ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ, 2023, том 59, № 4, с. 383–391

УДК 577.112.083

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА РОСТА ТРОМБОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА rhPDGF-BB, ПОЛУЧЕННОГО В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *Pichia pastoris*

© 2023 г. А.-А. В. Мистерова[1], *, В. А. Чичерин[1], А. С. Герасимов[1]

[1]Вятский государственный университет, Киров, 610000 Россия

**e-mail: usr21438@vyatsu.ru*

Поступила в редакцию 17.02.2023 г.
После доработки 28.02.2023 г.
Принята к публикации 01.03.2023 г.

Рекомбинантный тромбоцитарный фактор роста человека rhPDGF-BB является одним из важнейших цитокинов, одобренных для медицинского использования. Препарат, известный под международным непатентованным названием “бекаплермин”, доказал свою эффективность при лечении нейропатических язв, ожогов и травм периодонта (в сочетании с остеокондуктивной матрицей). В исследовании проанализированы способы выделения и очистки rhPDGF-BB и предложена оптимизированная методика, позволяющая получать высокоочищенный rhPDGF-BB из культуральной жидкости метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* – продуцента rhPDGF-BB. Предложен простой и быстрый метод хроматографической очистки, позволяющий получать rhPDGF-BB чистотой >98% согласно электрофорезу в ПААГ, с содержанием хозяйских белков (HCP) 33 ± 4 нг/мг белка. Эффективная концентрация пролиферативной активности выделенного по оптимизированной методике rhPDGF-BB составляла 5.02 ± 2.64 нг/мл, что сопоставимо с коммерчески доступными аналогами. Разработанная методика может быть использована для получения в промышленности.

Ключевые слова: фактор роста тромбоцитов человека, ростовые факторы, *Pichia pastoris*, синдром диабетической стопы, рекомбинантные белки

DOI: 10.31857/S0555109923040098, **EDN:** QZLWNT

Регенеративная медицина считается одним из передовых фронтов развития наук о жизни. Важнейшую роль в ней играет применение ростовых факторов – цитокинов, способствующих пролиферации и дифференцировке различных клеток организма. Фактор роста тромбоцитов PDGF-BB человека входит в большое семейство тромбоцитарных ростовых факторов и является важнейшим универсальным цитокином, обладающим мощным пролиферативным действием на многие клетки человеческого организма – фибробласты, остеоциты, эндотелий кровеносных сосудов и др. [1].

PDGF-BB является единственной одобренной молекулой из семейства PDGF (факторы роста тромбоцитов человека, platelet-derived growth factors) для применения в медицинских целях [2]; его свойства были охарактеризованы как на молекулярном, так и на клеточном уровне, а также в модельных системах *in vivo*. Это делает PDGF-BB привлекательным для разработки средств регенеративной медицины: в их числе препарат Regranex, одобренный FDA (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) для лечения синдрома диабетической стопы [3], комбинированный препарат GEM21S для челюстно-лицевой имплантации [4]. Описано применение PDGF-BB в хирургии и для трансплантации тканей опорно-двигательного аппарата [5]. Более того, комплекс ростовых факторов, включающий в себя рекомбинантный PDGF-BB, может быть более безопасной альтернативой фетальным сывороткам, используемым для культивирования стволовых клеток *ex vivo* при разработке клеточных продуктов и проведении доклинических исследований [6]. Таким образом, к рекомбинантному PDGF-BB человека (rhPDGF-BB) проявляется большой интерес. При этом, ни один из известных препаратов на основе rhPDGF-BB не зарегистрирован в России, из чего можно сделать вывод о том, что регенеративные продукты на основе rhPDGF-BB недоступны для российских пациентов.

Ввиду того, что молекула PDGF-BB представляет собой гомодимерный гликопротеин сложной структуры, имеющий массу 25 кДа и 8 дисульфидных связей [7], для получения его рекомбинантного аналога рационально использовать клетки дрожжей, таких как *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia*

Рис. 1. Примеры основных методов выделения и очистки rhPDGF-BB, предложенных в литературе, начиная с 1988 г. *1* – [1], *2* – [2], *3* – [3].

pastoris. При этом низкий выход rhPDGF-BB в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* подразумевает высокие производственные затраты [8]. В вопросах выделения и очистки rhPDGF-BB мнения расходятся. Ниже приведены несколько предложенных в литературе вариантов схем выделения и очистки (рис. 1), при этом вариант Кунитани с соавт. [9] является запатентованным способом очистки rhPDGF-BB с целью получения лекарственных средств для регенеративной медицины.

Согласно современной концепции “Quality by Design”, использование методов хроматографической очистки в логической последовательности увеличивает эффективность очистки, при этом снижая число необходимых этапов очистки и производственные расходы. Комбинируя ортогональные хроматографические методики, возможно добиться эффективного удаления различных типов примесей на каждой стадии, и достижения чистоты полученной субстанции, удовлетворяющей высоким требованиям безопасности и эффективности. Если рассматривать эти факторы еще на стадии разработки технологии, то возможно получить гораздо более устойчивый, контролируемый процесс, обеспечивающий высокие выходы продукта.

Известно, что стадии гель-фильтрации и гидрофобной хроматографии являются одними из наиболее трудоемких и длительных методов хроматографической очистки, а метод диализа практически не адаптируется под промышленные нужды ввиду его длительности и необходимости использования больших объемов буферных растворов. Таким образом, существует реальный потенциал для оптимизации методики получения rhPDGF-BB из культуральной жидкости дрожжевых продуцентов. Более простая схема выделения и очистки может стать основой оптимального технологического решения для возможного промышленного производства rhPDGF-BB в России.

Цель работы – оптимизировать методику выделения и очистки из культуральной жидкости *P. pastoris* для получения rhPDGF-BB высокого качества.

