

УДК 577.112.083

## ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ОСНОВНОГО ФАКТОРА РОСТА ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА rhFGF-2, ПОЛУЧЕННОГО В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *Pichia pastoris*

© 2025 г. А.-А. В. Мистерова<sup>1</sup>, \*, А. С. Герасимов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Вятский государственный университет, Киров, 610000, Россия

\*e-mail: usr21438@vyatsu.ru

Поступила в редакцию 09.12.2024 г.

После доработки 10.02.2025 г.

Принята к публикации 03.03.2025 г.

Основной фактор роста фибробластов FGF-2 человека играет важную роль в заживлении травм в организме человека и привлекает внимание ученых и разработчиков лекарственных средств и клеточных продуктов. В статье проанализированы способы получения, выделения и очистки rhFGF-2, предложена оптимизированная методика, позволяющая получать высокоочищенный rhFGF-2 с применением продуцента на основе метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. Полученный rhFGF-2 имел чистоту >98% согласно электрофорезу в ПААГ и эффективную концентрацию пролиферативной активности  $5.73 \pm 2.16$  нг/мл. Представленная методика может быть использована для разработки промышленной технологии производства rhFGF-2.

**Ключевые слова:** основной фактор роста фибробластов человека, ростовые факторы, *Pichia pastoris*, рекомбинантные белки, клеточные продукты, технологическая платформа

**DOI:** 10.7868/S3034574X25040027

Применение ростовых факторов для ускоренного восстановления травм и повреждений тканей — одно из ключевых направлений регенеративной медицины. Основной фактор роста фибробластов человека (FGF-2), принадлежащий к обширному семейству FGF (факторов роста фибробластов), участвует в широком спектре клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку, морфогенез и др., тем самым привлекая внимание ученых своим регенеративным потенциалом. Многочисленные исследования подчеркивают важную роль FGF-2 в поддержании регенеративных способностей и мультипотентного потенциала мезенхимальных стволовых клеток различного происхождения, в формировании костной и нервной ткани, регенерации кожи, связок и сухожилий. При этом, присутствие на рынке незначительного количества регенеративных продуктов, содержащих рекомбинантный FGF-2 человека (rhFGF-2), только доказывает важность использования этого фактора в современной медицине (табл. 1). В связи с регенеративным воздействием этот ростовой фактор имеет потенциал широкого применения не только

в качестве фармацевтической субстанции, но и при производстве биомедицинских клеточных продуктов — тканевых и клеточных имплантов, регенеративных скаффолдов. Создание подобных клеточных продуктов особенно необходимо для лечения хронических незаживающих язв, тяжелых ожогов и обморожений. Однако, несмотря на большое количество перспективных разработок, сложность представляет собой получение терапевтического продукта, соответствующего современным требованиям безопасности в сфере биофармацевтики. В частности, из-за строгих требований к вирусной и прионной безопасности одним из наиболее актуальных в индустрии является запрос на химически определенные культуральные среды, не содержащие компонентов животного происхождения и сывороток, которые для клеточных продуктов служат источником ростовых факторов [1]. Хотя рекомбинантные ростовые факторы доступны на рынке, для создания технологий производства клеточных продуктов должны применяться ростовые факторы, соответствующие требованиям, предъявляемым к сырью фармацевтического качества

