

УДК 573.6.086.83

СОЗДАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ МАССОЙ МЕНЕЕ 5 КДА В БАКТЕРИАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ

Мефодьева Н.А. (Университет ИТМО)

Научный руководитель – заведующий лабораторией разработки биопроцессов

Ищук С.А.

(ЗАО «Фарм-Холдинг»)

Введение. Экспрессия терапевтических пептидов в бактериальных системах, например, в кишечной палочке, имеет большое количество преимуществ, таких как высокая удельная продуктивность, низкая себестоимость производства, большой потенциал оптимизации, хорошая изученность процесса. Однако у данной системы имеется ряд ограничений, таких как отсутствие посттрансляционных модификаций, невозможность правильного формирования третичной структуры, большие трудности с экспрессией белков более 60 кДа и менее 5 кДа. Одной из актуальных задач современной биотехнологии является создание подходов позволяющих обойти эти ограничения, при этом сохранив все преимущества бактериальной экспрессии [1].

Основная часть. Ввиду сложности и трудоемкости создания штаммов бактерий, экспрессирующих терапевтические пептиды молекулярной массой менее 5 кДа, проводят экспрессию пептида в виде tandemных повторов или в виде гибридного белка, слитого с другим крупным белком, например, SUMO. Использование tandemных повторов может быть проблематично при последующем рефолдинге из-за высокой склонности таких белков к агрегации и сложности очистки после ферментативного гидролиза ввиду большого количества близкородственных примесей.

В ходе работы необходимо было получить 4 пептидных антигена с молекулярной массой 2.9, 2.7, 2.6 и 3.8 кДа. Было принято решение использовать технологию SUMO-слитого белка в качестве платформенной, то есть одинаковой для получения всех пептидов. Минусами такой технологии могли стать низкий выход целевого продукта из-за использования унифицированного подхода и отсутствия оптимизации под каждый конкретный продукт. Для получения генетических конструкций использовали рестрикционно-лигазный метод клонирования. Для экспрессии целевых белков был выбран штамм-хозяин BL21. Культивирование штаммов-продуцентов проводили в биореакторах Biostat В. Дезинтеграцию клеточной биомассы проводили с помощью гомогенизатора высокого давления. Целевые гибридные белки были выделены из бактериальных клеток, очищены с помощью трехстадийной хроматографической очистки, включающей металлаффинную хроматографию с использованием Ni-NTA агарозы, ферментативный гидролиз высокоспецифичной SUMO-протеазой собственного производства, последующую металлаффинную хроматографию уже целевых пептидных антигенов и финальную очистку высокоэффективной жидкостной хроматографией на сорбенте SP-100-C8-РК. После этого пептиды были лиофильно высушены. Масса всех гибридных белков и пептидов была подтверждена с помощью ВЭЖХ-МС, подлинность пептидных антигенов дополнительно подтверждалась специфическим ИФА-набором. Полученные пептиды имели чистоту более 95% по ОФ-ВЭЖХ. Данная схема позволяет получать продукт высокой чистоты пригодный для использования в терапевтических целях.

Выводы. Создана модульная платформа получения, последующего выделения и очистки терапевтических пептидов с различными физико-химическими свойствами и различной молекулярной массой, при сохранении всех преимуществ бактериальной системы экспрессии. Преимущества данной технологии в ее универсальности и масштабируемости.

Список использованных источников:

1. Mo Q, Fu A, Lin Z, Wang W, Gong L, Li W. Expression and purification of antimicrobial peptide AP 2 using SUMO fusion partner technology in Escherichia coli // Letters in applied microbiology. – 2018. – Vol. 67(6). – P. 606-613.

Мефодьева Н.А. (автор)

Подпись

Ищук С.А. (научный руководитель)

Подпись