МЕТОДИКА

Для всех экспериментов использовались реактивы высокого качества марки “Для анализа” (“Sigma-Aldrich”, США), если не указано иное. Для целей генной инженерии использовались ферменты производства “Thermo Fisher Scientific” (США).

Получение продуцента rhPDGF-BB. Продуцент *P. pastoris* штамм *X33* (“Invitrogen”, США), экспрессирующий рекомбинантный ген hPDGF-B (GenBank ID: 5155) человека под промотором AOX*1,* был получен с использованием экспрессионного вектора pVR2Xba, который является аналогом коммерческого вектора pPICZα (“Invitrogen”, США) и содержит ген устойчивости к зеоцину. Вектор любезно предоставлен А.С. Герасимовым. Ген hPDGF-B (кДНК) получали методом кросс-ПЦР в 2 стадии из синтетических олигонуклеотидов (синтезирован в ЗАО “Евроген”, Россия). Полученный ПЦР-продукт клонировали в экспрессионный вектор pVR2Xba при помощи Т4 ДНК-лигазы по сайтам *Xho1*/*Xba1*. Клетки *P. pastoris X33* трансформировали полученным экспрессионным вектором методом электропорации [10]. Отбор трансформантов проводился на плотной питательной среде YPD (пептон – 2%, дрожжевой экстракт – 1%, глюкоза – 2%, агар – 1.5%, “Becton Dickinson”, США), содержащей 100 мкг/мл селективного агента зеоцина. Культура *P. pastoris* продуцента rhPDGF-BB депонирована в коллекции микроорганизмов кафедры биотехнологии Вятского государственного университета.

ПЦР-скрининг. Наличие вставки целевого гена в дрожжевых клетках определяли методом ПЦР-скрининга (размер целевого ПЦР-продукта 1000 п.о.), используя праймеры на промотор (5'-GACTGAAAATCAATTGAC-3') и на целевой ген (3'-TTCGCATTTGCACGCCAGG-5'). Определение "дозы гена" проводили одновременным посевом каждого клона на плотную среду YPD, с концентрациями зеоцина 100, 500, 1200 и 2500 мкг/мл.

Анализ уровня экспрессии целевого гена hPDGF-B. Уровень экспрессии целевого гена анализировали только у высококопийных трансформантов. Отобранные клоны выращивали в 10 мл жидкой питательной среды BMGY (дрожжевой экстракт – 1%, бакто-пептон – 2%, глицерин – 1%, YNB – 1.34%, 100 мМ калий-фосфатного буфер, pH 6.5; 1 : 1000 раствор микроэлементов PTM1 ("Pichia fermentation process guidelines", Invitrogen, 2002) в пластиковых пробирках объемом 50 мл в течение 48 ч. Клетки собирали центрифугированием (5 мин, 1500×g, 20°C) и суспендировали в 1.5 мл индукционной среды BMMY (дрожжевой экстракт – 1%, бакто-пептон – 2%, метанол – 1%, YNB – 1.34%, 100 мМ калий-фосфатного буфера, pH 5.8; 1 : 1000 раствор микроэлементов PTM1). Культивирование проводили в планшетах "System Duetz" ("Kuhner AG", Швейцария) при тех же условиях в течение 72 ч, добавляя 1% метанола каждые 12 ч. Культуральную жидкость отделяли от биомассы дрожжей центрифугированием (10 мин, 7000×g, 4°C) и анализировали содержание rhPDGF-BB методом электрофореза по Лэммли в 14%-ном ПААГ в невосстанавливающих условиях.

Биосинтез rhPDGF-BB. Продуцент выращивали в шейкере-инкубаторе "Kuhner ISFX-1" ("Kuhner AG", Швейцария). 3 мл суспензии с OD_{600} ≈ 2–6 о.е. инокулировали в 400 мл среды BMGY (дрожжевой экстракт – 1%, бакто-пептон – 2%, глицерин – 3%, YNB – 1.34%, 100 мМ калий-фосфатного буфера, pH 6.5; биотин – 50 мкг/мл, 1 : 1000 раствор микроэлементов PTM1) и выращивали в колбах объемом 2 л до OD_{600} ≈ 10–15 о.е. Через 48 ч клетки собирали центрифугированием (5 мин, 1500×g, 20°C) и суспендировали по 30 о.е. в 150 мл индукционной среды BMMY (дрожжевой экстракт – 1% (фракция <10 кДа), бакто-пептон – 2%, метанол – 1%, сорбитол – 0.5%; YNB – 1.34%, 120 мМ калий-фосфатного буфера, pH 5.8; биотин – 50 мкг/мл, 1 : 1000 раствор микроэлементов PTM1). Культивировали в колбах на 1 л в тех же условиях в течение 72 ч, добавляя 3% метанола каждые 12 ч. Далее культуральную жидкость отделяли от биомассы дрожжей центрифугированием (10 мин., 7000×g, 4°C), добавляли до 0.5 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF) и до 1 мМ ЭДТА, инкубировали в течение 15 мин с перемешиванием, образовавшийся преципитат удаляли центрифугированием при 12000×g, 4°C, 20 мин. Полученную культуральную жидкость анализировали на содержание rhPDGF-BB методом электрофореза (по Лэммли) в 14%-ном ПААГ в невосстанавливающих условиях и использовали для дальнейших экспериментов.

Определение концентрации биомассы проводили измерением значения OD_{600} в 96-луночном планшете в 3 повторах с использованием планшетного ридера "CLARIOstar" ("BMG Labtech", Германия).

Тангенциальная фильтрация. Тангенциальная фильтрация проводилась с использованием установки "AKTA Flux" и холофайберового картриджа UFP-10-C-4X2MA с площадью мембраны 1400 $см^2$ и порогом отсечения 10 кДа ("Cytiva Life Sciences", Швеция). Осветленную культуральную жидкость разбавляли водой I типа в 2.5 раза и проводили концентрирование при постоянном трансмембранном давлении (ТМД) 0.4 бар. Полученный концентрат имел кондуктивность 20–24 мСм/см.

