 10 мМ дитіотреїтолу, розводять та діалізують проти буфера, що містить пару відновленого/окисненого глутатіону. Після рефолдингу білок концентрують і очищують гель-фільтрацією. Очистка ІЛ-7 перед рефолдингом давала змогу отримати більшу кількість мономерного та біологічно активного ІЛ-7. Крім того, додаткова стадія очистки до рефолдингу дає змогу знизити вміст ендотоксинів у кінцевому білковому препараті [45].

Новим доповненням до арсеналу існуючих афінних міток для експресії та очищення рекомбінантного білка є АК-TAG. Аденілаткіназа (АК) з *E. coli* була використана як мітка розчинності та спорідненості для виробництва рекомбінантного TNF α . Мітка АК була зв'язана з N-кінцем цільового білка, що дає можливість експресувати його в розчинній формі. До N-кінця мітки АК було приєднано His-мітку, а до C-кінця – сайт розщеплення для видалення мітки. Отриманий злитий білок АК-T-TNF α спочатку очищували з допомогою Blue-Sepharose, використовуючи елюент, до складу якого входив Ар5А, аналог субстрату АК. Після цього очищений гібридний білок пропускали через колонку Ni-NTA і додавали тромбін для розщеплення злитого білка. Вивільнений TNF α елювали з колонки буфером із низькою концентрацією імідазолу. Було отримано 6,3 мг/л TNF α , вихід зі стадії очистки становив 44 % [46].

При отриманні rhGM-CSF, який накопичується у вигляді тілець-включень, здійснювали солюбілізацію в жорстких умовах, що запобігає утворенню неправильних між- і внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язків. Для досягнення ефективного рефолдингу додавали високі концентрації GuHCl. Після розчинення білок піддавали діалізу проти буфера, в якому зменшувались кількості GuHCl. Використання діалізу замість розведення дає змогу уникнути збільшення об'єму розчину і є більш ефективним для рефолдингу. Для покращення згортання білка спочатку було відновлено дисульфідні зв'язки за допомогою дитіотреїтолу (DTT), оскільки hGM-CSF містить 4 залишки цистеїну, що утворюють 2 дисульфідних зв'язки, які можуть формуватися неправильно. Для створення правильної конфігурації дисульфідних зв'язків у діалізний буфер було включено відновлений і окиснений глутатіон із надлишком відновленої форми. Також було внесено аргінін для запобігання агрегації частково згорнутих

проміжних сполук. Після рефолдингу rhGM-CSF очищали з використанням Ni-NTA смоли, з якою з'єднувалась мітка 8×His, розмішена на C-кінці. Відразу після елюювання з нікелевої колонки rhGM-CSF діалізували проти буфера з низьким вмістом солі. При цьому будь-який частково згорнутий білок випадав у осад і видалявся на наступній стадії центрифугування. Використовуючи описаний спосіб, отримували приблизно 7 мг активного rhGM-CSF на літр клітинної культури.

Альтернативний підхід до отримання rhGM-CSF полягає в запобіганні утворенню тілець-включень. Системи експресії, які дають змогу отримувати розчинний і очищений rhGM-CSF, показали, в процесі лабораторних досліджень, свою ефективність, але при порівнянні виходу рекомбінантного білка, отриманого цим способом і з використанням стандартних методів, було виявлено, що він значно нижчий (~500 мкг/мл) [47]. Тому, використовувати цей спосіб не рекомендується.

Використання *Lactococcus lactis* для спрямованої доставки цитокінів

Складність отримання розчинних, протеолітично стабільних білків у *E. coli* зумовлює пошук альтернативних продуцентів, у яких обмеження, пов'язані з використанням грамнегативних мікроорганізмів, можуть бути зведені до мінімуму. Альтернативною системою експресії є молочнокислі бактерії, особливо *Lactococcus lactis*, які є грампозитивними мікроорганізмами, що мають статус GRAS (загально визнані як безпечні), присвоєний FDA. Генетично модифіковані *L. lactis* були розроблені як інструмент для доставки біологічно активних білків у тканини слизової оболонки для надання локальних чи системних ефектів [48, 49].