**Таблица 1.** Примеры применения rhFGF-2 в современной медицине

Препарат	Применение	Ссылка
Зарегистрированные лекарственные препараты		
Fiblast (“Kaken Pharmaceuticals”, Япония)	Спрей для наружного применения, содержащий rhFGF-2 под международным непатентованным наименованием “трафермин”, применяемый для лечения ожогов и нейропатических диабетических язв	[11]
Retymra (“Nobel Pharma”, Япония)	Комбинация желатиновой губки, фибринового клея и rhFGF-2 для малоинвазивного лечения перфорации барабанной перепонки	[12]
Regrowth Dental Kit (“Kaken Pharmaceuticals”, Япония)	Гель гидроксипропилцеллюлозы, содержащий 0.3% rh-FGF-2, применяется для лечения остеоресессии при периодонтитах, периимплантитах	[13]
Fujifu (Beijing Shuanglu Pharmaceutical, КНР)	Раствор rhFGF-2 для наружного применения	[14]
Gaifu (Nanhai Langtai Pharmaceutical, КНР)	Лиофилизированный rhFGF-2 в комбинации со стерильным растворителем для наружного применения	[14]
Перспективные разработки		
Стволовые клетки пульпы, культивированные на хитозановом скаффолде с добавлением rhFGF-2	Показано, что rhFGF-2 индуцировал дифференцировку стволовых клеток пульпы в нейроны	[15]
rhFGF-2 в композиции с биогибридом из мезенхимальных стволовых клеток (МСК) с желатиновыми гранулами двух видов	МСК в составе биогибрида с добавлением rhFGF-2 показали более высокие темпы размножения, чем отдельно культивируемые МСК	[16]
Синтетический гидрогель с замедленным высвобождением rhFGF-2	Инtrateкальное применение имплантата на основе гидрогеля ускорило заживление травмы спинного мозга у крыс в течение 8 недель	[17]
Культуральная среда с содержанием rhFGF-2	Добавление rhFGF-2 в культуральную среду для МСК позволило отбирать МСК с высоким регенеративным потенциалом для потенциальной имплантации в зону травмы кости	[18]
Культуральная среда с rhFGF-2	Добавление rhFGF-2 в культуральную среду для стволовых клеток костного мозга позволило получить имплант с высоким иммуносупрессивным потенциалом для трансплантации в костный мозг человека	[19]

(clinical grade). Таким образом, приобретает актуальность разработка эффективной и рентабельной технологии производства рекомбинантного FGF-2 человека.

Молекула FGF-2 представляет собой мономер, состоящий из 155 аминокислот, имеющий молекулярную массу 17.3 кДа, изоэлектрическую точку молекулы – 9.6. Как и многие цитокины, FGF-2 содержит на поверхности молекулы мотив связывания с гепарином, поскольку связывание с

молекулой гепарина необходимо для взаимодействия FGF-2 с его рецептором. Отличительной чертой молекулы FGF-2 является наличие 4 неспаренных остатков цистеина, два из которых (Cис78 и Cис96) экспонированы на поверхности молекулы. Хотя существующие способы промышленного производства FGF-2 в основном фокусируются на системе экспрессии *E. coli*, проведение рефолдинга может привести к значительным потерям активного FGF-2 не только за счет ошибок фолдинга, но

и за счет формирования межмолекулярных димеров через свободные остатки цистеина [2]. В связи с этим исследователи переключают внимание на экспрессионную систему *Pichia pastoris*, которую, на наш взгляд, более рационально использовать для получения в промышленности подобных белков. Это можно проследить, проанализировав способы получения FGF-2, предлагаемые в литературе.

В частности, при очистке растворимого FGF-2 из лизата *E. coli* появляется необходимость вводить еще минимум 1–2 стадии очистки для снижения количества эндотоксинов, хозяйских белков (НСР) и ДНК, а также замены буферных систем между стадиями. При этом оптимальные результаты достигались при очистке с использованием гепарин-конъюгированных сорбентов, которые не рекомендуют использовать в условиях cGMP (актуальной надлежащей производственной практики), поскольку гепарин в таких сорбентах имеет животное происхождение. Несмотря на то, что в нескольких источниках предлагается использование вместо традиционных хроматографических сорбентов более производительных мембранных адсорберов, предлагаемые схемы не уходят от использования Heparin Sepharose [3]. По сравнению с этим, очистка FGF-2 из культуральной жидкости *P. pastoris* методом катионообменной хроматографии позволяет получать белок с чистотой более 98% за одну стадию, однако последующая очистка осложняется появлением частично разрушенных форм FGF-2, отличающихся от основной формы по гидрофобности. Таким образом, возникает необходимость проведения стадии тонкой очистки. Му с соавт. [4] предлагает для этого применить обращенно-фазовую хроматографию, тогда как Сауэр с соавт. [5] в качестве стадии тонкой очистки предлагает хроматографию гидрофобных взаимодействий. При этом, оба метода предполагают использование длинного градиента, что нацелено скорее на разделение и характеристику самих примесей, чем на быструю эффективную очистку биологически активного FGF-2. Таким образом, существует потенциал для оптимизации методики очистки FGF-2 для получения в промышленных масштабах.