Для проведения катионообменной хроматографии были использованы следующие буферные растворы: буфер А (50 мМ ацетат натрия, 200 мМ хлорид натрия, pH 4.2), буфер В (50 мМ ацетат натрия, 1 М хлорид натрия, pH 4.2), буфер С – 50 мМ натрий-фосфатный, pH 7.0.

Подбор сорбента для стадии capture. Первоначальный подбор сорбентов осуществлялся методом "хроматографии в объеме" в формате высокопроизводительного скрининга. Для скрининга были отобраны сорбенты: CM Sepharose Fast Flow, SP Sepharose Fast Flow, Capto S, Source 30S ("Cytiva Life Sciences", Швеция), Toyopearl GigaCap S 650-S, Toyopearl GigaCap CM 650-M ("Tosoh Bioscience", Япония) в объеме 100 мкл в пробирках объемом 2 мл. После промывки водой I типа добавляли 1 мл стартового буфера А и уравновешивали 30 мин при перемешивании на платформе. Подготовленную культуральную жидкость, содержащую rhPDGF-BB, сконцентрировали на центрифужных кассетах "Amicon Ultra-15 10K" ("Merck-Millipore", США). Фактор концентрации – 10×. В пробирки добавили по 1 мл концентрата культуральной жидкости и инкубировали с сорбентом в течение ночи. На следующий день собрали культуральную жидкость из пробирок с сорбентом в отдельные пробирки, сорбенты промыли 1 мл стартового буферного раствора 2 раза по 500 мкл. Для определения профиля элюции добавляли к сорбенту поочередно 3 раза по 100 мкл буферного раствора, содержащего 300 мМ NaCl, инкубировали на качающейся платформе 10 мин, осаждали сорбент в мини-центрифуге в указанном выше режиме. Три фракции элюции объединяли в один образец объемом 300 мкл. Таким же образом проводили элюцию буферными растворами с 450, 550

и 700 мМ NaCl. После завершающей элюции к сорбенту добавляли 1 мл буферного раствора В, инкубировали на качающейся платформе в течение 1 ч для удаления связанных с сорбентом примесей. Полученные фракции (фракция белков, не связавшихся с сорбентом; фракции, элюированные 300, 450, 550, 700 мМ NaCl; фракция отмывки буфером В) анализировали электрофоретическим методом как указано выше. Количественная оценка проводилась построением денситограмм с помощью ПО ImageJ (Сайт программы https://imagej.nih.gov/ij/). Все значения нормировались по полосе контрольного образца очищенного rhPDGF-BB, а затем высчитывали процент от суммарной площади пиков денситограммы для одного сорбента, по полученным значениям строились графики элюции для всех сорбентов с помощью ПО Magic Plot Pro 3.0 ("Magicplot Systems", Россия).

Хроматография в проточном режиме. Хроматографию в проточном режиме выполняли вручную в проточных колонках "PD-10" с внутренним диаметром 15 мм ("Cytiva Life Sciences", Швеция). По 0.5 мл отобранного сорбента уравновешивали 10 объемами буферного раствора А и наносили по 50 мл подготовленной культуральной жидкости, фракцию несвязавшихся белков собирали. После нанесения образца промывали 10 объемами буферного раствора А и проводили ступенчатую элюцию 3 объемами буферных растворов с содержанием хлорида натрия 400, 600 и 800 мМ, фракции собирали. После элюции промывали сорбент 10 объемами буфера В для удаления связанных примесей. Анализ полученных данных проводили аналогично предыдущему эксперименту.

Хроматография в динамическом режиме выполнялась с использованием "AKTA Pure 25" и колонки XK 16/10 ("Cytiva Life Sciences", Швеция) при объеме сорбента Toyopearl GigaCap CM 650-M 5 мл и комнатной температуре. Концентрат культуральной жидкости наносили на уравновешенный буфером А сорбент со скоростью 2 мл/мин, промывали стартовым буфером и элюировали градиентом концентрации NaCl от 200 до 1000 мМ за 10 объемов. В параллельном эксперименте проводили дополнительную отмывку буфером С перед стадией элюции. Собранные фракции анализировали методом электрофореза как указано выше.

Анионообменная хроматография выполнялась в режиме "В проскок" с использованием хроматографа "AKTA Pure 25" и колонки HiTrap Q Sepharose HP объемом 1 мл (Cytiva Life Sciences, Швеция). Образец rhPDGF-BB предварительно перед нанесением разбавляли буфером С в 10 раз. Образец наносили на предварительно уравновешенный буфером С сорбент со скоростью 1.5 мл/мин, фракцию несвязавшихся белков собирали. Содержание rhPDGF-BB во фракции анализировали методом электрофореза в ПААГ (как указано выше), содержание хозяйских белков (HCP) во фракции анализировали методом сэндвич-ИФА, как описано ниже.

Определение содержания хозяйских белков (HCP). Для определения содержания HCP использовали 4 образца rhPDGF-BB, полученных после очистки: методом катионообменной хроматографии с использованием HiTrap Capto S 1 мл ("Cytiva Life Sciences", Швеция), методом аффинной хроматографии с использованием HiTrap Heparin Sepharose HP 1 мл ("Cytiva Life Sciences", Швеция), катионообменной хроматографии с использованием Toyopearl GigaCap CM 650-M 5 мл и анионообменной хроматографии в проскок на HiTrap Q Sepharose HP 1 мл. Для хроматографии на Capto S концентрат культуральной жидкости наносили на сорбент со скоростью 2 мл/мин, промывали буфером А и элюировали градиентом от 200 до 1000 мМ NaCl. Для хроматографии на Heparin Sepharose HP элюат со стадии Capto S (кондуктивность 45 мСм/см) наносили на колонку со скоростью 2 мл/мин. Сорбент после нанесения отмывали буферным раствором 50 мМ ацетата натрия, 0.1% Triton X-114, pH 5.0. Элюировали линейным градиентом от 400 до 1200 мМ NaCl. Определение содержания HCP в образцах очищенного rhPDGF-BB проводили методом сэндвич-ИФА с помощью набора "*Pichia pastoris* HCP ELISA Kit" (F140, "Cygnus Technologies", США) по "уточненному" протоколу производителя.

