

УДК 577.217

## ОПТИМИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ РНК ПРИВОДИТ К УВЕЛИЧЕНИЮ БИОСИНТЕЗА L-АСПАРАГИНАЗЫ *E. coli* ПРИ ОВЕРЭКСПРЕССИИ ЕЕ ГЕНА

© 2025 г. Р. Р. Шайфутдинов<sup>1</sup>, Н. А. Орлова<sup>1</sup>, И. И. Воробьев<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук,  
Москва, 117312 Россия

\*e-mail: ptichman@gmail.com

Поступила в редакцию 15.05.2025 г.

После доработки 30.06.2025 г.

Принята к публикации 05.07.2025 г.

Разработана высокоэффективная система экспрессии рекомбинантной L-аспарагиназы II типа *Escherichia coli* (КФ 3.5.1.1) на основе синтетического гена, оптимизированного по энергии образования шпилек вторичной структуры 5'-области мРНК. Создан штамм-продуцент *E. coli* BL21[DE3]/pET28a-AsnSYN, обеспечивающий накопление до  $291 \pm 9$  мг/л ферментативно активного белка ( $44.5 \pm 2.6$  мг/(л\*ОЕ)) при культивации в перемешиваемых колбах, что на 50% превышает показатели контрольного штамма с природным геном при времени индукции 3 ч. Оптимизация кодонного состава гена позволила увеличить энергию образования вторичной структуры мРНК в 5'-области с  $-70$  до  $-47$  ккал/моль, что, как мы предполагаем, способствовало улучшению эффективности трансляции. Для разработанного штамма-продуцента аспарагиназа, соответствующая фармакопейным требованиям по чистоте, может быть получена с общим выходом  $\geq 25\%$  и удельной активностью  $>250$  МЕ/мг. Препарат не содержит видимых примесей по данным электрофореза и менее 3% мультимерных форм по гель-фильтрации. Полученные результаты демонстрируют перспективность использования синтетических генов с оптимизацией структуры ДНК для промышленного производства терапевтических ферментов.

**Ключевые слова:** L-аспарагиназа, рекомбинантная экспрессия, синтетический ген, кодон-оптимизация, *Escherichia coli*

DOI: 10.7868/S3034574X25060027

L-аспарагиназа (КФ 3.5.1.1, L-аспарагинами-гидролаза) — фермент класса гидролаз, катализирующий реакцию гидролиза L-аспарагина до L-аспарагиновой кислоты и иона аммония. Она уже более 40 лет применяется в онкологии как противоопухолевое цитостатическое средство при лечении острых лейкозов, в частности острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), который является наиболее распространенным онкологическим заболеванием у детей.

Механизм ее действия заключается в снижении уровня свободного Асп в системном кровотоке, что приводит к истощению запасов этой аминокислоты в опухолевых клетках, не способных к ее биосинтезу, и последующей остановке их деления и гибели [1].

Существуют два основных типа бактериальных L-аспарагиназ: I и II типов. L-аспарагиназы I типа

экспрессируются конститутивно в цитоплазме и характеризуются высокой активностью по отношению к Асп, но также проявляют значительную глутаминазную активность. L-аспарагиназы II типа (asnB), локализованные в периплазматическом пространстве, экспрессируются преимущественно в условиях стресса, имеют меньшее сродство к Асп, но практически не взаимодействуют с Глн, благодаря чему подходят для терапевтического применения (<https://doi.org/10.1111/febs.16042>). Среди изоферментов *Escherichia coli* в медицинской практике применяется изоформа EcA2, кодируемая геном *ansB* (UniProtKB P00805).

Биологически активной формой EcA2 является нековалентный гомотетрамер массой около 140 кДа. Каталитические центры образованы аминокислотными остатками двух соседних мономеров, поэтому только димерная и тетрамер-

ная формы обладают ферментативной активностью [2].

Первым лекарственным препаратом ЕсА2, предназначенным для лечения ОЛЛ, был Elspar® “Merck & Co.” (США), одобренный Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) в 1978 году. К настоящему моменту на мировом рынке присутствуют десятки биоаналоговых препаратов L-аспарагиназы, выпускаемых различными производителями [3]. L-аспарагиназа II типа *E. coli* и ее производные, включая долгоживущий ПЭГ-конъюгированный вариант под названием Пегаспаргаза [4], признаны Всемирной организацией здравоохранения жизненно важными препаратами и включены в список основных лекарственных средств (WHO Model Lists of Essential Medicines, АТХ-код L01XX02). В клинике также применяется L-аспарагиназа из *Dickeya dadantii* (устар. *Erwinia chrysanthemi*), которую, в том числе, производят как рекомбинантный белок в *E. coli* [5]. Этот вариант L-аспарагиназы, по-видимому, имеет меньшую клиническую эффективность, что может быть связано с его меньшей удельной активностью и меньшей относительной глутаминазной активностью [6]. По некоторым данным, довольно значительная побочная глутаминазная активность ЕсА2 необходима для уничтожения раковых клеток при ОЛЛ [7]. У 15–20% пациентов, получающих терапию ЕсА2, развиваются аллергические реакции на препарат [8], у 45% пациентов появляются нейтрализующие антитела к ЕсА2 [9], в этом случае L-аспарагиназа из *D. dadantii* остается единственным возможным решением для продолжения терапии.

В настоящий момент на мировом рынке преобладают нативная ЕсА2 – Elspar®, ПЭГилированная ЕсА2 – Oncaspar® (Sigma-TauPharmaceuticals, США), фермент *Dickeya dadantii* зарегистрирован под названием Erwinaze® (Jazz Pharmaceuticals, США). Эти же препараты производятся под другими торговыми названиями, например Medac® (Kyowa Hakko, Япония), Crasnitin® (Bayer AG, Германия), Aginasa (Medac GmbH, Германия), Leuginase (Beijing SL Pharmaceutical, КНР). Согласно базе РЛС РФ (<https://grls.rosminzdrav.ru/>) в РФ были зарегистрированы L-аспарагиназа ООО “ИРВИН 2” (ЛП-005389-020921), которая производилась ФГБУ “НМИЦ кардиологии” Минздрава России из субстанции производства Чанчжоу Цяньхун Био-Фарма Ко.Лтд. (ЛСР-001560/08-140308) и Веро-аспарагиназа® (ООО “ВЕРОФАРМ”, ЛСР-002528/07-310807, которая производилась ООО “ВЕРОФАРМ” тоже из субстанции Чанчжоу Цяньхун Био-Фарма Ко.Лтд. (ЛСР-001560/08-140308). Отечественные субстанции в ГРЛС отсутствуют. Производство российских L-аспарагиназ крайне важно для обеспечения национальной безопасности и независимости в производстве лекарственных препаратов. Кроме того, это позво-

ляет сократить расходы на импортные аналоги, что в свою очередь может снизить стоимость лечения для пациентов.

Разработаны различные системы экспрессии ЕсА2 – в *E. coli*, в *Pseudomonas* spp., *Bacillus subtilis*, в дрожжах *Pichia pastoris* и других [10]. Среди проблем существующих решений – низкая продуктивность, сложности при очистке целевого белка, которые могут повысить его иммуногенность, а также использование потенциально патогенных хозяев. Стоит отметить, что ЕсА2 для практического применения может быть получена не только как интактный цитоплазматический или периплазматический белок, но и в составе слитного белка с доменом тиоредоксина I (ген *trxB*) *E. coli*, что не очень технологично из-за этапа протеолитического отделения тиоредоксина. При обычном способе экспрессии гена аспарагиназы в составе плазмид *E. coli*, также возможны заведомо ошибочные решения, например, использование плазмид с ампициллиновой устойчивостью, кодирующих аллергенную бета-лактамазу [11], или использование природного гена ЕсА2 с заведомо неоптимальным распределением частоты кодонов, приводящим к пониженной скорости трансляции гена [11].

