



УДК 577.112.088.3

## ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕТОД ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО $\alpha$ -ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА

© 1996 г. Р. В. Тихонов, С. А. Якимов, В. Г. Коробко, А. Н. Вульфсон<sup>#</sup>

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 25.07.95 г.

Разработан эффективный и технологичный метод выделения из биомассы *E. coli* и очистки рекомбинантного  $\alpha$ -фактора некроза опухолей человека. Метод включает мембранную микрофильтрацию, две стадии ионообменной хроматографии с последующей гель-фильтрацией на сефадексе G-25 и позволяет получать высокоактивный рекомбинантный белок с чистотой >95% (по данным SDS-электрофореза и ВЭЖХ) с общим выходом около 50%.

*Ключевые слова:* рекомбинантный  $\alpha$ -фактор некроза опухолей человека, хроматография.

$\alpha$ -Фактор некроза опухолей ( $\alpha$ -ФНО) – белок с молекулярной массой ~17 кДа, продуцируемый моноцитами и макрофагами в ответ на их активацию липополисахаридом при бактериальной инфекции [1] (биологически активен в виде тримера массой 51 кДа). Большой интерес к этому цитокину определяется его цитотоксической активностью *in vitro* по отношению к опухолевым клеточным линиям, а также способностью вызывать геморрагический некроз некоторых опухолей *in vivo*. Хотя биологическая роль  $\alpha$ -ФНО все еще не выяснена полностью, этот белок, несомненно, играет важную роль в формировании иммунного ответа организма. Следует отметить, что широкое клиническое изучение  $\alpha$ -ФНО сдерживается из-за его высокой токсичности для организма в концентрациях выше 500 ед. акт. на 1 мл крови [2]. Один из подходов к преодолению этой проблемы заключается в получении методами белковой инженерии мутантных форм  $\alpha$ -ФНО, обладающих меньшей токсичностью для организма, создании штаммов-продуцентов *E. coli* таких мутантов и разработке методов выделения мутантных белков в количествах, необходимых для изучения их биологических свойств.

В настоящее время для выделения  $\alpha$ -ФНО из бактериальной массы используется многостадийная схема очистки, включающая адсорбционную, ионообменную и эксклюзионную хроматографию [3–5]. При этом суммарный выход белка не превышает 20%. Недавно была опубликована работа [6], в которой описан простой метод выделения  $\alpha$ -ФНО с использованием хроматографии на гид-

роксияпатите, относительно дорогим и неустойчивым сорбенте, с последующей доочисткой методом ВЭЖХ. При этом выход очищенного белка, по оценке авторов, составил около 12–15% [6].

В связи с вышеизложенным представлялось целесообразным применить для выделения  $\alpha$ -ФНО относительно дешевые отечественные ионообменные сорбенты. В качестве источника фактора некроза опухолей использовали сконструированный в ИБХ РАН штамм *E. coli* SG20050, содержащий рекомбинантную плазмиду pTNF31 $\Delta$  с искусственным геном, кодирующим мутантный  $\alpha$ -ФНО без двух N-концевых аминокислотных остатков [7].

Биосинтез  $\alpha$ -ФНО в клетках *E. coli* SG20050, детерминированный плазмидой pTNF31 $\Delta$ , приводил к накоплению рекомбинантного белка, растворенного в цитоплазме, что обусловило некоторые особенности его выделения (рис. 1, 1). Для получения обогащенного раствора  $\alpha$ -ФНО дезинтеграт после разрушения клеток ультразвуком подвергли микрофильтрации на мембранах с диаметром пор 0.2 мкм для отделения нерастворимого клеточного дебриса. Получили микрофильтрат, содержащий  $\alpha$ -ФНО (рис. 1, 2) и другие компоненты клеточной цитоплазмы. Обогащение микрофильтрата целевым белком обусловлено, по-видимому, удалением не прошедших через поры фильтра белков, связанных с клеточными мембранами.