Штами *L. lactis* є безпечними для людини, оскільки не здатні розмножуватися в організмі або стати частиною нормальної кишкової флори. Проте глибокий аналіз якості рекомбінантного білка в цій системі все ще потрібен для повної оцінки її ефективності та потенціалу до вдосконалення [48, 50]. Ключові корисні властивості *L. lactis* включають статус (GRAS), пробіотичні властивості, відсутність тілець-включень і ендотоксинів, технологію позаклітинної секреції, а також різноманітний вибір індукційних векторів експресії [51]. Одним із добре вивчених застосувань модифікованих *L. lactis* є їх потенціал для лікування патологій

слизової оболонки кишечника (запальне захворювання кишечника, хвороба Крона). Пероральне введення *L. lactis*, що є продуцентами IL-10, може забезпечувати доставку лікарського засобу в кишечник для місцевого лікування ураженої області та забезпечувати синтез цитокінів безпосередньо в запалених тканинах слизової оболонки. IL-10 є одним із найважливіших протизапальних цитокінів, що беруть участь в імунній системі кишечника [48]. *L. lactis* можуть адаптуватися для конститутивної або індукованої експресії гетерологічних білків залежно від біологічної потреби. Описано сильні конститутивні промотори для *L. lactis*; проте безперервна висока секреція цитокінів, зокрема інтерлейкінів, може викликати їх внутрішньоклітинне накопичення або деградацію. Тому індукційна експресія білка може бути бажаною для досягнення регульованого введення лікарського засобу. Найбільш успішною індукційною системою є система експресії генів, контрольованих нізином (NICE), де інтенсивність експресії генів пропорційна концентрації антимікробного пептиду нізину. За допомогою цієї гнучкої системи рівень експресії генів може бути обмежений кількістю нізину і здатен підвищуватися більш ніж у 1000 разів. Існують і інші індукційні системи, засновані на наявності лактози, глюкози, зниженні рН або голодуванні цинку [48].

Рекомбінантний *L. lactis*, який продукує IL-12, також був досліджений для лікування астми. На сьогодні *L. lactis* використовується для спільного виробництва або виділення широкого спектра інших ад'ювантів і факторів росту. Успішні приклади включають TGF- β 1, інсуліноподібний фактор росту I [51]. Позитивного ефекту також було досягнуто при введенні до слизової оболонки кишечника *L. lactis*, що експресують TSLP [52].

На якість рекомбінантного білка у *L. lactis* значною мірою впливають метаболічний режим, умови росту і температура. Регулюванням цих параметрів конформаційна структура як розчинних, так і нерозчинних білкових фракцій може модулюватись у широких межах, що забезпечує високу гнучкість системи для виробництва розчинних білків і білкових агрегатів для біомедичного застосування. Температура росту відіграє ключову роль для конформації та розчинності білків. На активність білка негативно впливають низькі температури, але розчинність білка досягає більш високих значень за субоптимальних температур, особливо за 16°C.

На специфічну активність нерозчинного білка температура впливає слабо [53].

Проблемою є стабільне зберігання великої кількості чутливих до температури *L. lactis*. Ліофілізація знижує активність води в бактеріях і дає можливість тривалий час зберігати бактерії за температури вище нуля. Вже досягнуто значного прогресу в розробці оптимального складу засобів, придатних для використання людиною [48].

Отримання цитокінів із використанням бактерій р. *Bacillus*

Однією з бактеріальних систем експресії, що може бути використана для отримання цитокінів, є грампозитивні ґрунтові бактерії *Bacillus subtilis*, що, як відомо, секретують промислово значимі білки безпосередньо в культуральну рідину без ендо- або екзотоксинів і мають статус GRAS. *B. subtilis* ефективно продукує гомологічні білки, проте виробництво гетерологічних все ще є проблематичним, а стратегії оптимізації надекспресії для одних білків не завжди спрацьовують для інших. Однак із використанням *B. subtilis* вдалось отримати низку рекомбінантних цитокінів у біологічно активній формі (табл. 3) [54].

Було виявлено кілька вузьких місць у шляху секреції *B. subtilis*, таких як погане націлювання на транслоказу, деградація секреторного білка і неправильне згортання. Основними перешкодами для використання *Bacillus* були: відсутність відповідних векторів; нестабільність плазмід; наявність позаклітинних протеаз, які розщеплюють рекомбінантні чужорідні білки, поява неправильно згорнутих білків [55].