Поскольку ни один из описанных к настоящему моменту неприродных организмов-хозяев для получения рекомбинантной ЕсА2 не дает существенного увеличения продуктивности по сравнению с *E. coli*, представляется очевидным, что наиболее экономически выгодным штаммом-продуцентом ЕсА2 для медицинского применения будут бактерии *E. coli* с максимально возможным уровнем экспрессии целевого гена. В литературе сообщалось о продуктивности 95 мг/л [12] при использовании гомологической экспрессии в *E. coli*.

Мы предположили, что продуктивность системы экспрессии ЕсА2 в *E. coli* может быть существенно повышена при оптимизации структуры гена по энергии образования шпильчатых структур мРНК в ее 5'-области без изменения аминокислотного состава ЕсА2, т.е. без изменения ее отделяемого лидерного пептида. По имеющимся литературным данным, изменения лидерного пептида ЕсА2 приводят к уменьшению уровня экспрессии ее гена [13], таким образом, оптимизация открытой рамки считывания гена ЕсА2 возможна только на уровне замены кодонов на синонимичные с одновременной настройкой вторичной структуры мРНК.

Отсутствие больших шпильчатых структур в 5'-области мРНК целевых генов при их оверэкспрессии в *E. coli* считается необходимым для их эффективной трансляции [14, 15]. Ранее нами было показано, что даже небольшие изменения в структуре РНК для экспрессируемого в *E. coli* гена целевого белка CRM-197 приводят к многократному изменению уровня его биосинтеза за счет удаления одной шпильки вблизи области инициации

трансляции (TIR) целевого гена [16]. Аналогичные результаты были получены для пневмолизина, хотя и с меньшим количественным эффектом [14].

Целью настоящего исследования является проверка предположения о возможности существенного увеличения уровня биосинтеза ЕсА2 в стандартных штаммах *E. coli* при простой оптимизации кодонного состава, приводящей к ослаблению шпилечных структур в 5'-концевой области мРНК целевого гена. Созданный таким способом штамм-продуцент L-аспарагиназы может иметь практическое применение для экономически обоснованного выпуска ЕсА2 для медицинского применения.

## МЕТОДИКА

**Создание экспрессионных конструкций.** Для получения природного гена L-аспарагиназы геномную ДНК выделяли из клеток *E. coli* штамма BL21[DE3] с использованием набора Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System (“Promega”, USA). ПЦР-амплификацию проводили наборами TersusPlus PCRkit, EncycloPlus PCRkit, ScreenMix (Евроген, Россия), используя олигонуклеотиды того же производителя. Для амплификации гена L-аспарагиназы использовали специфические праймеры AD-Asp-NcoF и AD-Asp-HindR, дополнительно содержащие сайты рестрикции *NcoI* и *HindIII* соответственно (табл. 1). Продукт ПЦР очищали электрофорезом в 1% агарозном геле и выделяли с использованием набора Cleanup

Standard (“Евроген”, Россия), лигировали в вектор рAL2Т Т4 ДНК-лигазой (Евроген, Россия) трансформировали в клетки *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Великобритания) методом теплового шока (42°C 45 с), отбирали клоны при помощи ПЦР с колоний с использованием праймеров M13-dir, M13-rev, SP6, T7prom (табл. 1).

Синтетический ген L-аспарагиназы был получен компанией SYNБЮ (КНР) и субклонирован в плазмиду рUC57. Для клонирования в рЕТ28а(+) в обоих случаях использовали сайты *NcoI* и *HindIII*. Для получения вариантов плазмид с большей копийностью, из полученной экспрессионной плазмиды рЕТ28а-AsnSYN был удален ген РНК-организующего белка ROP, для чего ее рестрицировали по сайтам эндонуклеаз рестрикции *FspAI* и *BstZ17I*, с последующим самолигированием. Колонии анализировали при помощи праймеров SQ-ROP-F и SQ-ROP-R (табл. 1). Поскольку явного увеличения уровня экспрессии не наблюдалось, для дальнейшей работы варианты с делецией ROP не использовались.

Плазмиды выделяли набором Plasmid Miniprep (“Евроген”, Россия). Концентрации плазмидных ДНК измеряли при помощи флуориметра Qubit (“Invitrogen”, США) набором Qubit DNA BR Assay Kit, концентрации очищенных рестриктных фрагментов – набором DNA HS Assay Kit (“Invitrogen”, LifeTechnologies, USA). Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования “ГЕНОМ” ИМБ РАН

**Таблица 1.** Праймеры для секвенирования и ПЦР

Название	Последовательность 5'-3'
Клонирование	
AD-Asp-NcoF	ACC ATG GAG TTT TTC AAA AAG ACG GCA CTT
AD-Asp-HindR	TAA GCT TCT ATT AGT ACT GAT TGA AGA TCT GCT GG
Секвенирование	
SQ-SYNASN-R	GCTCCAGCACGGTATCGTTCAT
SQ-ROP-F	TCGCTCAAGCCTTCGTCAC
SQ-ROP-R	AACCGTATTACCGCCTTTG
M13-dir	GTTGTAAACGACGGCCAGTG
M13-rev	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG
T7prom	TAATACGACTCACTATAGGG
T7t	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
RT-ПЦР	
Праймер 23S F	GAAGGCGCGCGATACAG
Праймер 23S R	GTCCCGCCCTACTCATCGA
Зонд RT23SP	CCCCGTACACAAAATGCACATGCTG-(BHQ-1)

с использованием набора Big Dye Terminator v. 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, США) и капиллярного секвенатора ABI PRISM 3730 genetic analyzer (Applied Biosystems). Для секвенирования использовали праймеры приведенные в табл. 1. Данные анализировали при помощи программы Chromas 1.45 (Technelysium Pty Ltd, Австралия) и Vector NTI (США).

Моделирование возможных вторичных структур РНК для 5'-областей природного и синтетического гена проводили при помощи сервиса RNAfold, расположенного на сервере <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>.

**Получение экспрессионных штаммов и их культивация.** Для получения штаммов-продуцентов L-аспарагиназы, конструкции использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* BL21[DE3] (с генотипом F- ompT hsdSB (r-m-) gal dcm [DE3]) и штамма ClearColi BL21(DE3) (с генотипом F-ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm lon λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) msbA148 ΔgutQ ΔkdsD ΔlpxLΔlpxMΔpagPΔlpxP ΔeptA). Штаммы культивировали в среде LB (для аналитической экспрессии) или Terrific Broth (12 г/л триптон, 24 г/л дрожжевой экстракт, 4 мл/л глицерин, 100 мМ фосфатный буфер, pH 7.4) с 50 мкг/мл канамицина. Индукцию проводили 1 мМ IPTG при OD<sub>600</sub> 1.0–1.2, затем продолжали культивирование при 30°C или 37°C от 2 до 21 ч, если не указано иное время.