Определение пролиферативной активности. Пролиферативную активность полученного препарата rhPDGF-BB после очистки производили методом WST-1-теста (ab155902, "Abcam", США) по "уточненному" протоколу с использованием клеточной линий фибробластов мыши 3T3, в качестве отрицательного контроля – клеточной линии HEK293F. В 96-луночный планшет были высеяны клетки линии 3T3 и HEK293F плотностью 1.5×10^3 кл./лунку в питательной среде DMEM (2183101, "Sigma-Aldrich", США) с добавлением 10% фетальной сыворотки (F6765, "Sigma-Aldrich"). Клеточную линию инкубировали 6 ч, затем питательную среду заменили на DMEM с добавлением 0.5% фетальной сыворотки и инкубировали еще 24 ч. По истечении 24 ч заменили среду на DMEM с добавлением полученного rhPDGF-BB (раствор в 10 мМ уксусной кислоте) в концентрациях 0–250 нг/мл. Клетки инкубировали с ростовым фактором в течение 48 ч. После этого в каждую лунку добавляли по 10 мкл WST-1 реактива, инкубировали 4 ч, затем измеряли поглощение света при длинах волн 440 и 660 нм, как указано в методике производителя реактива. Пролиферативную активность оценивали построением кривых зависимости поглощения A440-A660 от десятичного логарифма концентрации rhPDGF-BB в ПО SigmaPlot 6.0 ("Systat Software", США), по

построенной зависимости рассчитывали эффективную концентрацию ростового фактора (ED_{50}).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Биосинтез rhPDGF-BB. В выбранных условиях культивирования продуктивность отобранных клонов составила около 90 мг/л культуры, что является наибольшим результатом из всех, зафиксированных в литературе (рис. 2). Предполагается, что этому способствовало в том числе добавление в питательную среду сорбитола, который может утилизироваться *P. pastoris* и не репрессирует при этом промотор *AOX1*.

Малое количество собственных секретируемых белков *P. pastoris* позволило разработать эффективную методику выделения и очистки rhPDGF-BB.

Оптимизация метода выделения и очистки rhPDGF-BB человека. В ходе анализа существующих методов очистки rhPDGF-BB (рис. 1) были выявлены их недостатки. Метод № 1 [11] является модификацией схемы выделения PDGF-BB из тромбоцитов крови человека, и содержит такие стадии, как ВЭЖХ и диализ. Метод № 2 [9] предполагает разделение PDGF-BB линейным градиентом ацетонитрила при температуре 85°C, что является решением для анализа, а не для препаративного выделения. В методе № 3 [12] применение гидрофобной хроматографии может привести к высоким потерям белка, а применение диализа не соответствует концепции “Quality by Design”. Можно заключить, что эти методики можно использовать в лаборатории, но неэффективно применять в промышленности.

Поскольку rhPDGF-BB секретируется продуцентом в среду, существует потребность в быстрой обработке больших объемов культуральной жидкости (**КЖ**), для чего подходит метод ультрафильтрации. Однако выяснилось, что rhPDGF-BB уже при ТМД = 0.7 бар выпадает в осадок, из которого активную молекулу восстановить не удается. Это происходит, предположительно вследствие того, что PDGF-BB является димерным гликопротеином со значительным количеством гидрофобных участков на поверхности молекулы. Оптимальные параметры процесса – скорость подачи 0.36 л/мин/м^2 при ТМД не более 0.4 бар. Мембрана с порогом отсечения 10 кДа позволяет эффективно удерживать целевой белок и избавляться от низкомолекулярных компонентов культуральной среды, что упростило дальнейшую очистку.

На сегодняшний день жидкостная хроматография является наиболее популярным методом очистки рекомбинантных белковых субстанций. Согласно современным представлениям, в ходе этого процесса молекулы белка переносятся подвижной фазой по интерстициальным порам неподвижной фазы в процессе конвекции; далее из

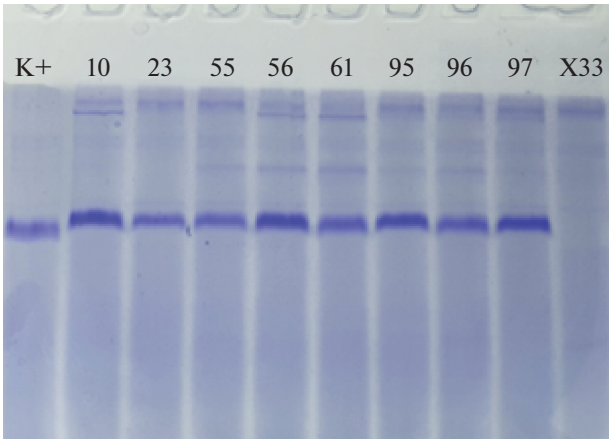

Рис. 2. Анализ образцов культуральной жидкости *P. pastoris*, содержащих rhPDGF-BB, методом электрофореза в 14% – ном ПААГ в нередуцирующих условиях. Окраска Coomassie Brilliant Blue R250. K+ – очищенный препарат rPDGF-BB (0.5 мкг/лунку), 10–97 – номера клонов; X33 – культуральная жидкость нетрансформированного штамма *P. pastoris*.