Секреторна система експресії *Bacillus* була використана для позаклітинної секреції рекомбінантних кісткових морфогенетичних білків людини (rhBMP2) у димерній біологічно активній формі. BMP є членами суперсімейства TGF і діють як регулятори під час ембріогене-

зу, відновлення кісток і хрящів. Були досліджені два штами *B. subtilis*: SCK6 і WB600. Штам SCK6 є генетично модифікованим і має більш високу здатність поглинати чужорідні молекули ДНК, а також має підвищену експресію гена *ComK* під індукованим ксилозою промотором. Штам WB600 дефіцитний за шістьма позаклітинними протеазами і підходить для позаклітинної продукції рекомбінантних білків. При дослідженні цих штамів було успішно отримано до 1 і 1,8 мг на 200 мл культури мономера і димера rhBMP2 відповідно.

Кінцева локалізація рекомбінантних білків залежить від сигнального пептиду; будь-який білок, що продукується без сигнального пептиду, залишається в цитоплазмі. У Sec-залежному секреторному шляху білки, які синтезуються у вигляді комплексу з N-кінцевим сигнальним пептидом, транслокуються в клітинну мембрану, де зв'язуються із секреторним транслоказним комплексом, що розпізнається сигнальним пептидом. Білок виводиться з клітини після видалення сигнального пептиду специфічною сигнальною пептидазою. Таким чином, вибір сигнального пептиду впливає на швидкість секреції білка і на його вихід. Для отримання rhBMP2 було використано сигнальний пептид α -амілази, який забезпечує високу секрецію гомологічного білка. Крім того, він також використовувався для гетерологічних білків, наприклад для позаклітинної секреції цитокінів людини, включаючи IL-3 та INF α 2.

Зазвичай бактеріальні системи експресії не здатні продукувати білки в димерній формі. BMP2, що отримувався з *E. coli*, перебував у неактивній мономерній формі. Щоб вирішити цю проблему, було створено ковалентно зв'язаний гомодимер rhBMP2, що складається з двох мономерів, пов'язаних лінкером, що багатий на серин і гліцин.

Позаклітинні протеази є ще одним серйозним обмеженням секреторної системи *Bacillus*. Штам *B. subtilis* WB600 дефіцитний за позаклітинними протеазами, однак проблемою цих

Таблиця 3: Отримання рекомбінантних цитокінів у системах експресії на основі *Bacillus* [54]

Рекомбінантний цитокін людини	Вектор	Живильне середовище	Вихід продукту	Система експресії
EGF	pM2Veg	LB	7,0 мг/л	<i>B. subtilis</i>
ІФН- α 2	pKTH68	Broth-starch Medium	0,5–1,0 мг/л	<i>B. subtilis</i>
IL-3	pMA5	2X YT, MXR, MSR	100 мкг/л–100 мг/л	<i>B. subtilis</i>
GCSF	pNWPB	2X L-MAL	96 мг/л	<i>B. subtilis</i>
BMP 7	pSubP14	LBL	350 нг/л	<i>B. subtilis</i>
IL-2	pNU211	3PY	120 мг/л	<i>B. brevis</i>
BMP2	pHT43	2X YT	5–9 мг/л	<i>B. subtilis</i>

штамів є схильність до лізису клітин і нестабільності плазміди. Для усунення цього недоліку необхідно підібрати підходящий сигнальний пептид і вектор, а також живильне середовище. Вибираючи вектор, необхідно враховувати, що завелика кількість копій вектора може призвести до стресу секреції та втрати експресії. Для виробництва BMP7 було використано сигнальний пептид rLip під контролем промотору HraII і середовище LBL, що виявилось малоефективним. BMP2 отримували з використанням сигнальної послідовності amyQ під контролем промотору P_{gac}, що забезпечило підвищення позаклітинної продукції. Для вироблення BMP2 було використано середовище 2xYT, культивування здійснювали за 30 °C. Максимальна секреторна експресія мономера і димера становила 35 і 25 % відповідно.