**Анализ содержания L-аспарагиназы в клетках.** Клеточные лизаты получали обработкой буфером (20 мМ Tris-HCl, 5 мМ EDTA, 10 мкг/мл лизоцима, 0.1% Triton X-100, pH 7.5) с инкубацией на льду 30 мин, с последующей ультразвуковой дезинтеграцией. Растворимую и нерастворимую фракции разделяли центрифугированием 10 мин на 12000 g и анализировали электрофорезом в 12.5% ПААГ в восстанавливающих условиях. Электрофорез проводили по стандартной методике Лэммли на приборе Mini-PROTEAN Tetra (“Bio-Rad”, США). Использовали окрашенный маркер PageRuler (5 мкл на дорожку). После остановки трижды отмывали гель деионизированной водой, окрашивали коллоидным кумасси синим, обесцвечивали деионизированной водой, сканировали на планшетном сканере в прозрачном режиме, сохраняли в виде 16-битных изображений. Для анализа использовали программный пакет TotalLab TL120 (“Nonlinear Dynamics”, Великобритания).

**Измерение ферментативной активности L-аспарагиназы в лизате в микропланшете.** Активность L-аспарагиназы определяли по методу Mashburn и Wriston [17] с модификациями. Фракцию растворимых белков *E. coli* разводили в 10, 100, 500 раз буферным раствором 50 мМ Tris-HCl, pH 8.6, 1 г/л бычьего сывороточного альбумина.

Реакционную смесь (100 мкл) содержащую 50 мкл образца и 50 мкл субстрата (20 мМ L-аспарагин в 50 мМ Tris-HCl, pH 8.6) инкубировали при 37°C 10 мин в планшете (Corning, США) на термостатической платформе при 300 об/мин. Реакцию останавливали добавлением 20 мкл 10% ТХУ в воде, затем добавляли 100 мкл реактива Несслера ( $K_2[HgI_4] \times 2H_2O$ ) разведенного водой 1 : 4. Оптическую плотность измеряли при длине волны 436 нм.

**Измерение L-аспарагиназной активности в кювете с оптическим путем 1 см.** Исследуемые образцы в объеме до 100 мкл, содержащие не более 0.3 МЕ L-аспарагиназы, смешивали с 20 мкл раствора Tris-HCl pH 8.6 до конечной концентрации Tris 50 мМ и 17 мкл раствора L-аспарагина 100 мМ и инкубировали ровно 10 мин при 37°C. Аналогично готовили раствор отрицательного контрольного образца, не содержащего L-аспарагиназной активности, также проводили его инкубацию 10 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 50% раствора ТХУ в воде. При появлении видимого осадка его отделяли центрифугированием 10 мин, 14500 об/мин. Супернатант переносили в новую пробирку. В пробирку с калибратором вносили 137 мкл раствора 0.5 мМ сульфата аммония (1 мМ ионов аммония), затем вносили 100 мкл раствора ТХУ. Во все пробирки вносили по 650 мкл разведенного реактива Несслера, полученного смешиванием 550 мкл воды очищенной и 100 мкл готового реактива Несслера. Перемешивали на вортексе и выдерживали 10 мин при комнатной температуре. Измеряли оптическую плотность на длине волны 436 нм, рассчитывали концентрацию ионов аммония по оптической плотности калибровочного образца 0.5 мМ сульфата аммония.

**Очистка L-аспарагиназы.** После лизиса клеток проводили кислотную преципитацию при pH 4.5 (20 мМ ацетат натрия). Катионообменную хроматографию проводили на сорбенте Carbo S (“Cytiva”, США) в буфере (20 мМ ацетат натрия, pH 4.5) с элюцией 100 мМ NaCl. Анионообменную хроматографию проводили на сорбенте Carbo DEAE (“Cytiva”, США) в буфере (20 мМ Tris-HCl, pH 8.5) с элюцией 100 мМ NaCl. Гидрофобную хроматографию проводили на сорбенте Phenyl Sepharose HP (“Cytiva”, США) в буфере (20 мМ Tris-HCl, 250 мМ MgSO<sub>4</sub>, pH 7.5). Хроматографию на гидроксиапатите (на сорбенте СHT Type I “Bio-Rad”, США) проводили в буфере (5 мМ фосфат калия, 100 мМ NaCl, pH 7.5) с элюцией 50 мМ фосфата калия. Все этапы очистки контролировали по активности и электрофорезу в 12% ПААГ по Лэммли.

**Аналитическая хроматография.** Обратной-фазовую хроматографию проводили на колонке C4 (Grace™ Vydac™ 214 MSC4 Analytical HPLC Column 250 × 4.6 мм, 5 мкм particle size, Vydac, США). Использовали следующие растворы: подвижная

фаза А – 5% ацетонитрил, 0.1% трифторуксусной кислоты (ТФУ) в воде; подвижная фаза В – 80% ацетонитрила, 0.1% ТФУ в воде. Образец вводили в колонку в объеме 40 мкл.

Аналитическую гель-фильтрацию проводили на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) в растворе PBS с добавлением 0.05% азида натрия. Перед нанесением образцов колонку промывали двумя объемами подвижной фазы, а образцы центрифугировали 10 мин при 13500 об/мин для удаления денатурировавших белков, переносили 30 мкл в одноразовые пластиковые вставки, устанавливали вставки в стеклянные вials. Разделение вели на скорости 0.5 мл/мин, детекцию вели при длине волны 280 нм. Время удержания целевого белка составляло 26.3 мин (что соответствует объему 13.2 мл). Расчет молекулярной массы производили по калибровочной кривой, полученной путем гель-фильтрации белков-стандартов с известной молекулярной массой.

Определение ДНК штамма продуцента в промежуточных продуктах методом количественной ПЦР в реальном времени.

Использовали готовую смесь qPCRmix-HS (UDG) (Евроген), прямой и обратный олигонуклеотидные праймеры к 23S рРНК генам *E. coli*, флуоресцентный зонд (олигонуклеотид с красителем FAM) (Евроген). В качестве калибратора использовали серию десятикратных разведений стандарта, приготовленного путем смешивания 100 нг геномной ДНК *E. coli* и 100 мкл стерильной воды. Использовали систему Bio-Rad iCycler IQ5 и соответствующее программное обеспечение.

Определение уровня белков штамма-продуцента методом иммуноферментного анализа.

В качестве сорбирующих антител использовали поликлональные антитела козы к белкам продуцента *E. coli* (Cugnus) по 200 нг на лунку. Их разводили в PBS, оставляли сорбироваться на ночь. Блокировку проводили 1% BSA в PBS в течение часа. Проводили отмывку PBST (PBS, содержащий 0.1% Tween-20). Инкубировали с 50 мкл образца и 50 мкл поликлональных антител кролика к белкам продуцента *E. coli* (Enzo Life Sciences AG), конъюгированных с биотином, в течение 90 мин при комнатной температуре с перемешиванием на горизонтальном шейкере. Проводили отмывку PBST. Вносили по 100 мкл стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой хрена (Mili pore), инкубировали 20 мин при комнатной температуре с перемешиванием на горизонтальном шейкере. Проводили отмывку PBST. Вносили TMB, инкубировали 30 минут при комнатной температуре без перемешивания. Реакцию останавливали внесением в каждую лунку по 100 мкл 5% фосфорной кислоты. Сигнал детектировали на планшетном ридере при 450 нм. В качестве стандарта использовали лизат клеток BL21[DE3], содержание белков оценивали путем