Цель работы – оптимизация методики выделения и очистки из культуральной жидкости *P. pastoris* рекомбинантного основного фактора роста человека rhFGF-2 высокого качества.

## МЕТОДИКА

Для всех экспериментов использовались реактивы марки “Для анализа” (“Sigma-Aldrich”, США), если не указано иное. Для приготовления питательных сред использовались компоненты производства “Beckton Dickinson” (США). Для целей генной инженерии использовались ферменты производства “Thermo Fisher Scientific” (США).

**Получение продуцента rhFGF-2.** Продуцент *P. pastoris* штамм Х33 (“Invitrogen”, США), экспрессирующий рекомбинантный ген hFGF-2 (GenBank ID: 2247) человека под промотором АOX1, был получен нами ранее [6]. Культура *P. pastoris* продуцента rhFGF-2 депонирована в коллекции микроорганизмов кафедры биотехнологии Вятского государственного университета под номером 25920.

**Биосинтез rhFGF-2.** Продуцент выращивали в шейкере-инкубаторе “Kuhner ISFX-1” (“Kuhner AG”, Швейцария). 3 мл культуры продуцента плотностью  $OD_{600} \approx 6$  инокулировали в 1200 мл среды BMGY, следующего состава (%): дрожжевой экстракт – 1, бакто-пептон – 2, глицерин – 3, YNB – 1.34, 100 мМ калий-фосфатного буфера, pH 6.0, раствор микроэлементов РТМ1 (1 : 1000) и выращивали в колбах объемом 2 л до  $OD_{600} \approx 20–25$  при 210 об/мин, 30°C. Через 48 ч клетки отделяли центрифугированием при 1500 g, 5 мин, и 20°C, суспендировали в 150 мл индукционной среды BMMY, следующего состава (%): дрожжевой экстракт – 1, бакто-пептон – 2, метанол – 1, сорбитол – 0.5; YNB – 1.34, 100 мМ калий-фосфатного буфера, pH 5.8, раствор микроэлементов РТМ1 (1 : 1000). Полученную суспензию перенесли в колбу на 1 л и культивировали при 22°C, 300 об./мин, в течение 72 ч, добавляя 3% метанола каждые 12 ч. Далее культуральную жидкость отделяли от биомассы дрожжей центрифугированием при 5000 g, 5 мин и 4°C, добавляли сахарозу (5%), до 0.5 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF) и до 3 мМ ЭДТА, инкубировали в течение 30 мин с перемешиванием, образовавшийся преципитат удаляли центрифугированием при 12000 g, 4°C, 30 мин. Полученную культуральную жидкость анализировали на содержание rhFGF-2 методом электрофореза (по Лэммли) в 16%-ном ПААГ в невозстанавливающих условиях и использовали для дальнейших экспериментов. Гель окрашивали Coomassie Brilliant Blue R-250. Использовался маркер молекулярных масс белков “Precision Plus Unstained Protein Standards” (“Bio-Rad”, США).

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

**Хроматографическая очистка rhFGF-2 методом катионообменной хроматографии.** Для проведения катионообменной хроматографии были использованы следующие буферные растворы: буфер А (20 мМ ацетат натрия, 150 мМ хлорид натрия, pH 4.5), буфер В (20 мМ ацетат натрия, 1 М хлорид натрия, pH 4.5), буфер С (50 мМ фосфат натрия, 150 мМ хлорид натрия, pH 7.8).