Інші білки, в тому числі IL-3, IL-2, GCSF, EGF, INF- α 2, були отримані за різних умов, але загальний вихід був значно нижчим порівняно із системою *E. coli*. Для виробництва IL-3 були протестовані різні набори промоторів і сигнальних пептидів, а також три різних типи середовища. Значного збільшення виходу, зі 100 мкг/л до 100 мг/л, вдалося досягти завдяки зміні комбінації промотору і сигнального пептиду. Найкращою комбінацією було використання сигнального пептиду амілази з промотором рHT43, що приводило до максимальної секреції білка IL-3. При синтезі BMP7, IL-2, IL-3, EGF, INF α 2, GCSF, а також BMP2 усі білки, які продукуються системою експресії *Bacillus*, були біологічно активними і мали правильну конфігурацію повторного укладання. Це може бути пов'язано з наявністю молекулярних шаперонів, які сприяють рефолдингу білків, і наявністю оксидоредуктаз, які сприяють утворенню дисульфідних зв'язків та димерів.

Низька концентрація гетерологічних білків ускладнює їх очистку, тому зазвичай для досягнення значної міри чистоти потрібно здійснити кілька етапів. Спочатку потрібно концентрувати білки, які містяться в супернатанті культури. При отриманні BMP2 спочатку проводили ліофілізацію, щоб зменшити об'єм культурального супернатанту для подальшої очистки швидкою рідинною хроматографією білків (FPLC). Потім для заміни буфера білок піддавали діалізу через діалізну мембрану відповідного розміру (6–8 кДа) з подальшою стадією очистки на колонці. На фінальній стадії, для досягнення максимальної чистоти, проводили гель-фільтрацію.

Хоча *Bacillus* має перевагу правильного рефолдингу і продукування розчинного білка, трудомісткий процес очищення і низькі виходи все ще роблять його недостатньо підходящою системою експресії для виробництва цитокінів [54].

Висновки

Найпоширенішою системою експресії для виробництва рекомбінантних цитокінів є *E. coli*. Проте основним недоліком її використання є утворення цільового білка у формі тілець-включень, що ускладнює очистку продукту. Хоча кількість розчинного білка, яка накопичується в процесі біосинтезу, нижча, ніж при синтезі у вигляді білкових агрегатів, останнім часом у більшості досліджень, що стосуються отримання цитокінів, фігурують спроби досягти підвищення розчинності. Важливими моментами при цьому є підбір штаму та вектора експресії, заміна рідкісних кодонів, використання міток для утворення злитого білка, коекспресія шаперонів, оптимізація умов культивування, підбір режиму, температури та способу індукції синтезу.

Також проблемою є забруднення продукту бактеріальними ендотоксинами, які повністю не видаляються під час очистки і можуть призводити до виникнення імунної відповіді навіть у мінімальних кількостях. Для подолання цього недоліку було створено штами під назвою ClearColi, у яких генетично усунуто здатність до продукування LPS.

Процес культивування у виробництві цитокінів включає отримання інокуляту, накопичення біомаси та індукцію синтезу цільового білка. Для культивування *E. coli* можуть бути використані два режими – періодична ферментація та періодична ферментація з підживленням. Другий спосіб переважно є більш ефективним і своєю чергою має кілька модифікацій залежно від принципу регулювання подачі розчину для підживлення. Культивування може проводитись за різних температур: оптимальної для росту *E. coli* (37 °C) або зниженої, що в більшості випадків сприяє утворенню розчинних форм білків.

Індукція синтезу цільового білка може бути здійснена додаванням ІПТГ або аутоіндукцією, при якій у середовище вноситься лактоза. Створено спеціальні середовища для аутоіндукції, склад яких збалансований за джерелами вуглецевого живлення. Менш поширеною є термоіндукція.

Процедури виділення і очистки залежать від типу продуцента і локалізації продукту. У разі наявності тілець-включень етапом, що найбільше впливає на вихід і якість кінцевого продукту, є рефолдинг. На фінішних стадіях очистки використовуються хроматографічні методи та їх поєднання.

Паралельно з процесами вдосконалення системи експресії на основі *E. coli* здійснюються спроби впровадження альтернативних бактеріальних продуцентів, зокрема *L. lactis* та *Bacillus*, які є безпечними (статус GRAS) і

позбавлені основних недоліків грамнегативних бактерій та продукують функціональні білки у розчинній формі без загрози забруднення ендотоксинами. Проте ці системи ще не достатньо вивчені та оптимізовані для потреб промислового виробництва цитокінів.