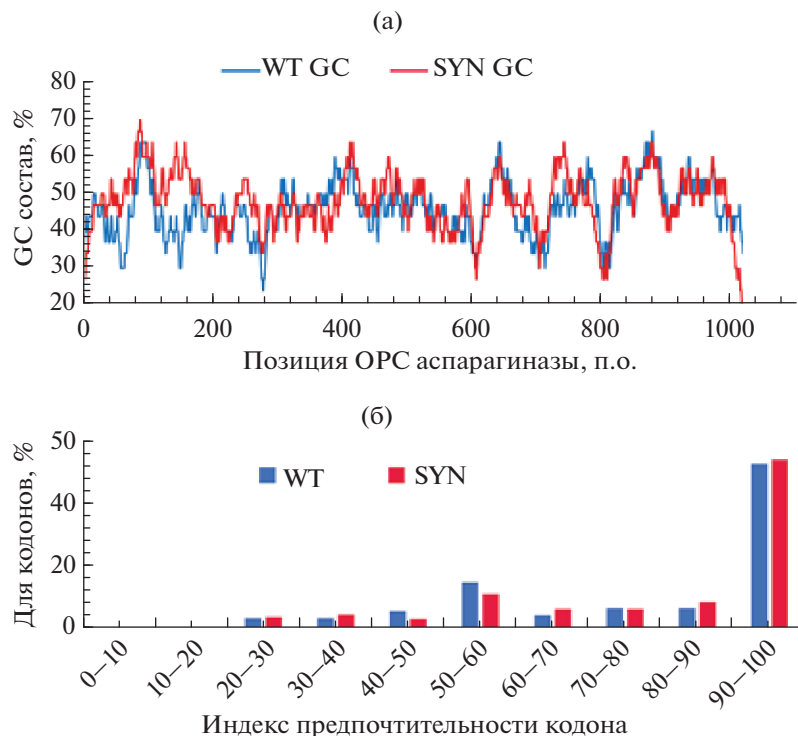
измерения по Бредфорду. Готовили калибраторы путем разведения исходного лизата в 10000 раз и далее проводили серию пятикратных разведений в PBS–1%BSA. В лунки с отрицательным контролем вносили вместо образца раствор PBS–1%BSA. Все исследуемые образцы разводили в 1000 раз, проводили измерения в двух повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для экспрессии гена L-аспарагиназы II типа *Escherichia coli* B (EcA2) были созданы две плазмиды: pET28a-AsnWT (с природным геном) и pET28a-AsnSYN (с синтетическим геном, оптимизированным энергией шпилек 5'-концевой области мРНК). Для создания синтетического гена аминокислотная последовательность EcA2 была переведена в последовательность нуклеотидов ДНК. Поскольку природный ген EcA2 предполагалось использовать для экспрессии рекомбинантного белка в клетках того же вида (в *E. coli*), то оптимизация была направлена преимущественно не на подбор оптимальных кодонов, а на оптимизацию структуры гена – из которого были удалены протяженные прямые повторы и другие последовательности, формирующие неблагоприятные элементы вторичной структуры, которые могут препятствовать инициации трансляции. Общая кодонная структура гена претерпела небольшие изменения – CAI природного гена составлял 0.79 (дивергенция Кульбака-Лейблера 4,29) в соответствии с калькулятором Oxford Genetics (<http://old.oxfordgenetics.com/cgi-bin/gene-analysis/>), а CAI синтетического гена 0.80 (дивергенция Кульбака-Лейблера 3.57) (рис. 1).

При дизайне синтетического гена в нем была увеличена доля высокопредпочтительных кодонов (80–100 по шкале RSCU) за счет снижения доли кодонов со средней предпочтительностью (40–60), а доля слабопредпочтительных кодонов (20–40) осталась неизменной (рис. 2). Для сравнения, в работе [11] использовался природный ген без кодонной оптимизации, что могло ограничивать уровень продукции.

Находящуюся непосредственно на 5'-конце мРНК шпильку со значительной энергией образования, одинаковую для природного и синтетического генов, кодируемую векторной плазмидой pET28a и расположенную выше последовательности Шайна-Дальгарно, исключали из анализа, для этого вели расчет вторичных структур для 5'-концевой области мРНК, начиная с позиции +30. Для получения релевантной модели вторичных структур использовали участок мРНК 30–300. Для него в случае природного гена выявлялось практически полное сворачивание в шпилечную структуру с вероятностью образования большинства двуспиральных участков более 80% и общей энергией образования ансамбля структур –70 ккал/моль.



**Рис. 1.** Распределение индекса GC состава ДНК для природного и синтетического гена L-аспарагиназы (а), и распределение кодонов природного и синтетического гена L-аспарагиназы по децилям индекса предпочтительности (б). Доли GC пар приведены для сегментов по 5 пар оснований. WT – природный ген L-аспарагиназы; SYN – синтетический ген L-аспарагиназы.

Для синтетического гена провели моделирование вторичной структуры мРНК, показавшее менее стабильные шпильчатые структуры в 5'-области по сравнению с природным (рис. 2), что способствует более эффективной инициации трансляции. В отличие от подхода в работе [11], где использовался гетерологичный сигнальный пептид *relV* для секреции белка в периплазму, мы использовали собственный сигнальный пептид *Esa2* и стандартную векторную плазмиду *pET28a*, которые, как будет показано ниже, в обоих случаях обеспечивают достаточно полное отделение лидерного пептида и накопление растворимой *Esa2*.

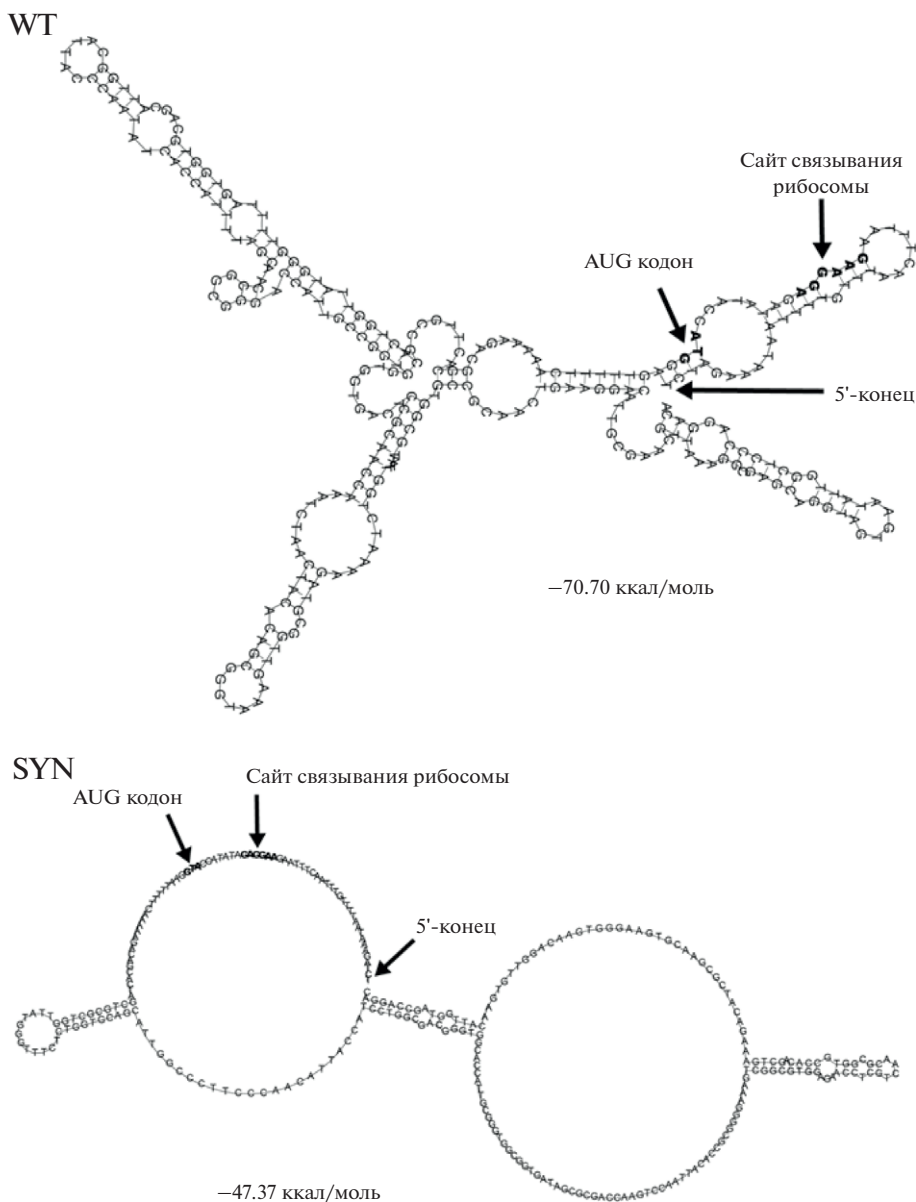
Хотя транскрипция и трансляция у *E. coli* сопряжены, 5'-UTR мРНК остается доступной для формирования регуляторных структур в течение нескольких секунд после синтеза. Мы предполагаем, что ансамбль структур с энергией образования  $-70$  ккал/моль может существенно ограничивать как инициацию трансляции, так и элонгацию рибосом.