потока жидкости они диффундируют к поверхности гранулы сорбента, и наконец, проникнув в поры сорбента, адсорбируются на их внутренней поверхности. Количество адсорбционных взаимодействий напрямую зависит от площади доступной для этого поверхности – и в первую очередь, от количества и размера пор сорбента. Материал, из которого изготовлена матрица сорбента, должен минимизировать нежелательные явления, такие как неспецифическое связывание компонентов с матрицей. Пористость сорбента (отношение объема пор к общему объему неподвижной фазы) должна обеспечивать высокую удельную поверхность, при этом, поры должны быть достаточно велики, чтобы молекулы белка могли бы в них проникать и взаимодействовать с поверхностью, даже когда часть поверхности уже занята адсорбированным белком. Это напрямую влияет на такой параметр, как динамическая ёмкость сорбента. Наконец, лиганд, модифицирующий поверхность стационарной фазы, и его структура обеспечивают селективность взаимодействия между стационарной фазой и молекулой белка. Перечисленные свойства являются основой для подбора стационарной фазы для конкретного хроматографического процесса [13].

В настоящее время при разработке процесса очистки рекомбинантных белков широко применяется концепция CIPP (“Захват”, “промежуточная очистка”, “тонкая очистка”; capture, intermediate purification, polishing) [14].

Основным направлением разработки стадии “захвата” должно быть достижение максимальной динамической емкости сорбента и селективности по целевому белку, а также высокой про-

дуктивности процесса. Изоэлектрическая точка молекулы hPDGF-BB имеет значение 9.8, молекула теряет стабильность и распадается до мономеров при значениях pH > 7. Именно поэтому для всех буферных растворов было выбрано значение pH 4.5. При таком pH димер rhPDGF-BB стабилен и может храниться при 4°C. Исходя из этих данных, предполагалось, что наилучшим вариантом для первой стадии очистки rhPDGF-BB станет катионообменный сорбент на основе полимеров, устойчивых к высоким скоростям потока. Примером такого сорбента может служить Capto S – сильный катионообменник на основе высокосшитой агарозы, имеющий достаточно крупный размер частиц 90 мкм, в котором матрица и сульфонатная группа разделены спейсером, что призвано увеличить доступность лиганда для белка. Считается, что оптимальный размер пор сорбента должен быть примерно в 10 раз больше, чем размер молекулы целевого белка. Приблизительный размер молекулы rhPDGF-BB – 1.5 нм; размер пор сорбента Capto S – 50 нм. При этом по результатам экспериментов он не показал достаточную эффективную емкость – потери целевого белка составили не менее 35%.

Сорбенты Sepharose Fast Flow при одинаковом среднем размере гранул отличаются более широким распределением пор по размерам – от 29 до 70 нм, что может обеспечить большую площадь адсорбции и меньше стерических затруднений для молекул белка. При этом, использование сорбента CM Sepharose FF привело к потерям целевого белка практически таким же, как и при использовании Capto S, при полностью протонированной карбоксиметильной группе (pKa = 4.7). Более высокую емкость сорбента SP Sepharose FF по целевому белку rhPDGF-BB можно объяснить гидрофобными взаимодействиями сульфопропильного радикала с целевым белком, усиливающим связывание молекулы с сорбентом. Предполагается, что эти дополнительные взаимодействия также ответственны за “тянущийся” пик целевого белка в ходе элюции, характерный для хроматографии гидрофобных взаимодействий.

Культуральная жидкость *P. pastoris* содержит большое количество солей, пигментов, компонентов питательной среды, а также небольшое количество секретируемых клеткой белков. Органические компоненты могут конкурировать с целевым белком за адсорбционные центры сорбента и вытеснять часть белка, снижая емкость. В этом процессе большую роль играет материал сорбента, на котором может происходить неспецифическая адсорбция. Считается, что синтетические матрицы обеспечивают большую неспецифическую сорбцию компонентов, чем агарозные; однако по результатам наших экспериментов такого не наблюдалось, поскольку при одинаковых условиях нанесения и элюции сорбенты с синтетическими матрицами Source 30S, и ToyoPearl GigaCap S-650 и CM-650 показали даже большую емкость, чем SP Sepharose FF. При использовании Source и ToyoPearl наблюдалась меньшая сорбция гидрофобных пигментов, и их было проще удалить с сорбента в ходе отмывки. Меньший эффект неспецифической сорбции, по-видимому, проявлялся и в том, что в случае сорбентов с синтетической матрицей элюционная фракция была более концентрированной, не наблюдалось “хвостов”. Помимо этого, высокую ёмкость сорбентов ToyoPearl объясняет гораздо больший средний размер пор – 100 нм, тогда как для сорбентов Source, несмотря на меньший размер частицы (30 мкм) и предполагаемую меньшую удельную площадь адсорбции, спейсерная конструкция лиганда, вероятно, обеспечивала большую доступность функциональной группы для целевого белка.

Таким образом, сорбенты, показавшие наибольшую емкость по rhPDGF-BB (Source 30S, Gigacap S 650 и GigaCap CM 650) были отобраны для дальнейшего скрининга в проточных колонках. Полученные фракции исследовали на содержание rhPDGF-BB (рис. 3а) и оценивали профиль элюции по вышеописанной методике (рис. 3б).

Для достижения большей селективности по целевому белку в рамках одного хроматографического процесса подбирают одну или несколько стадий отмывки: сорбент со связанным белком промывают буферным раствором, в котором содержатся в небольших концентрациях детергенты (например, Tween-20), хаотропные агенты или соли. Это позволяет удалять с сорбента слабо связанные примеси. При этом, по результатам экспериментов отмывка буферными растворами с концентрацией хлорида натрия 0–400 мМ, а также с добавлением 0.5% Tween-20 не привела к десорбции примесей. Альтернативным солевому градиенту методом элюции считается pH-зависимая элюция. Этот метод часто используется для разделения белков с близкими значениями pI. Для осуществления pH-зависимой элюции широко используются “слабые” ионообменники, например, модифицированные карбоксиметильным лигандом (CM) [15].