Таким чином, удосконалення біотехнологічних підходів отримання цитокінів є необхідною умовою для створення терапевтичних препаратів, які характеризуватимуться належними показниками якості, безпеки та ефективності.

References

- [1] Dinarello CA. Historical review of cytokines. *Eur J Immunol.* 2011;37(1):34-45. DOI: 10.1002/eji.200737772
- [2] Zdravkovic N, Rosic M, Lutovac M, Zdravkovic V. Physiology and pathology of cytokine: Commercial production and medical use. In: Rezaei N, editor. *Physiology and Pathology of Immunology.* InTech; 2017. p. 33-53. DOI: 10.5772/intechopen.72200
- [3] El-Baky NA, Linjawi MH, Redwan EM. Auto-induction expression of human consensus interferon-alpha in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol.* 2015;15(14):1-10. DOI: 10.1186/s12896-015-0128-x
- [4] Kriachok IA, Tytorenko IB. Granulocyte colony stimulating factor use during anticancer therapy. *Clinical Oncol.* 2015;3(19):64-8.
- [5] Skrypnik KA, Kosorukov VS. Human granulocyte-colony stimulating factor as a new therapeutic agent in clinic. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal.* 2011;10(2):19-24.
- [6] Veldkamp C, Koplinski C, Jensen D, Peterson F, Smits K, Smith B, et al. Production of recombinant chemokines and validation of refolding. *Methods Enzymol.* 2016;570:539-65. DOI: 10.1016/bs.mie.2015.09.031
- [7] Tripathi N. Production and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli*. *ChemBioEng Rev.* 2016;3(3):116-33. DOI: 10.1002/cben.201600002
- [8] Burgess-Brown N, Sharma S, Sobott F, Loenarz C, Oppermann U, Gileadi O. Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein Expr Purif.* 2008;59(1):94-102. DOI: 10.1016/j.pep.2008.01.008
- [9] Schmidt F. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;65(4):363-72. DOI: 10.1007/s00253-004-1656-9
- [10] Kim S, Jeong H, Kim E, Kim J, Lee S, Yoon S. Genomic and transcriptomic landscape of *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Nucleic Acids Res.* 2017;45(9):5285-93. DOI: 10.1093/nar/gkx228
- [11] Nausch H, Huckauf J, Koslowski R, Meyer U, Broer I, Mikschofsky H. Recombinant production of human Interleukin 6 in *Escherichia coli*. *PLoS ONE.* 2013;8(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0054933
- [12] Wyre C. Recombinant protein production in *Escherichia coli*: Optimisation of improved protocols [thesis]. Birmingham: University of Birmingham; 2014.
- [13] Rosano G, Ceccarelli E. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014;5:172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172
- [14] Zawada JF, Yin G, Steiner AR, Yang J, Naresh A, Roy SM, et al. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production – A new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnol Bioeng.* 2011;108(7):1570-8. DOI: 10.1002/bit.23103
- [15] Toghraie FS, Sharifzadeh SM, Ramezani A, Maymand EM, Yazdanpanah-Samani M, Ghaderi A. Cloning and expression of recombinant human Interleukin-7 in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. *Rep Biochem Mol Biol.* 2017;6(1):66-73.
- [16] Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact.* 2015;14(1):1-10. DOI: 10.1186/s12934-015-0222-8
- [17] Basu A, Li X, Leong SS. Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;92(2):241-51. DOI: 10.1007/s00253-011-3513-y
- [18] Goncharuk DA, Tkach EN, Zeynalov OA, inventor; Skiff Npk OOO, assignee. Expression system and method of producing non-modified recombinant proteins in *Escherichia coli* using It. Russia patent 2604796. 2016 Dec 16.
- [19] Devi N, Adivitiya, Khasa YP. A combinatorial approach of N-terminus blocking and codon optimization strategies to enhance the soluble expression of recombinant hIL-7 in *E. coli* fed-batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(23):9979-94. DOI: 10.1007/s00253-016-7683-5