Хроматография выполнялась на хроматографе “AKTA Pure 25” и колонке ХК 16/10 (“Cytiva Life Sciences”, Швеция) при объеме сорбента Toyopearl

GigaCap CM 650-M 10 мл (“Tosoh Bioseparations”, Япония) при комнатной температуре. Культуральную жидкость наносили на уравнишенный буфером А сорбент со скоростью 3 мл/мин, промывали буфером С со скоростью 2 мл/мин и элюировали градиентом концентрации NaCl от 150 до 1000 мМ 8 объемами колонки. Собранные фракции анализировали методом электрофореза как указано выше.

**Хроматографическая очистка rhFGF-2 методом мультимодальной хроматографии.** Для проведения мультимодальной хроматографии были использованы следующие буферные растворы: буфер А (25 мМ фосфат натрия, 100 мМ хлорид натрия, 5% сахарозы, 5 мМ цистеина, рН 6.5) и буфер В (25 мМ фосфат натрия, 1 М хлорид натрия, 5% сахарозы, 5 мМ цистеина, рН 6.5). Для проведения мультимодальной хроматографии фракцию, содержащую rhFGF-2 разбавляли водой MilliQ в 3 раза и наносили на колонку HiTrap Capto MMC с объемом сорбента 1 мл (“Cytiva Life Sciences”, Швеция), предварительно уравнишенную буфером А, со скоростью 1 мл/мин. После нанесения колонку промывали 10 объемами буфера А и проводили элюцию градиентом 0.1–1.0 М хлорида натрия. Объем градиента – 15 мл. Фракцию, содержащую rhFGF-2, анализировали методом электрофореза в 16%-ном ПААГ. Полученную фракцию для увеличения стабильности rhFGF-2 при хранении переводили в раствор 10 мМ уксусной кислоты методом гель-фильтрации на Sephadex G-25 и отбирали образцы для определения пролиферативной активности.

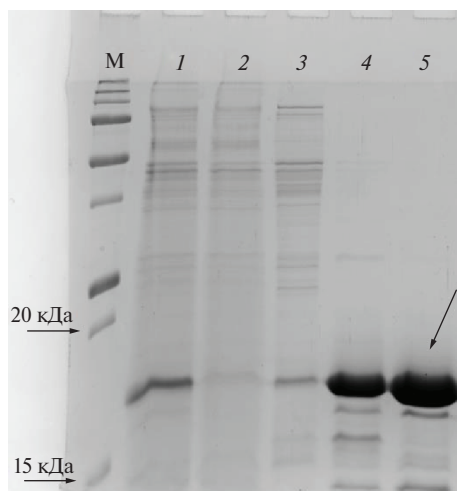
**Определение пролиферативной активности.** Проллиферативную активность полученного препарата rhFGF-2 после очистки определяли методом WST-1-теста (ab155902, “Abcam”, США) по “уточненному” протоколу с использованием клеточной линии фибробластов мыши 3Т3, в качестве отрицательного контроля – клеточной линии НЕК293F. На мембране клеток НЕК293F отсутствуют рецепторы к FGF-2, что позволяло оценивать пролиферативный эффект, оказываемый на клетки компонентами питательной среды. В 96-луночный планшет была внесена суспензия клеток линии 3Т3 и НЕК293F плотностью  $1.5 \times 10^3$  кл./лунку в питательной среде DMEM (“Sigma-Aldrich”, США) с добавлением 10%-ной фетальной сыворотки (“Sigma-Aldrich”). Планшет инкубировали 6 ч, затем питательную среду заменяли на DMEM с добавлением 0.5% фетальной сыворотки и инкубировали еще 24 ч. По истечении 24 ч заменяли среду на DMEM с добавлением полученного rhFGF-2 в концентрациях 0–250 нг/мл. Разведения rhFGF-2 готовились из стокового раствора rhFGF-2 добавлением рассчитанного объема раствора rhFGF-2 к питательной среде DMEM таким образом, чтобы конечный объем разведения составил 50 мкл. Клетки НЕК293F и 3Т3 инкубировали с ростовым фактором в течение 48 ч. После этого в каждую лунку добавляли по 10 мкл WST-1 реактива, затем