Известно, что секретом *P. pastoris*, культивируемых с использованием метанола, включает в себя более 75 различных белков, большинство из которых имели pI = 6.0 или менее [16]. Было сделано предположение, что неактивный мономер rhPDGF-BB при pH 6.0 и более будет иметь меньшую силу связи с катионообменным сорбентом, чем активный димер. Исходя из этого было решено провести отмывку сорбента буферным раствором со значением pH 7.0. Для этого оптимальным выбором стала натрий-фосфатная буферная система. По результатам электрофореза в ПААГ вы-

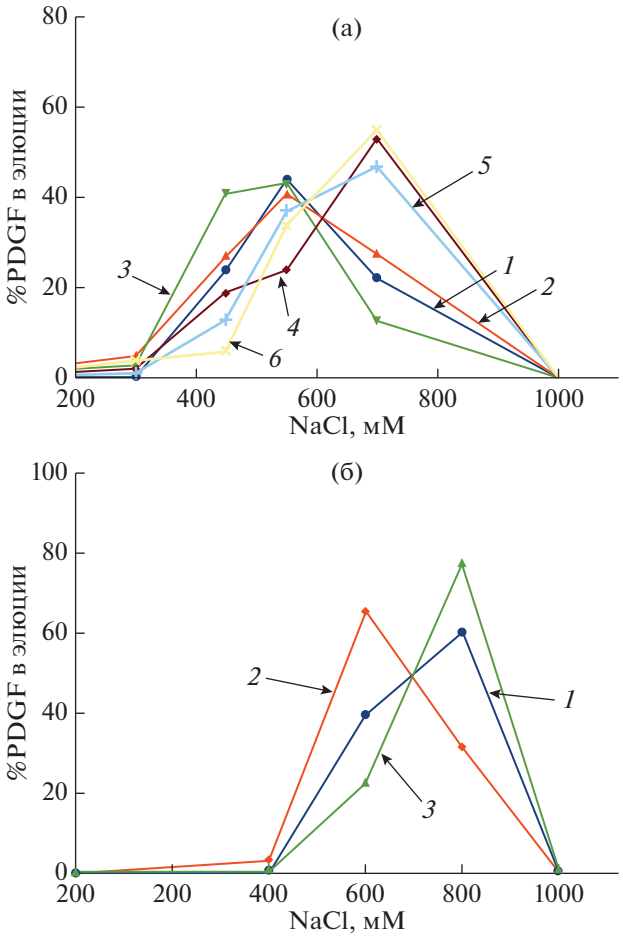

Рис. 3. Профили элюции rhPDGF-BB с различных катионообменных сорбентов. а – профили элюции в статическом режиме: *1* – CM Sepharose, *2* – SP Sepharose, *3* – Capto S, *4* – Source 30S, *5* – GigaCap S 650S, *6* – GigaCap CM 650M; б – профили элюции в проточном режиме: *1* – Source 30S, *2* – GigaCap S 650S, *3* – GigaCap CM 650M.

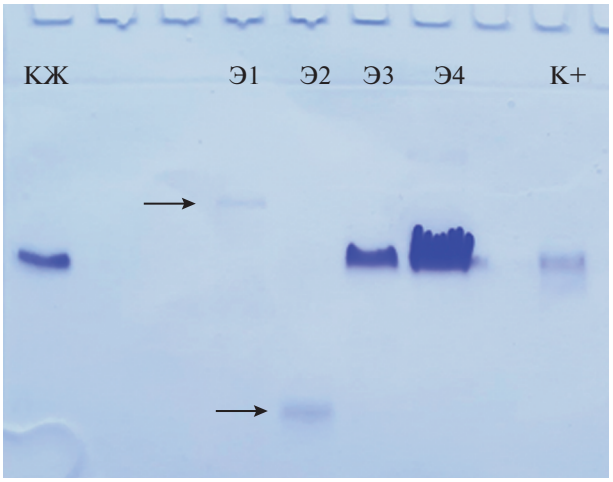

Рис. 4. Отмывка сорбента буферным раствором с pH 7.0 на стадии захвата. Э1–Э2 – фракции отмывки белка буферным раствором pH 7.0; Э3–Э4 – фракции элюции белка с сорбента Toyopearl GigaCap CM 650-M линейным градиентом от 0 до 1 M NaCl.

яснилось, что такая отмывка помогала эффективно удалять мономер rhPDGF-B, некоторые примесные белки продуцента, а также большое количество пигментов, при этом не увеличивая потери функционального rhPDGF-BB. По электрофореграмме (рис. 4) отчетливо видно, что во фракциях отмывки содержались примесные белки (Э1, указан стрелкой) и мономер rhPDGF-B (Э2, указан стрелкой), и не содержалось целевого белка rhPDGF-BB, который полностью элюировался в градиенте концентрации NaCl, начиная с 450 мМ. Таким образом с помощью кратковременной процедуры, без использования трудноудаляемых детергентов, удалось повысить чистоту элюционной фракции rhPDGF-BB до >98%.

Наибольшую емкость (60 мг rhPDGF-BB/мл сорбента) и возможность проведения отмывки при щелочном pH сочетает в себе слабый катионообменник Toyopearl GigaCap CM 650-M, который и был выбран для первой стадии очистки.