При сравнении серий из 10 колоний типичной морфологии, полученных на чашках Петри при трансформации плазмидами *pET28a-AsnWT* и *pET28a-AsnSYN* (рис. 3) клеток BL21[DE3] у клонов с синтетическим геном наблюдался после 21 ч индукции в среднем общий и удельный уровень L-аспарагиназы достоверно выше, чем для

природного гена (рис. 5а, б). Оптическая плотность культур для 21 ч индукции была на 10% выше для природного гена, но это различие не было статистически достоверным, что указывает на отсутствие значимо большей токсичности для клеток синтетического гена.

Для получения вариантов плазмид с большей копийностью из полученной экспрессионной плазмиды *pET28a-AsnSYN* был удален ген РНК-организующего белка *ROP*. Поскольку явного увеличения уровня экспрессии не наблюдалось (данные не приводятся), для дальнейшей работы варианты с делецией *ROP* не использовались.

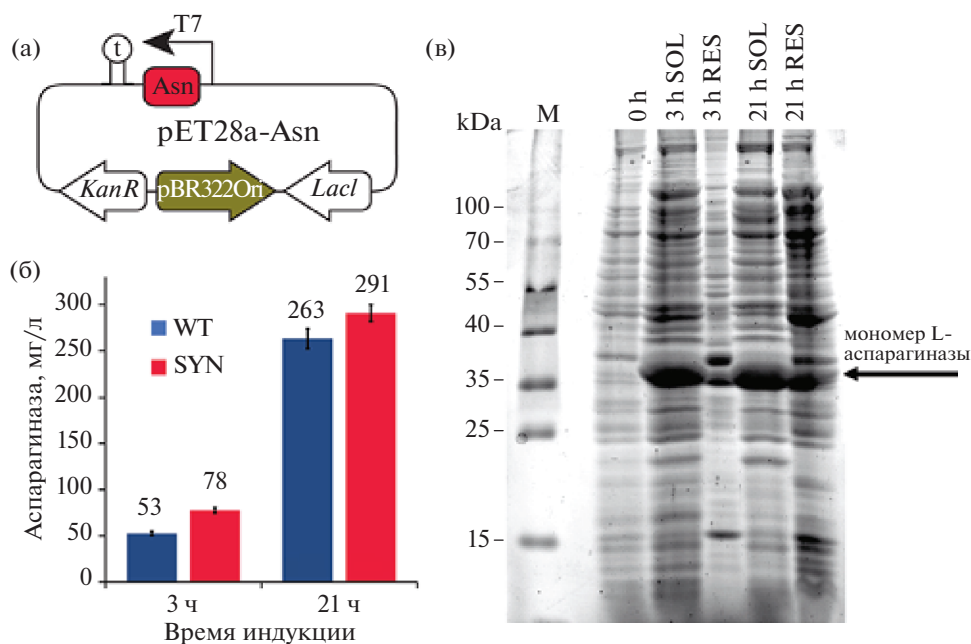
Мы проверили применимость для экспрессии штамма *E. coli* с мутантным LPS. Использование штамма ClearColi BL21(DE3) для экспрессии L-аспарагиназы представляет особый интерес по нескольким ключевым причинам. Этот штамм обладает генетически модифицированным путем биосинтеза липополисахаридов (LPS), единственный синтезирующийся вариант структурно изменен до формы Lipid IVA – лишен олигосахаридной цепи и двух из шести ацильных цепей, что делает его неспособным активировать иммунный ответ через TLR4/MD-2 комплекс у млекопитающих. Это принципиально решает проблему эндотоксинового загрязнения. Для L-аспарагиназы, которая применяется в клинической практике,



**Рис. 2.** Центроидное состояние ансамбля структур 5'-концевой области мРНК для вариантов гена L-аспарагиназы: “WT” – природный ген L-аспарагиназы, “SYN” – синтетический ген L-аспарагиназы; сайт связывания рибосомы и старт-кодон выделены жирным шрифтом.

отсутствие эндотоксиновой активности особенно критично, так как даже следовые количества LPS могут вызывать побочные эффекты у пациентов. Модифицированный LPS (Lipid IVA) ClearColi не только не активирует иммунный ответ, но и в теории легче удаляется при очистке. ClearColi обычно демонстрирует замедленный рост (скорость деления примерно на 50% меньше, чем BL21(DE3)). При культивации в среде ТВ при 37°C в течение 21 ч накопление L-аспарагиназы для клеток Clear Coli было более чем в 2 раза ниже, чем для клеток BL21 (рис. 5г, д). Стоит отметить, что для BL21 характерно накопление в культуральной среде 24–44% суммарной L-аспарагиназы на 21-й час