- [20] Assenberg R, Wan PT, Geisse S, Mayr LM. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Curr Opin Struct Biol.* 2013;23(3):393-402. DOI: 10.1016/j.sbi.2013.03.008
- [21] Gupta SK, Shukla P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2016;36(6):1089-98. DOI: 10.3109/07388551.2015.1084264
- [22] Shamonov NA. Development of industrial technology for the production of pegylated forms of interferon alfa-2a and alpha-2b [dissertation]. Moscow: GosNIIGenetika; 2015.
- [23] Slavchenko IY. The influence of temperature on the yield soluble human alpha interferon in the system of recombinant proteins overproduction using bacteriophage lambda. *Biopolym Cell.* 2002;18(5):436-41. DOI: 10.7124/bc.000623
- [24] Ueda T, Akuta T, Kikuchi-Ueda T, Imaizumi K, Ono Y. Improving the soluble expression and purification of recombinant human stem cell factor (SCF) in endotoxin-free *Escherichia coli* by disulfide shuffling with persulfide. *Protein Expr Purif.* 2016;120:99-105. DOI: 10.1016/j.pep.2015.12.015
- [25] Mamat U, Woodard RW, Wilke K, Souvignier C, Mead D, Steinmetz E, et al. Endotoxin-free protein production – ClearColi™ technology. 2012.
- [26] Mamat U, Wilke K, Bramhill D, Schromm AB, Lindner B, Kohl TA, et al. Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. *Microb Cell Fac.* 2015;14(81):1-15. DOI: 10.1186/s12934-015-0241-5
- [27] Sanchez-Garcia L, Martín L, Mangués R, Ferrer-Mirallés N, Vázquez E, Villaverde A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microb Cell Fact.* 2016;15(33). DOI: 10.1186/s12934-016-0437-3
- [28] Schwarz H, Schmittner M, Duschl A, Horejs-Hoek J. Residual endotoxin contaminations in recombinant proteins are sufficient to activate human CD1c+ dendritic cells. *PLoS One.* 2014;9(12):1-15. DOI: 10.1371/journal.pone.0113840
- [29] Lutsenko TN, Galkin AYu. Substantiation of biotechnological approaches of producing Interleukin-7 recombinant human. *Trudy BGTU.* 2015;4(177):188-97.
- [30] Krause M, Neubauer A, Neubauer P. The fed-batch principle for the molecular biology lab: controlled nutrient diets in ready-made media improve production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2016;15(110):1-13. DOI: 10.1186/s12934-016-0513-8
- [31] Wang J, Chen J, Xu R, Xu Z. Batch and fed-batch cultivation for excretive production of human epidermal growth factor (hEGF) with recombinant *E. coli* K12 system. *Prep Biochem Biotechnol.* 2008;38(3):271-81. DOI: 10.1080/10826060802165089
- [32] Baeshen MN, Al-Hejin AM, Bora RS, Ahmed MM, Ramadan HA, Saini KS, et al. Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: Current scenario and future perspectives. *Microbiol Biotechnol.* 2015;27(7):953-62. DOI: 10.4014/jmb.1412.12079
- [33] Bis RL, Stauffer TM, Singh SM, Lavoie TB, Mallela KMG. High yield soluble bacterial expression and streamlined purification of recombinant human interferon α -2a. *Protein Expr Purif.* 2014;99:138-46. DOI: 10.1016/j.pep.2014.04.010
- [34] Slavchenko IYu, Boreyko EV, Vorobey NV. Influence of various inductor concentrations on the human alpha-2b interferon production in the bacteriophage T7 RNA polymerase-base expression system in *Escherichia coli* cells. *Biopolym Cell.* 2003;5(19):457-62. DOI: 10.7124/bc.000675
- [35] Valdez-Cruz NA, Caspeta L, Pérez NO, Ramírez OT, Trujillo-Roldán MA. Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microb Cell Fact.* 2010;9(18). DOI: 10.1186/1475-2859-9-18
- [36] Studier FW. New Studier media for auto-induction and other applications. *Protein Expr Purif.* 2005;41:207-34.
- [37] Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact.* 2015;14(41). DOI: 10.1186/s12934-015-0222-8
- [38] Ouellette T, Destrau S, Ouellette T, Zhu J, Roach JM, Coffman JD, et al. Production and purification of refolded recombinant human IL-7 from inclusion bodies. *Protein Expr Purif.* 2003;30(2):156-66. DOI: 10.1016/S1046-5928(03)00134-7
- [39] Tripathi NK. Production and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli*. *ChemBioEng Rev.* 2016;3:116-33. DOI: 10.1002/cben.201600002
- [40] Wingfield PT, Palmer I, Liang SM. Folding and purification of insoluble (inclusion body) proteins from *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci.* 2014;78(6):1-30. DOI: 10.1002/0471140864.ps0605s78
- [41] Anselment BRK. Optimization and modeling of protein refolding conditions [dissertation]. Munich: Technical University of Munich; 2012.
- [42] Swietnicki W. Folding aggregated proteins into functionally active forms. *Curr Opin Biotechnol.* 2006;17(4):367-72. DOI: 10.1016/j.copbio.2006.05.011
- [43] Saraswat M, Musante L, Ravidá L, Shortt B, Byrne B, Holthofer H. Preparative purification of recombinant proteins: Current status and future trends. *Biomed Res Int.* 2013;2013. DOI: 10.1155/2013/312709
- [44] Yuan XL, Li Y, Pan XH, Zhou M, Gao QY, Li MC. Production of recombinant human interleukin-38 and its inhibitory effect on the expression of proinflammatory cytokines in THP-1 cells. *Mol Biol.* 2016;50(3):466-73. DOI: 10.1134/s0026893316030134