Известно, что димер PDGF-BB обладает сильным специфическим сродством к гепарину [17]. Для очистки таких белков были созданы аффинные сорбенты с пришитым гепарином. Такая хроматография имеет ряд преимуществ. Например, нет необходимости в сильном разбавлении наносимого образца, кроме того, потенциально можно избавиться от большого количества примесей. Однако при промышленном производстве применению такой методики мешает: относительно низкая допустимая рабочая скорость потока, ограниченный срок хранения сорбента из-за присутствия гепарина; более того, гепарин, которым модифицированы гранулы сорбента, имел животное происхождение, что недопустимо на биофармацевтическом производстве, организованном по стандартам GMP. Как альтернативу решено было протестировать подход, широко используемый в производстве биофармацевтических препаратов для удаления примесей, источником которых является продуцент – анионообменную хроматографию в режиме “проскока”. В таком режиме раствор целевого белка пропускается через колонну с сорбентом, на котором не происходит его связывания, но при этом с сорбентом связываются примеси, которые необходимо удалить. Этот подход был протестирован для удаления HCP из препарата rhPDGF-BB после стадии катионообменной хроматографии. pH буферных систем при этом был подобран в таком интервале, чтобы быть меньше, чем pI rhPDGF-BB, но больше, чем теоретический pI хозяйских белков, что позволяло адсорбировать хозяйские белки на анионообменнике без адсорбции целевого белка. Фракции rhPDGF-BB до и по-

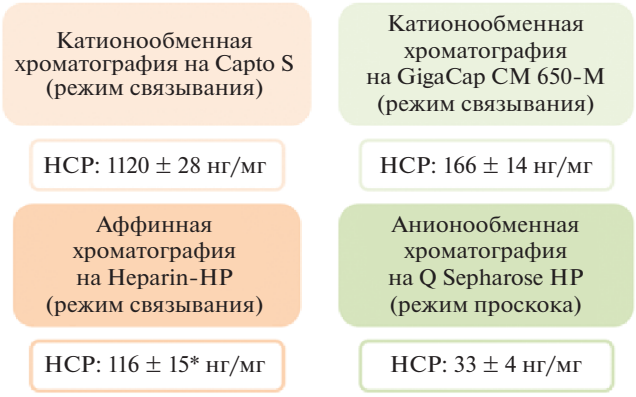

Рис. 5. Содержание примесных хозяйских белков *P. pastoris* после хроматографической очистки rhPDGF-BB.

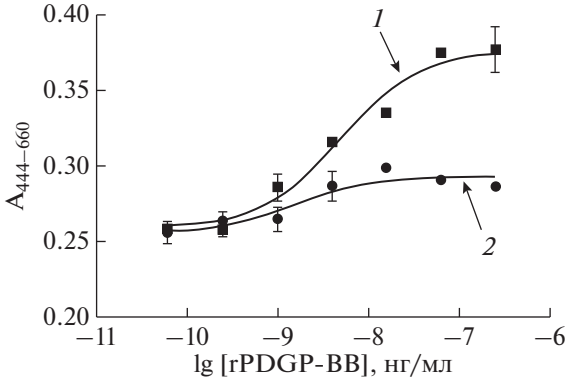

Рис. 6. Анализ пролиферативного эффекта rhPDGF-BB, полученного по оптимизированной методике, методом WST-1-теста. *1* – клеточная линия фибробластов 3T3, *2* – клеточная линия HEK293F.

сле проведения хроматографии проанализировали с помощью коммерческого набора *Pichia pastoris* HCP ELISA Kit (“Cygnus Technologies”, США).

При расчете концентрации HCP были получены значения, указанные на рис. 5. Проведено сравнение результатов со значениями, полученными при очистке rhPDGF-BB по методике с использованием Heparin Sepharose HP и отмывки с 0.1%-ным Triton X-114 (запрещен для использования в биофармацевтической промышленности).

Полученные данные свидетельствовали о том, что с помощью анионообменной хроматографии “в проскок” можно эффективно избавиться от примесей белков продуцента. Такой подход более удобен, так как на рынке доступно множество сорбентов марки Q с различным типом матрицы, для хроматографии необходим 1 буферный раствор, уменьшаются потери белка и трудоемкость очистки.

В современной биотехнологии до сих пор стандартом производства является периодический процесс, в ходе которого одна партия продукта обрабатывается за один технологический цикл. Большими преимуществами обладают непрерывные процессы: считается, что замена периодического процесса на непрерывный в рамках производства может увеличить продуктивность, уменьшить при этом количество и габариты оборудования, размеры производственной площадки, стоимость продукта, а также возможность быстро проводить очистку нестабильных молекул. Для *P. pastoris* в последние годы интенсивно разрабатываются непрерывные технологии культивирования [18–20], что в свою очередь формирует запрос на разработку непрерывных процессов хроматографической очистки. Один из способов проведения непрерывной хроматографии подразумевает использование вместо одной большой колонны с сорбентом несколько маленьких, работающих параллельно: пока на одной колонке происходит нанесение, на другой идет элюция, на третьей – санизация и т.д. Такой подход может значительно увеличить продуктивность очистки рекомбинантных белков из КЖ *P. pastoris,* так как из всех этапов очистки наибольшее время занимает нанесение большого объема КЖ на стадии захвата, что влечет за собой негативные последствия для качества целевого белка, а также длительный простой оборудования для проведения следующих этапов очистки. В разработанной схеме хроматографической очистки, в отличие от существующих решений, основной объем примесей удаляется уже на стадии катионообменной хроматографии, тогда как на стадии анионообменной хроматографии удалялись остаточные примеси, при этом пробоподготовка между двумя стадиями требовалась минимальная. В перспективе не составит труда вместо одной пары колонок взять их несколько, и проводить непрерывную очистку rhPDGF-BB небольшими партиями. Таким образом, разработанная в работе схема очистки может рассматриваться как наиболее близкая к непрерывному процессу.