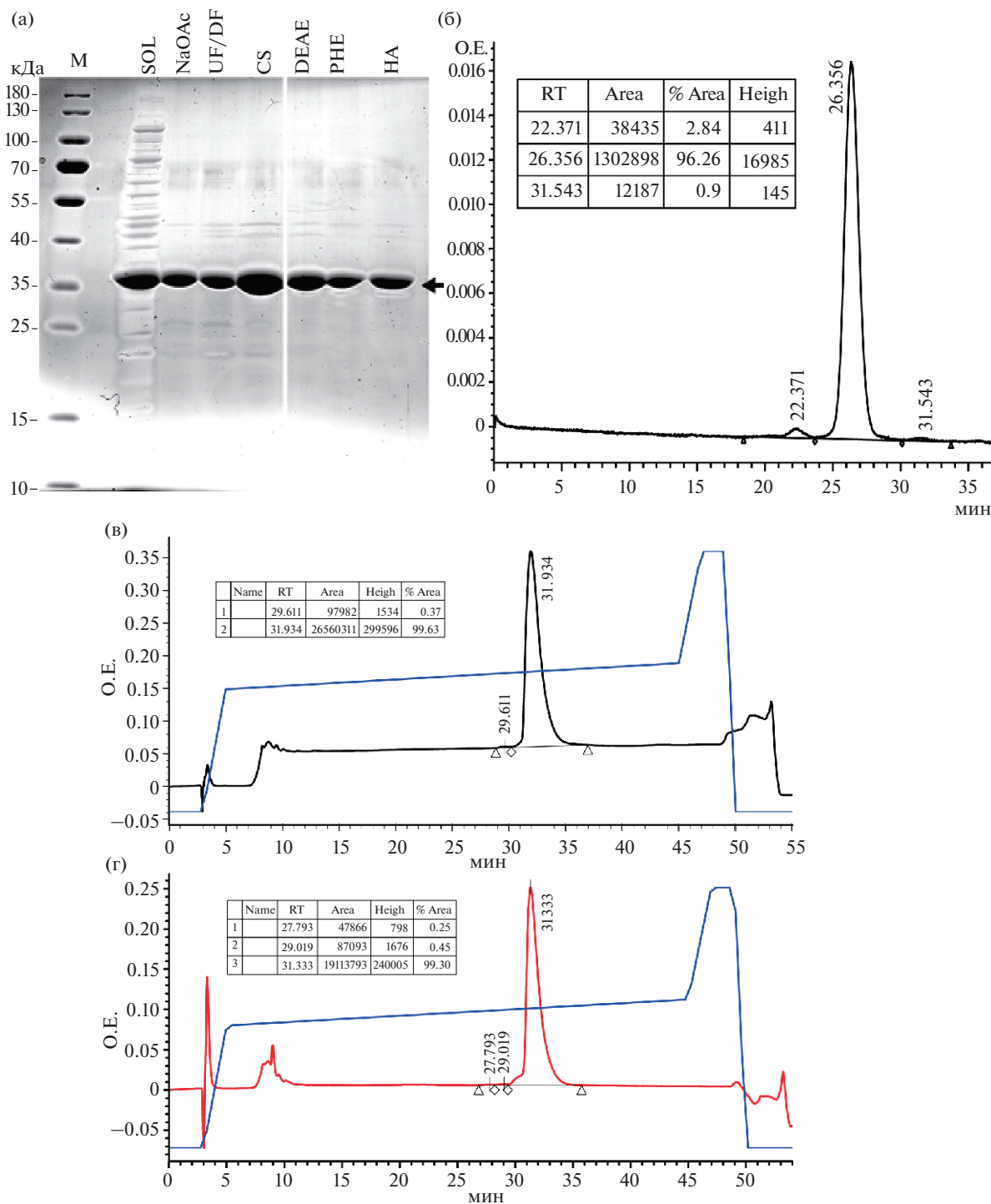
после индукции, в то время как для Clear Coli 29–69%, что можно объяснить либо спонтанным выходом EscA2 из периплазмы в среду, либо постоянным лизисом части клеток и высвобождением их внутреннего содержимого. При более длительной культивации в среде ТВ при 37°C через 27 и 44 часа для большинства клонов-продуцентов на основе Clear Coli накопления L-аспарагиназы в клетках не происходило, хотя оптическая плотность при OD600 продолжала возрастать (рис. 5е, ж). Для клона номер 4 наблюдалась аномально высокая оптическая плотность при среднем уровне продуктивности по неизвестной причине.



**Рис. 3.** Схемы вариантов плазмид для экспрессии (а), динамика накопления продукта (б), электрофореграммы белковых фракций штаммов-продуцентов, динамика элиминации плазмид (в): а – T7 – промотор целевого гена T7lac; Asn – область ОРС L-аспарагиназы, кодируемая природным геном (AsnWT) или синтетическим геном (AsnSYN), t – терминатор транскрипции целевого гена; KanR – ген устойчивости к канамицину NPT II/Neo, pBR322Ori – вариант ориджина репликации плазмид ColE1; LacI – ген белка-репрессора LacI; б – динамика накопления внутриклеточной L-аспарагиназы при индукции штаммов-продуцентов BL21[DE3]/pET28a-AsnSYN и BL21[DE3]/pET28a-AsnWT 1 mM ИПТГ в среде Terrific broth при температуре 37°C: WT – штамм BL21[DE3]/pET28a-AsnWT; SYN – штамм BL21[DE3]/pET28a-AsnSYN; в – электрофореграмма тотального белка, растворимых белков и нерастворимых белков из клеток штамма-продуцента BL21[DE3]/pET28a-AsnSYN при индукции 1 mM ИПТГ в среде Terrific broth при температуре 37°C: 0h – тотальный клеточный белок до внесения индуктора, 3h SOL – растворимые внутриклеточные белки, 3ч индукции, 3h RES – не растворимые внутриклеточные белки, 3ч индукции, 21h SOL – растворимые внутриклеточные белки, 21ч индукции, 21h RES – нерастворимые внутриклеточные белки, 21ч индукции, WT – природный ген L-аспарагиназы, SYN – синтетический ген L-аспарагиназы; M – маркер молекулярных масс. Положение целевого белка указано стрелкой.