Дальнейшая очистка  $\alpha$ -ФНО проводилась с использованием ионообменной хроматографии. При этом необходима очистка микрофильтрата от примесей небелковой природы, загрязняющих и снижающих емкость ионообменной колонки.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

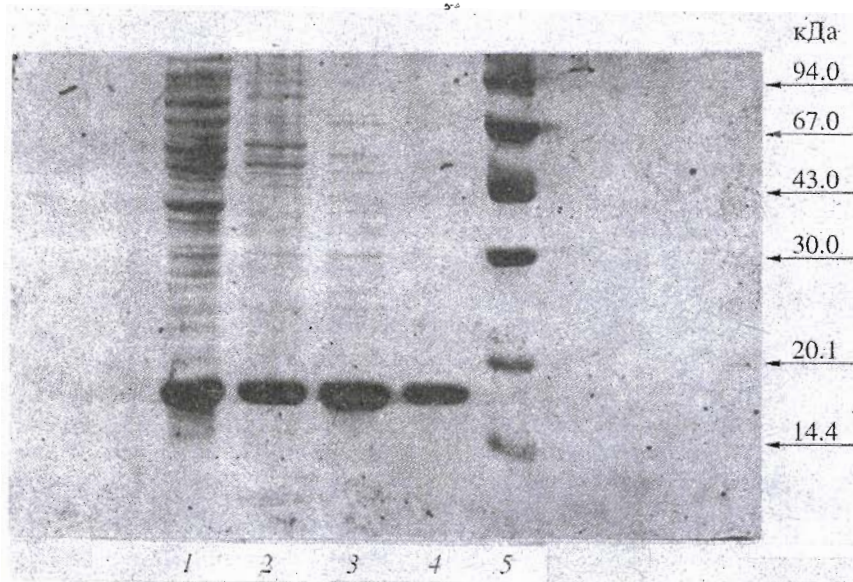


Рис. 1. Гель-электрофореграмма образцов  $\alpha$ -ФНО на различных стадиях выделения (в скобках – содержание  $\alpha$ -ФНО, %): 1 – биомасса клеток *E. coli* (24); 2 – микрофильтрат дезинтеграта  $\alpha$ -ФНО (30); 3 – объединенная фракция  $\alpha$ -ФНО после анионообменной хроматографии (65); 4 – объединенная фракция  $\alpha$ -ФНО после катионообменной хроматографии (98); 5 – белки-маркеры.

Для этой цели был использован инертный носитель Н- $\gamma$ -гель, удерживающий эти примеси и не сорбирующий белок.

Очищенный таким образом микрофильтрат хроматографировали на колонке с QAE- $\gamma$ -гелем.

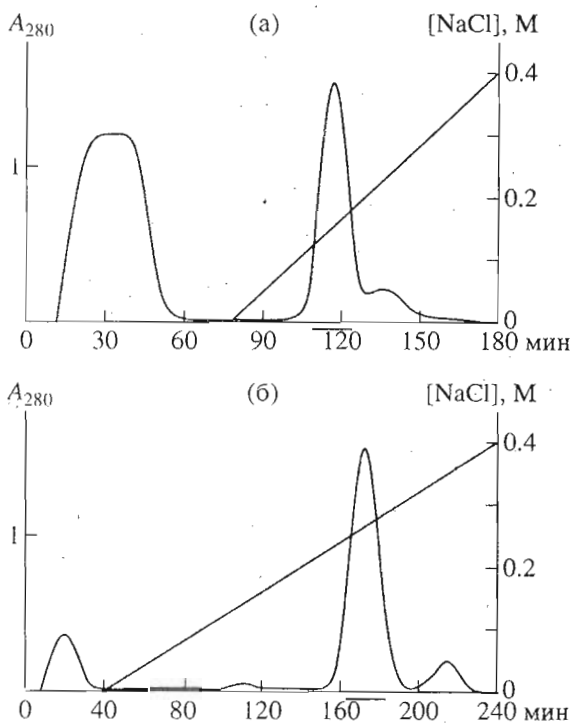


Рис. 2. Хроматографическое выделение  $\alpha$ -ФНО на QAE- $\gamma$ -геле (а, отмечена выделяемая фракция) с последующей хроматографией на Р- $\gamma$ -геле (б). Условия см. "Экспер. часть".

$\alpha$ -ФНО элюировался с колонки при концентрации NaCl от 0.12 до 0.2 М (рис. 2а). Чистоту препарата оценивали с помощью SDS-электрофореза (рис. 1, 3). Чистота фракции  $\alpha$ -ФНО составила 65%.

Заключительную стадию очистки  $\alpha$ -ФНО провели с использованием катионообменной хроматографии на колонке с Р- $\gamma$ -гелем.  $\alpha$ -ФНО элюировался с колонки при концентрации NaCl от 0.25 до 0.3 М (рис. 2б). Чистота препарата, по данным SDS-электрофореза (рис. 1, 4) и ВЭЖХ (рис. 3а), составила > 98%.