инкубировали 4 ч и измеряли поглощение света при длинах волн 440 и 660 нм, как указано в методике производителя реактива. Проллиферативную активность на обеих клеточных линиях оценивали построением кривых зависимости поглощения  $A_{440} - A_{660}$  от десятичного логарифма концентрации rhFGF-2 с помощью программы SigmaPlot 6.0 (“Systat Software”, США). По построенной зависимости рассчитывали эффективную концентрацию пролиферативной активности ростового фактора.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Биосинтез rhFGF-2.** В выбранных условиях культивирования продуктивность выбранного клона составила около 45 мг rhFGF-2/л культуры. Предполагается, что в данном случае добавление сорбитола в индукционную среду оказало положительное влияние. Сорбитол является одним из немногих источников углерода, добавление которого не репрессирует АОХ-промотор, что позволяет использовать его как переходный субстрат для сглаживания лаг-фазы и ускорению адаптации клеток продуцента к условиям индукции. При этом, известно, что добавление сорбитола в смеси с метанолом на протяжении всего периода индукции, наоборот, снижало выход целевой молекулы. Это можно объяснить тем, что добавление сорбитола увеличивает скорость роста культуры, тогда как в фазе индукции метанолом наилучшая продуктивность штамма-продуцента коррелирует с минимальной скоростью его роста [7].

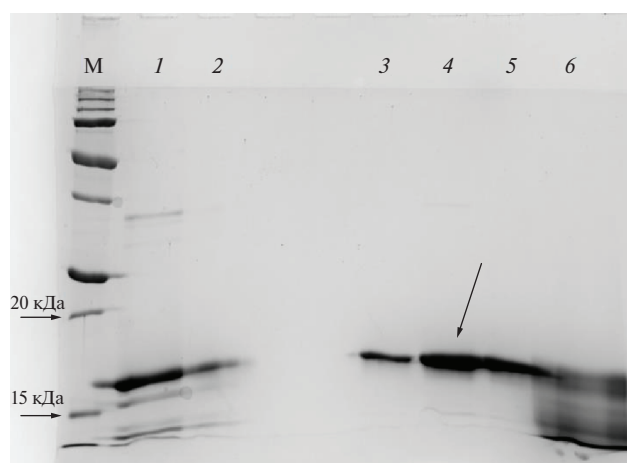
**Оптимизация метода очистки rhFGF-2.** Исходя из литературных данных, было выделено несколько возможных точек оптимизации процесса очистки. Одной из них было исключение сорбента, модифицированного гепарином, из схемы очистки. Изоэлектрическая точка rhFGF-2 составляла 9.72, поэтому, если исходить из концепции CIPP (захват–промежуточная очистка–тонкая очистка), очевидным выбором является катионообменная хроматография. Используя разработанную методику, удалось добиться значительной степени очистки rhFGF-2 на этой стадии. Другое преимущество этого метода – меньшее время процесса и меньшие затраты реактивов, поскольку из-за высокой плотности положительного заряда на поверхности молекулы rhFGF-2 при использовании Heparin Sepharose элюция происходит только при 1.2–1.5 М NaCl, что подтверждается литературными данными. При катионообменной хроматографии элюция происходит при 600 мМ NaCl. Однако возникла проблема образования технологических примесей, которые не являются НСР или компонентами культуральной жидкости. Молекулярная масса этих примесей позволяет судить о том, что те из них, которые по молекулярной массе превышают 30 кДа, скорее всего, являются межмолекулярными агрегатами rhFGF-2, тогда как те, которые не