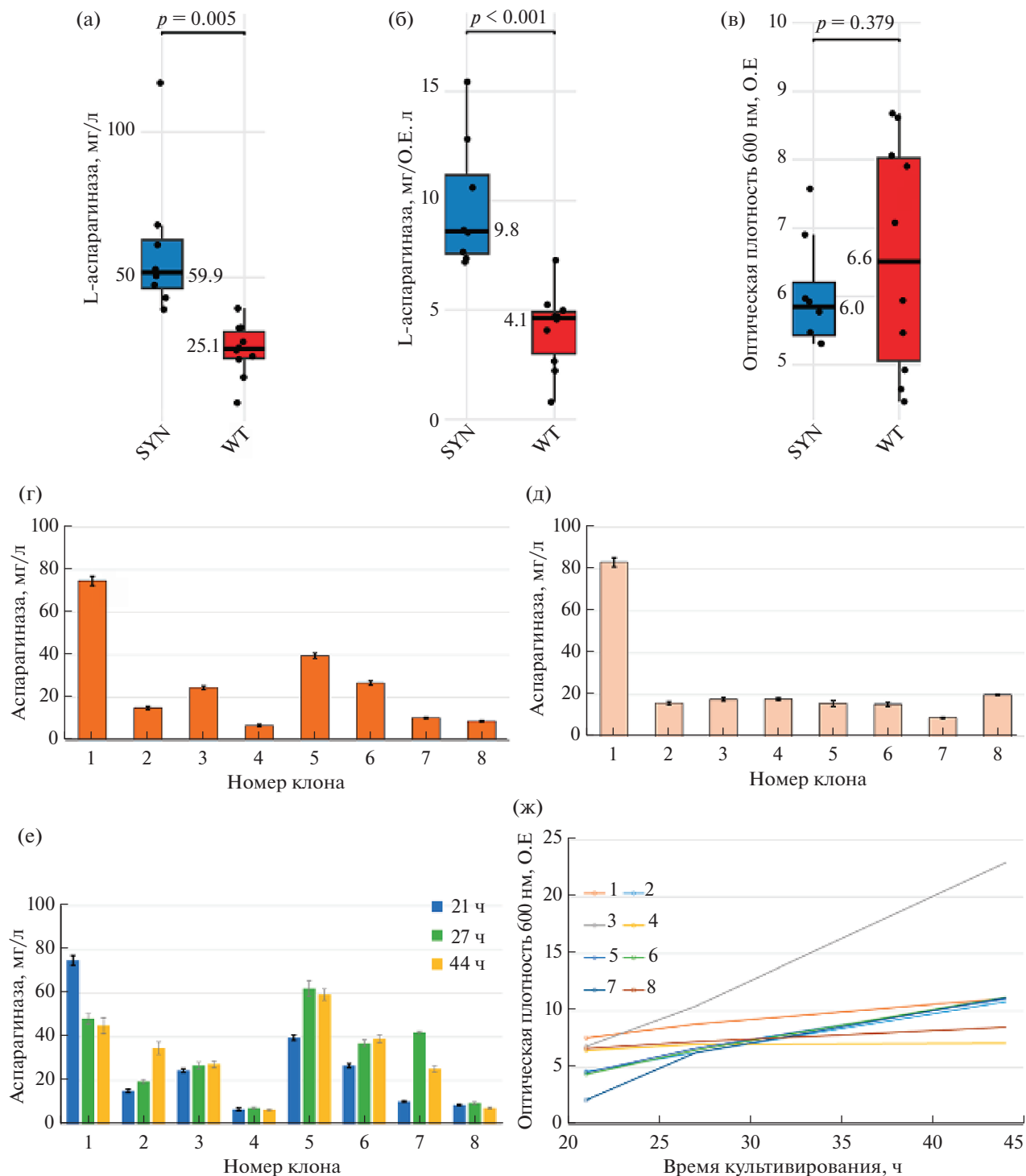
Помимо низкой продуктивности, клетки Clear Coli продемонстрировали высокий уровень эндотоксина по LAL-тесту (для лизатов пары клонов clone 1 – 475000 ЭЕ/мл, clone 5 – 78300 ЭЕ/мл). Следует отметить, что эндотоксин по LAL-тесту показывает положительные результаты для препаратов из ClearColi, поскольку реагирует на сохранившийся 4'-монофосфорил-диглюкозаминный каркас Lipid IVA, хотя его тетра-ацелированная форма (в отличие от гекса-ацелированного природного LPS) уже не активирует иммунный ответ у млекопитающих через TLR4/MD-2. Это техническое ограничение метода: LAL-система мечехвостов детектирует более широкий спектр структур, чем человеческая иммунная система, что приводит к ложноположительным результатам теста на эндотоксин. Тем не менее, все биотехнологические лекарственные средства должны анализироваться при помощи ЛАЛ-теста и соответствовать одинаковым требованиям, независимо от реальной пирогенности загрязняющего их LPS.

Для полученного нами штамма-продуцента EsA2 с увеличенной продуктивностью BL21[DE3]/pET28a-AsnSYN была разработана масштабируемая схема очистки продукта, приводящая к получению EsA2 фармакопейного качества с высоким выходом. Данная схема включала осаждение балластных белков при pH 4.5, диафильтрацию, катионообменную, анионообменную и гидрофобную хроматографию, а также финальную очистку на гидроксиапатите, данные суммированы в табл. 2. В отличие от трехступенчатого протокола [11], предложенный метод обеспечил более высокую чистоту (>95%) и выход (>25%). Содержание эндотоксина по LAL-тесту после хроматографической очистки составило 8.5 ЕЭ/мг. Удельная активность очищенного фермента превышала 250 МЕ/мг, что также соответствует фармакопейным требованиям. Содержание мультимера L-аспарагиназы и родственных примесей соответствовало фармакопейным требованиям, и было сходным для опытного препарата и препарата сравнения Spectrila.



**Рис. 4.** Электрофоретический и хроматографический анализ очищенной L-аспарагиназы: электрофореграммы белковых фракций, полученных при выделении и хроматографической очистке L-аспарагиназы (а); хроматограмма гель-фильтрационного анализа очищенной L-аспарагиназы и результаты интеграции пиков (б); хроматограмма ОФ-ВЭЖХ очищенной L-аспарагиназы, 80% CH<sub>3</sub>CN и результаты интеграции пиков (в); хроматограмма ОФ-ВЭЖХ препарата сравнения (Спектрила), 80% CH<sub>3</sub>CN, и результаты интеграции пиков (г). Канал детекции 280 нм во всех случаях.

SOL – растворимые белки, NaOAc – супернатант после закисления лизата, UF/DF – концентрат после ультрафильтрации и диалфильтрации, CS – элюат катионообменной хроматографии, DEAE – элюат анионообменной хроматографии, PHE – фракция проскока гидрофобной хроматографии, HA – элюат хроматографии на керамическом гидроксилатите, М – маркер молекулярных масс. Положение целевого белка указано стрелкой.



**Рис. 5.** Результаты культивирования клеток штаммов BL21[DE3] и ClearColi[DE3] при 37°C в среде Terrific Broth: концентрация внутриклеточной L-аспарагиназы в клетках BL21[DE3] после 21 ч индукции для синтетического (SYN) и природного гена (а); удельное содержание внутриклеточной L-аспарагиназы в клетках BL21[DE3], в расчете на 1 о.е. культуры после 21 ч индукции (б); ОП культур на 21 ч индукции (в); содержание L-аспарагиназы в растворимой фракции осажденных и лизированных клеток для Clear Coli с синтетическим геном у клонов 1–8 (г); содержание L-аспарагиназы в культуральной среде для клеток Clear Coli с синтетическим геном у клонов 1–8 (д); содержание L-аспарагиназы для клеток Clear Coli с синтетическим геном через 21, 27 и 44 ч после начала индукции (е); динамика плотности клеток для клеток Clear Coli с синтетическим геном через 21, 27 и 44 ч после начала индукции (ж).

Таблица 2. Выделение и очистка L-аспарагиназы.

Стадия	Масса L-аспарагиназы по ОП 280 нм, мг	Масса L-аспарагиназы по активности, мг	Удельная активность, %	Выход стадии по активности, %	Общий выход по активности, %	Содержание агрегатов, %	Содержание мономера	Белки штамма-продукента, мг/мг	ДНК штамма-продукента, нг/мг
Лизат клеток		228							5244286
Концентрат диафильтрации, 1000 кДа		50			22				
Концентрат диафильтрации, 30 кДа	2080.4	212	10.2	93.4	93				
Преципитация примесей ацетатом натрия, pH 4.5	660.6	175	26.4	82.2	77				103
Катионообменная хроматография (Capto S)	166.8	137	82.3	78.6	73	2.8	7%	114056	85
Катионообменная хроматография (Capto DEAE)	128.2	113	88.5	82.7	56	1.6	2%	37887	2
Гидрофобная хроматография (Phenyl FF)	123.6	166	134.5	146.5	54	1.9	–	42148	5
Хроматография на гидроксиапатите (Hydroxiapatite)	84.1	134	160.0	80.9	37	2.8	1	4370	95

*Примечание.* Удельная активность была рассчитана путем деления массы L-аспарагиназы по активности на массу L-аспарагиназы по ОП 280 нм, мг. Пустые ячейки: для образцов до первой стадии хроматографии не анализировали содержание агрегатов, мономера, белков штамма-продукента, ДНК штамма-продукента для образцов до преципитации не измеряли оптическую плотность и удельную активность по причине высокого содержания примесей.