- [45] Zaremba-Czogalla M, Stumpp C, Bonifacio E, Paul R. Comparison of the purification of biologically active IL-7 cytokine expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*. 2015;110:66-71. DOI: 10.1016/j.pep.2015.02.013
- [46] Luo D, Wen C, Zhao R, Liu X, Liu X, Cui J, et al. High level expression and purification of recombinant proteins from *Escherichia coli* with AK-TAG. *PLoS ONE*. 2016;11(5):1-11. DOI: 10.1371/journal.pone.0156106
- [47] Thomson CA, Olson M, Jackson LM, Schrader JW. A simplified method for the efficient refolding and purification of recombinant human GM-CSF. *PLoS ONE*. 2012;7(11):1-6. DOI: 10.1371/journal.pone.0049891
- [48] Cook DP, Gysemans C, Mathieu C. *Lactococcus lactis* as a versatile vehicle for tolerogenic immunotherapy. *Front Immunol*. 2017;8(1961):1-16. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01961
- [49] Ferrer-Miralles N, Villaverde A. Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue. *Microb Cell Fact*. 2013;12(113):1-4. DOI: 10.1186/1475-2859-12-113
- [50] Zurita-Turk M, del Carmen S, Santos ACG, Pereira VB, Cara DC, Leclercq SY, et al. *Lactococcus lactis* carrying the pValac DNA expression vector coding for IL-10 reduces inflammation in a murine model of experimental colitis. *BMC Biotechnol*. 2014;14(73):1-12. DOI: 10.1186/1472-6750-14-73
- [51] Song AA, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microb Cell Fact*. 2017;16(55). DOI: 10.1186/s12934-017-0669-x
- [52] Aubry C, Michon C, Chain F, Chvatchenko Y, Goffin L, Zimmerli SC, et al. Protective effect of TSLP delivered at the gut mucosa level by recombinant lactic acid bacteria in DSS-induced colitis mouse model. *Microb Cell Fact*. 2015;14(176). DOI: 10.1186/s12934-015-0367-5
- [53] Cano-Garrido O, Rueda FL, Sánchez-García L, Ruiz-Ávila L, Bossier R, Villaverde A, et al. Expanding the recombinant protein quality in *Lactococcus lactis*. *Microb Cell Fact*. 2014;13(167). DOI: 10.1186/s12934-014-0167-3
- [54] Hanif MU, Gul R, Hanif MI, Hashmi AA. Heterologous secretory expression and characterization of dimerized bone morphogenetic protein 2 in *Bacillus subtilis*. *Biomed Res Int*. 2017;2017. DOI: 10.1155/2017/9350537
- [55] Westers L, Westers H, Quax WJ. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Mol Cell Res*. 2004;1694(1-3):299-310. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.02.011

Т.А. Наточий, В.В. Мотроненко

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К ПОЛУЧЕНИЮ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЦИТОКИНОВ ЧЕЛОВЕКА В БАКТЕРИАЛЬНЫХ СИСТЕМАХ ЭКСПРЕССИИ

Проблематика. Цитокины обеспечивают связь между клетками и играют важную роль в модуляции врожденного и адаптивного иммунного ответа. Будучи медиаторами, они активны в очень небольших количествах и влияют на множество биологических процессов: эмбриональное развитие, неспецифический и специфический иммунный ответ, изменения когнитивных функций и тому подобное. Для получения препаратов цитокинов обычно используют рекомбинантные микроорганизмы. Перспективы терапевтического применения рекомбинантных цитокинов обуславливают актуальность создания новых и совершенствования существующих технологий их биосинтеза, выделения и очистки.