Полученный препарат переводили в буферный раствор Б (см. "Экспер. часть"), стерильно фильтровали и хранили в том же буферном растворе при 4°C. Через 2 месяца при указанных условиях хранения изменений биологической активности  $\alpha$ -ФНО не наблюдалось.

Результаты очистки  $\alpha$ -ФНО приведены в таблице. Предлагаемый метод выделения позволил получить  $\alpha$ -ФНО высокой чистоты с выходом 47–56%. По данным SDS-электрофореза, молекулярная масса  $\alpha$ -ФНО составляет 17 кДа (вычисленное значение – 16921.58 Да). Полученный белок  $\alpha$ -ФНО охарактеризован спектрально. Спектр КД (рис. 3б) полностью совпал со спектром, известным из литературы [8]. Результаты 12 шагов N-концевого анализа  $\alpha$ -ФНО согласуются с известной аминокислотной последовательностью этого белка [3]:

3  
Ser-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-10

Биологическая активность, определенная в цитотоксическом тесте на линии клеток WENI, составила  $2 \times 10^7$  ед./мг.

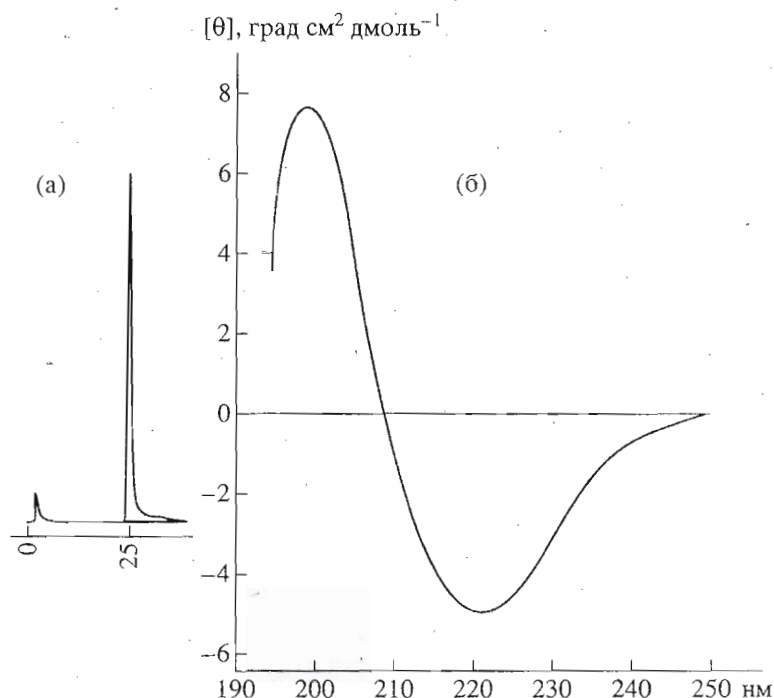


Рис. 3. Характеристики конечного продукта  $\alpha$ -ФНО. (а) – аналитическая ВЭЖХ (50 мкг) на колонке Армсорб-Си-500-DEAE. Условия см. “Экспер. часть”; (б) – спектр КД  $\alpha$ -ФНО (0.9 мг/мл, 50 мМ трис-НСl, рН 7.5).

Таким образом, разработанный нами метод выделения и очистки рекомбинантного  $\alpha$ -ФНО из биомассы *E. coli* позволяет получать в препаративных количествах высокоочищенный, биологически активный препарат в течение короткого времени с использованием двух хроматографических стадий.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы: ацетат натрия (ос. ч.), ацетонитрил (ос. ч., для жидкостной хроматографии), гидроксид натрия (ч. д. а.), лимонная кислота (ос. ч.), соляная кислота (ч. д. а.), хлорид натрия (ч. д. а.) отечественного производства; додецилсульфат натрия (Serva, Германия), трис(гидрокси-

метил)аминометан (Gerbu, Германия), EDTA (Chemtam, Швеция), акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, персульфат аммония, TEMED, кумаси R-250 (Sigma, США); набор белков-стандартов для электрофореза и гель-фильтрации (Pharmacia, Швеция); вода, очищенная на установке Milli Q (Millipore, США); отечественные хроматографические сорбенты (ВНИИОЧБ, Санкт-Петербург; совместные разработки с ИБХ РАН) Р- $\gamma$ -гель, QAE- $\gamma$ -гель, Н- $\gamma$ -гель; сефадекс G-25 Superfine (Pharmacia, Швеция).