\* \* \*

Использование синтетического гена с оптимизированным кодонным составом и дестабилизированной вторичной структурой мРНК позволило существенно повысить уровень продукции L-аспарагиназы в *E. coli* BL21[DE3] по сравнению с природным геном. Мы считаем, что данный эффект связан с повышением эффективности трансляции, однако не может быть исключены возможность изменений и в эффективности транскрипции. Была изучена возможность использования клеток Clear Coli для экспрессии L-аспарагиназы, было показано, что в данном случае большая часть целевого белка теряется за счет попадания в культуральную среду. Штамм Clear Coli значительно уступают по уровню продуктивности штамму BL21[DE3], таким образом, несмотря на возможно большую безопасность L-аспарагиназы для пациентов при применении свободных от пирогенного эндотоксина клеток Clear Coli, их использование вместо стандартного штамма BL21 приводит к многократному падению уровня целевого белка и увеличению затрат на его производство. Таким образом,

использование стандартной векторной плазмиды pET28a, стандартного штамма BL21[DE3] и оптимизированного гена EscA2 представляется наилучшим решением для использования в фармацевтическом производстве биоаналоговых препаратов L-аспарагиназы.

Разработанная модификация метода измерения активности L-аспарагиназы в микропланшете обладает рядом ключевых преимуществ, делающих его предпочтительным для рутинного анализа, среди них высокая пропускная способность, позволяющая одновременно тестировать до 96 образцов и экономичность. Важное преимущество метода – его универсальность: он одинаково хорошо подходит для анализа как очищенных препаратов, так и грубых клеточных лизатов, охватывая широкий диапазон активностей (от 0.01 МЕ/мл). Сочетание высокой чувствительности, воспроизводимости и экономичности делает данный метод оптимальным выбором для контроля качества на всех этапах разработки и производства рекомбинантной L-аспарагиназы.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ФГУП “Московский эндокринный завод” за ценные обсуждения и поддержку в проведении исследования.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при частичном финансировании ФГУП “Московский эндокринный завод”.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы И.И. Воробьев, Н.А. Орлова и Р.Р. Шайфутдинов являются соавторами патента RU2817891 “Продуцент L-аспарагиназы *E. coli* и экспрессионная плазмида pET28a-AsnSYN, кодирующая L-аспарагиназу”, правообладателем которого является ФГУП “Московский эндокринный завод”. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ВКЛАД АВТОРОВ

И.И. Воробьев – концепция и руководство работой; И.И. Воробьев, Н.А. Орлова, Р.Р. Шайфутдинов – проведение экспериментов и обсуждение результатов исследования; И.И. Воробьев, Н.А. Орлова – написание текста; Р.Р. Шайфутдинов – редактирование текста статьи.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beard M.E., Crowther D., Galton D.A., Guyer R.J., Fairley G.H., Kay H.E. et al. // Br. Med. J. 1970, V. 1. P. 191–195. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5690.191>
2. Lubkowski J., Wlodawer A. // FEBS J. 2021. V. 288. P. 4183–4209. <https://doi.org/10.1111/febs.16042>
3. Sidhu J., Gogoi M.P., Agarwal P., Mukherjee T., Saha D., Bose P. et al. // Pediatr. Blood Cancer. 2021. V. 68. P. e29046. <https://doi.org/10.1002/pbc.29046>
4. Hinojosa-Amaya J.M., Cuevas-Ramos D., Flese-riu M. // Drugs. 2019. V. 79. P. 935–956. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01128-7>
5. Borisova A.A., El'darov M.A., Zhgun A.A., Aleksandrova S.S., Omel'ianiuk N.M., Sokov B.N. et al. // Biomed. Khim. 2003. V. 49. P. 502–507.
6. Asselin B.L. // Adv. Exp. Med. Biol. 1999. V. 457. P. 621–629.
7. Chan W.K., Horvath T.D., Tan L., Link T., Harutyunyan K.G., Pontikos M.A. et al. // Mol. Cancer Ther. 2019. V. 18. P. 1587–1592. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-1329>
8. Burke M.J., Zalewska-Szewczyk B. // Future Oncol. 2022. V. 18. P. 1285–1299. <https://doi.org/10.2217/fon-2021-1288>
9. Panosyan E.H., Seibel N.L., Martin-Aragon S., Gaynon P.S., Avramis I.A., Sather H. et al. // J. Pediatr. Hematol. Oncol. 2004. V. 26. P. 217–226. <https://doi.org/10.1097/00043426-200404000-00002>
10. Wang Y., Xu W., Wu H., Zhang W., Guang C., Mu W. // Int. J. Biol. Macromol. 2021. V. 186. P. 975–983. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.107>
11. de Araujo T.S., da Costa A.C., Dias Leite da Silva C., Ribeiro F.S., de Andrade R.A., Paula Neto H.A. et al. // Biochemistry. 2025. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.4c00663>
12. Khushoo A., Pal Y., Singh B.N., Mukherjee K.J. // Protein Expr. Purif. 2004. V. 38. P. 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.07.009>
13. Naderi M., Ghaderi R., Khezri J., Karkhane A., Bambaibai B. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2022. V. 636. P. 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.10.029>
14. Behloul N., Wei W., Baha S., Liu Z., Wen J., Meng J. // Microb. Cell Fact. 2017. V. 16. P. 200. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0812-8>
15. Zhang W., Xiao W., Wei H., Zhang J., Tian Z. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. V. 349. P. 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.209>
16. Khodak Y.A., Ryazanova A.Y., Vorobiev I.I., Kovalchuk A.L., Ovechko N.N., Aparin P.G. // BioTech (Basel). 2023. V. 12. <https://doi.org/10.3390/biotech12010009>
17. Mashburn L.T., Wriston J.C., Jr. // Arch. Biochem. Biophys. 1964. V. 105. P. 450–452. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(64\)90032-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(64)90032-3)

## Optimization of RNA Structure Enhances Biosynthesis of L-Asparaginase from *E. coli* During Gene Overexpression

R. R. Shaifutdinov<sup>a</sup>, N. A. Orlova<sup>a</sup>, I. I. Vorobyev<sup>a</sup>, \*

<sup>a</sup>Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

\*e-mail: ptichman@gmail.com

A highly efficient expression system for recombinant type II L-asparaginase from *Escherichia coli* (EC 3.5.1.1) was developed using a synthetic gene optimized for the folding energy of mRNA secondary structures in the 5'-region. The engineered *E. coli* BL21[DE3]/pET28a-AsnSYN strain produced up to  $291 \pm 9$  mg/L of enzymatically active protein ( $44.5 \pm 2.6$  mg/(L·OD)) in shake-flask cultures, 50% higher than the control strain with the native gene after 3 hours of induction. Codon optimization increased the mRNA secondary structure stability in the 5'-region from  $-70$  to  $-47$  kcal/mol, potentially improving translation efficiency. The purified asparaginase met pharmacopeial standards, with a total yield  $\geq 25\%$ , specific activity  $>250$  IU/mg, and high purity (no detectable impurities by electrophoresis,  $<3\%$  multimeric forms by gel filtration). These findings highlight the potential of synthetic gene design with DNA structure optimization for industrial-scale production of therapeutic enzymes.

**Keywords:** L-asparaginase, recombinant expression, synthetic gene, codon optimization, *Escherichia coli*