Цель. Анализ и сравнение биотехнологических подходов к получению рекомбинантных цитокинов человека, на основе современных литературных данных, и определение перспективных путей повышения эффективности технологий их получения.

Методика реализации. Анализ и систематизация современных научных работ, посвященных производству рекомбинантных цитокинов, с определением особенностей протекания процесса их биосинтеза и сравнительная характеристика различных продуцентов.

Результаты. Чаще всего для получения рекомбинантных цитокинов используют системы экспрессии на основе бактерий *Escherichia coli*, поскольку они лучше исследованы, позволяют обеспечить высокий выход целевого продукта. Их биосинтез обычно осуществляется способом периодической ферментации с подпиткой, а в состав питательной среды можно добавлять стимуляторы биосинтеза различного происхождения. Бактериальные продуценты имеют ряд недостатков: накопление целевого белка чаще всего происходит в форме телец-включений и актуальным остается вопрос контаминации таких препаратов бактериальными эндотоксинами. Для нивелирования данных недостатков прибегают к оптимизации процедур выделения и очистки рекомбинантных белков.

Выводы. Одним из перспективных направлений современных исследований по производству рекомбинантных цитокинов являются разнообразные технологии получения целевого белка в растворимом виде. Однако сложность данной задачи заключается в отсутствии возможности создания универсального метода и в необходимости индивидуального подхода в зависимости от продуцента и конечного продукта. Также перспективными являются исследования по увеличению выхода целевого белка путем изменения условий культивирования и состава питательной среды, устранения заражения ее эндотоксинами и поиска альтернативных бактериальных систем экспрессии.

Ключевые слова: цитокины; бактериальные продуценты; бактериальные системы экспрессии; рекомбинантные белки; биосинтез.

T.O. Natochii, V.V. Motronenko

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES TO OBTAINING RECOMBINANT HUMAN CYTOKINES IN BACTERIAL EXPRESSING SYSTEMS

Background. Cytokines provide a link between cells and play an important role in the innate and adaptive immune response modulation. As mediators, they are active in very small amounts and effect many biological processes: embryonic development, nonspecific and specific immune responses, changes in cognitive function, to name a few. Recombinant microorganisms are commonly used to produce cytokine preparations. Perspectives of therapeutic use of recombinant cytokines make it urgent to create new and improve existing technologies for their biosynthesis, isolation and purification.

Objective. The purpose of the paper is analysis and comparison of biotechnological approaches for the production of human recombinant cytokines, based on current literature, and identifying promising ways to improve the efficiency of their production technologies.

Methods. The analysis and systematization of modern scientific works devoted to the production of recombinant cytokines with determination of peculiarities of the course of their biosynthesis process and to carry out comparative characteristics of different producers.

Results. Most often, to obtain recombinant cytokines, *Escherichia coli* based expression systems are used, as they are the best-studied to allow high yield of the target product. Their biosynthesis, as a rule, is carried out by a method of periodic fermentation with nutrition, and to the composition of the nutrient medium can be added stimulants of biosynthesis of different origin. Bacterial producers have several disadvantages: the accumulation of the target protein is most often in the form of Taurus inclusions, and the question remains of contamination of such drugs with bacterial endotoxins. To negate these drawbacks, they resort to optimizing the procedures for isolating and purifying recombinant proteins.

Conclusions. One of the promising areas of current research on the production of recombinant cytokines is the various technologies for obtaining the target protein in soluble form. However, the complexity of this task lies in the lack of the ability to create a universal method and requires an individual approach, depending on the producer and the final product. Also promising are studies to increase the yield of the target protein by changing the culture conditions and composition of the nutrient medium, eliminating endotoxin infection, and finding alternative bacterial expression systems.

Keywords: cytokines; bacterial producers; bacterial expression systems; recombinant proteins; biosynthesis.