Биомасса штамма *E. coli* SG20050 рTNF31 $\Delta$  выращена в группе ферментации лаборатории биотехнологии с комплексной опытной установкой (КОУ) ИБХ РАН.

### Выделение и очистка $\alpha$ -ФНО

Стадия	Суммарный белок, мг	$\alpha$ -ФНО		Очистка, раз	Выход, % от исходного $\alpha$ -ФНО
		по данным SDS-электрофореза, %	мг		
Дезинтеграция биомассы	1125	24	270	1.00	100
Микрофильтрация дезинтеграта	875	30	262	1.25	97
Очистка на Н- $\gamma$ -геле и хроматография на QAE- $\gamma$ -геле	340	65	221	2.17	82
Хроматография на Р- $\gamma$ -геле	143	>98	140	1.51	52
Гель-фильтрация	130	>98	127	1.00	47

Использовали буферные растворы: 50 мМ трис-НСl (рН 7.5), 2 мМ EDTA (А); 50 мМ трис-НСl, рН 7.5 (Б); 30 мМ лимонная кислота, рН 5.0 (В); 0.1 М гидроксид натрия, 1 М хлорид натрия (Г).

**Выделение  $\alpha$ -ФНО.** Отделенные центрифугированием из 1 л культуральной жидкости и промытые буферным раствором А клетки биомассы *E. coli* (14 г) с содержанием  $\alpha$ -ФНО 24% от суммарного клеточного белка (по данным SDS-электрофореза) суспендировали в 100 мл буферного раствора А, помещали в лед и разрушали клетки с помощью ультразвукового дезинтегратора Sonifier 250 (Branson, США) при амплитуде 60% шкалы прибора. Обработку клеток ультразвуком проводили 4 раза по 5 мин с перерывами по 2 мин так, чтобы температура взвеси не превышала 50°C. Дезинтеграт подвергали микрофилтрации на установке Minitan (Millipore, США) на кассетах GVLP с диаметром пор мембран 0.2 мкм со скоростью 10 мл/мин. Для более полного извлечения белка суспензию промывали буферным раствором А в количестве 4–5 внутренних объемов микрофилтрационной установки. Мембраны регенерировали 0.1% раствором додецилсульфата натрия в течение 30 мин.

Микрофилтрат разбавляли дистиллированной водой так, чтобы удельная электропроводность раствора составляла  $2.0 \pm 0.1$  мкСм/см, и пропускали через колонку (2.5 × 10 см) с Н- $\gamma$ -гелем, последовательно соединенную с колонкой (2.5 × 15 см) с QAE- $\gamma$ -гелем. Обе колонки перед использованием промывали буферным раствором Г по 150 и 200 мл соответственно и уравнивали буферным раствором Б (5 мл/мин). Колонки промывали 100 мл буферного раствора Б, затем колонку с Н- $\gamma$ -гелем отключали и элюировали  $\alpha$ -ФНО с колонки с QAE- $\gamma$ -гелем в линейном градиенте концентрации NaCl (0–0.4 М) в буферном растворе Б (общий объем 500 мл). Фракции, содержащие  $\alpha$ -ФНО чистотой не менее 65% по данным SDS-электрофореза, объединяли, разбавляли дистиллированной водой в 2 раза; рН объединенной фракции доводили до 5.0 с помощью 1 М HCl. После этого ее наносили на колонку (1.5 × 15 см) с Р- $\gamma$ -гелем, промытую 120 мл буферного раствора Г и уравнированную буферным раствором В (2 мл/мин). Элюцию проводили в линейном градиенте концентрации NaCl (0–0.4 М) в буферном растворе В (общий объем 400 мл). Собирали фракции, содержащие  $\alpha$ -ФНО чистотой не менее 98% по данным SDS-электрофореза и ВЭЖХ, и объединяли их. Объединенную фракцию переводили в буферный раствор Б, используя гель-филтрацию на колонке (2.5 × 80 см) с сефадексом G-25 Superfine, предварительно уравнированной буферным раствором Б (2 мл/мин). Полученный раствор  $\alpha$ -ФНО фильтровали в сте-

рильных условиях через фильтр FP 030/3 (Schleicher und Schuell, Германия) с диаметром пор 0.2 мкм и хранили при 4°C.