Определение активности rhPDGF-BB. Полученный по оптимизированной методике rhPDGF-BB в ходе WST-теста показал пролиферативную активность на культуре фибробластов 3T3, сравнимую с пролиферативной активностью аналогов (рис. 6). Фибробласты 3T3 имеют мезенхимальное происхождение и экспрессируют на поверхности мембраны рецепторы к hPDGF-BB. Расчетная эффективная концентрация ED_{50} rhPDGF-BB составила 5.0 ± 2.64 нг/мл.

***

Предложен оптимизированный метод получения активного rhPDGF-BB высокой чистоты. Оптимизация методики выделения и очистки позволила упростить схему за счет исключения тру-

доемких стадий. Полученный rhPDGF-BB имел чистоту >98% по результатам электрофореза в ПААГ, с содержанием неактивного мономера <1% и HCP 29–37 нг/мг белка. Было установлено, что полученный таким методом rhPDGF-BB оказывал пролиферативный эффект на фибробласты 3T3, эффективная концентрация составляла 5.0 ± 2.64 нг/мл. Полученные результаты могут быть использованы для разработки более эффективной и экономически выгодной промышленной технологии для использования в регенеративной медицине и исследованиях.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Heldin C.H., Westermark B.* // Physiol. Rev. 1999. V. 79. № 4. P. 1283–1316.
2. *Fu X., Cheng B.* Regenerative Medicine in China. / Ed. X. Fu. Singapore: Springer, 2021. 485 p.
3. *Blume P., Bowlby M., Schmidt B., Donegan R.* // Chronic Wound Care Management and Research. 2014. V. 1. P. 11–14.
4. *Kaigler D., Avila G., Wisner-Lynch L., Nevins M.L., Nevins M., Rasperini G. et al.* // Expert Opin. Biol. Ther. 2011. V. 11. № 3. P. 375–380.
5. *Younger A., Penner M., Montijo H.E.* // Foot Ankle Clin. 2016. V. 21. № 4. P. 771–776.
6. *Patrikoski M., Juntunen M., Boucher S., Campbell A., Vemuri M.C., Mannerstrom B. et al.* // Stem Cell Res. Ther. 2013. V. 4. № 2. https://doi.org/10.1186/scrt175
7. *Oefner C., D'Arcy A., Winkler F.K., Eggimann B., Hosang M.* // EMBO J. 1992. V. 11. № 11. P. 3921–3926.
8. *Babavalian H., Latifi A.M., Shokrgozar M.A. et al.* // Cellular and Molecular Biology. 2016. V. 62. № 8. P. 45–51.
9. Патент США. 2006. № 7084262.
10. *Sambrook J., Green M.R.* Molecular Cloning: a Laboratory Manual.4th Ed. V. 3. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 1546 p.
11. *Ostman A., Backstrom G., Fong N., Betsholtz C., Wernstedt C., Hellman U. et al.* // Growth Factors. 1988. V. 1. № 3. P. 271–281.
12. *Dai M., Yu C., Fang T., Ling F., Wang J., Zhang J. et al.* // PLoS One. 2015. V. 10. № 12: e0145419. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145419
13. *Ersson B., Rydén L., Janson J.-C.* Introduction to Protein Purification. In: *Protein Purification*. / Ed. J.-C. Janson. Canada: John Wiley & Sons, 2011. P. 1–22.
14. *Cytiva Life Sciences.* Strategies for Protein Purification: Handbook. UK: Little Chalfont, 2021. P. 41–51.
15. *Sánchez-Trasviña C., Flores-Gatica M., Enriquez-Ochoa D., Rito-Palomarez M., Mayola-Deloisa K.* // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.717326
16. *Huang C.J., Damasceno L.M., Anderson K.A., Zhang S., Old L.J., Batt C.A.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. V. 90. № 1. P. 235–247.
17. *Schilling D., Reid J. IV, Hujer A. et al.* // Biochem. J. 1998. V. 333. № 3. P. 637–644.
18. *Nieto-Taype M.A., Garcia-Ortega X., Albiol J., Luis Montesinos-Seguí J., Valero F.* // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. V. 8. № 632. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00632
19. *Cos O., Ramón R., Montesinos J.L., Valero F.* // Microb. Cell. Fact. 2006. V. 5. № 17. https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-17
20. *Rahimi A., Hosseini S., Karimi A., Aghdasinia K., Mianroodi R.A.* // Biochem. Eng. J. 2019. V. 141. P. 112–119.

Purification Method Optimization of Recombinant Platelet-Derived Growth Factor rhPDGF-BB Expressed in Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*

A.-A. V. Misterova[a], *, V. A. Chicherin[a], and A. S. Gerasimov[a]

[a]Vyatka State University, Kirov, 610000 Russia

**e-mail: usr21438@vyatsu.ru*

Recombinant human platelet-derived growth factor rhPDGF-BB is one of the major cytokines, which has been approved for medical use. Medical drug "becaplermin", containing rhPDGF-BB has been approved for neuropathic ulcer and severe skin burns treatment, as well as in periodontal surgery (in combination with osteoconductive matrices). In this article, we sought to optimize purification process to obtain high purity rhPDGF-BB using methylotrophic yeast *Pichia pastoris* – a production host for rhPDGF-BB. A faster and simpler chromatography purification method has been suggested which allows to obtain rhPDGF-BB with purity >98% as determined by SDS-PAGE and containing host cell proteins (HCP) 33 ± 4 ng/mg, as measured by ELISA. The effective proliferative dose of rhPDGF-BB measured by WST-1 proliferative assay on 3T3 mouse fibroblast cell culture is 5.02 ± 2.64 ng/mL, which is comparable to commercially available analogues. The optimized method can be attractive for production scale use.

Keywords: Human platelet-derived growth factor, growth factors, *Pichia pastoris*, diabetic foot ulcers, recombinant proteins