**ВЭЖХ** осуществляли с помощью прибора фирмы Beckman (США), состоящего из двух насосов 110В, инжектора 210А, контроллера градиента 406, УФ-детектора 160 и интегратора 740 (Waters, США). Использовали колонки (4 × 150 мм) Армсорб-Си-500-DEAE (совместная разработка "Армхром", Ереван, и ИБХ РАН). Элюцию проводили в градиенте концентрации ацетата натрия 0.01–0.16 М за 40 мин в присутствии 10% CH<sub>3</sub>CN (рН 7.1). Скорость потока 0.8 мл/мин.

**Электрофорез** выполняли по методу Лэммли [9] в пластинах (6.0 × 8.5 × 0.08 см) 12.5% ПААГ в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия с нагрузкой 10 мкг белка на дорожку. Содержание  $\alpha$ -ФНО в различных препаратах определяли в гелях, окрашенных кумасси R-250, сканированием на денситометре Ultrosan XL (Pharmacia, Швеция).

Концентрации белка в растворах определяли по методу Брэдфорда [10].

Анализ N-концевой аминокислотной последовательности был выполнен в Учебно-научном центре ИБХ РАН на автоматическом секвенаторе фирмы Applied Biosystems 900A/470A (США), спектр КД получен в лаборатории спектрального анализа ИБХ РАН на приборе фирмы Jasco 600С (Япония).

Авторы выражают благодарность Т.И. Костроминой за наработку биомассы  $\alpha$ -ФНО, Е.Е. Поляковой и И.П. Юнда за участие в экспериментах, Н.А. Лукьяновой (лаборатория биотехнологии с КОУ ИБХ РАН) за помощь в проведении гель-электрофореза, И.А. Куделиной (лаборатория спектрального анализа ИБХ РАН) за получение спектра КД, Т.А. Богдановой (УНЦ ИБХ РАН) за определение N-концевой аминокислотной последовательности  $\alpha$ -ФНО, Р.Л. Турецкой (ИМБ РАН) за определение цитотоксической активности препаратов  $\alpha$ -ФНО.

Работа проведена в рамках Государственной научно-технической программы "Новейшие методы биоинженерии" по направлению "Технология получения продуктов генной, клеточной инженерии и синтетических пептидных препаратов".

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мисуно Н.И., Осипович О.А. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1991. С. 287.
2. Дранник Г.Н., Гриневиц Ю.А., Дизик Г.М. Иммунотропные препараты. Киев: Здоровье, 1994.
3. Ikehara M., Fujimoto K. // Chem. Pharm. Bull. 1988. V. 36. P. 291.

4. Ichikawa Y., Sakugi T., Nakamura S. // Jpn. Kokai Tokyo Koho. 1988. JP 63 87, 996 [88 87, 996] (Cl. C12 P21/02).
5. Daum L., Doerper T. // Ger. Offen. 1990. DE 3, 843, 534 (Cl. C12 N15/70).
6. Paquet A., Levesque A., Page M. // J. Chromatogr. A. 1994. V. 667. P. 125–130.
7. Коробко В.Г., Добрынин В.Н., Болдырева Е.Ф., Быстров Н.С., Кравченко В.В., Филиппов С.А., Чувпило С.А., Недоспасов С.А., Шахов А.Н., Турецкая Р.Л. // Пат. РФ № 1438240. 1987.
8. Wingfield P., Pain R.H., Craig S. // FEBS Lett. 1987. V. 211. P. 179–184.
9. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680.
10. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248.

## Efficient Isolation Method for Human Recombinant Tumor Necrosis Factor $\alpha$

R. V. Tikhonov, S. A. Yakimov, V. G. Korobko, and A. N. Wulfson<sup>1</sup>

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia*

**Abstract**—An efficient and productive isolation method for human recombinant tumor necrosis factor  $\alpha$  from *Escherichia coli* cells was developed. The method includes a membrane filtration step, two steps of ion-exchange chromatography, and gel filtration on a Sephadex G-25 column. The target product was obtained with approximately 50% total yield and greater than 95% purity according to PAGE and HPLC.

*Key words:* human recombinant tumor necrosis factor  $\alpha$ , chromatography.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.