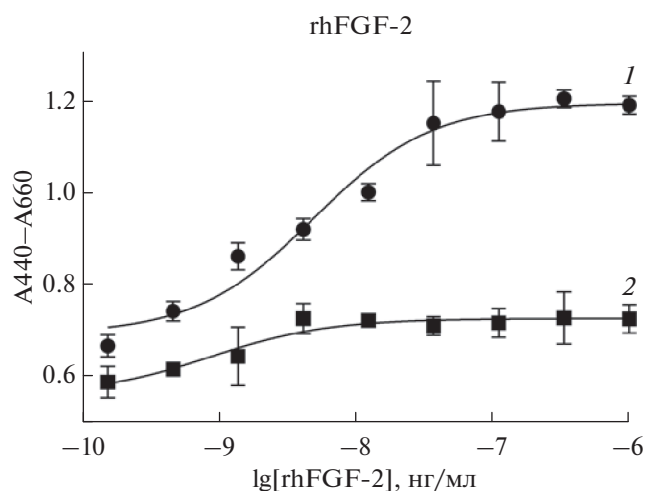
**Рис. 1.** Результат электрофореза в 16%-ном ПААГ культуральной жидкости продуцента *P. pastoris*: М – маркер молекулярных масс белков; 1 – культуральная жидкость; 2 – фракция несвязавшихся белков; 3 – фракция щелочной отмывки; 4–5 – фракции, содержащие rhFGF-2 (указан стрелкой).

превышают молекулярную массу самого rhFGF-2, являются его расщепленными формами (рис. 1). Действительно, существующие данные указывают на то, что молекула rhFGF-2 достаточно нестабильна. В организме человека она стабилизируется путем связывания с молекулой гепарина, что объясняет тот факт, что при очистке на гепариновых сорбентах эффекта “расщепления” rhFGF-2 не наблюдается. Тем не менее, в некоторых случаях доля этих примесей может достигать 10% от всей элюционной фракции, что является значительной потерей. Известно, что низкомолекулярные формы rhFGF-2 отличаются от полноразмерной формы не столько зарядом, сколько гидрофобностью, поскольку из первых 9 аминокислотных остатков, отщепляющихся от N-конца молекулы, 6 являются гидрофобными [8]. Практически это подтверждалось тем, что в ходе работы не удавалось отделить полноразмерную форму rhFGF-2 от примесей, используя колонку Mono S (размер гранулы сорбента – 10 мкм, высота слоя – 10 см) и градиент концентрации хлорида натрия в 20 объемов колонки со скоростью потока 0.5 объемов/мин. Таким образом, в системе была значительно уменьшена НЕТР (высота, эквивалентная теоретической тарелке) и условия были приближены к ВЭЖХ, но элюция происходила только за счет повышения ионной силы элюирующего раствора. Хроматография гидрофобных взаимодействий, которую предлагали другие авторы, также предполагала проведение довольно длинного градиента, чтобы добиться удовлетворительного разделения полноразмерной и расщепленных форм. При этом на изменение силы гидрофобных взаимодействий может оказывать влияние большое число параметров, включая

температуру, расположение гидрофобных патчей на поверхности молекулы, нагрузку на сорбент, а также состав буферного раствора, полярность подвижной фазы и вид модифицирующих группировок сорбента. При этом добиться удовлетворительного разрешения можно, только четко контролируя состав буферного раствора и условия проведения хроматографии. В промышленных условиях это требует соблюдения дополнительных условий проведения процесса: делает его трудозатратным, увеличивает потребление воды и реактивов, а также время процесса. Альтернативой может быть мультимодальная хроматография: сочетание полярных и неполярных группировок позволяет упростить пробоподготовку (в данном случае требуется разбавить наносимый образец в 3–5 раз) и проводить разделение на основании нескольких типов взаимодействий, что может улучшить разрешение процесса. Сорбент Capto MMC сочетает в себе свойства слабого катионообменника и слабогидрофобного сорбента. При элюции градиентом 0.1 М–1.0 М NaCl на хроматограмме обнаруживался один пик, соответствующий rhFGF-2, а на электрофореграмме полосы, соответствующие низкомолекулярным примесям, не обнаруживались. По всей видимости, при увеличении ионной силы в системе гидрофобные взаимодействия примесей с сорбентом усиливались настолько, что ослабевающее ионное взаимодействие не вызвало элюцию этих примесей с сорбента. Это видно при анализе фракции регенерации сорбента 0.5 М NaOH (рис. 2). В общей сложности при применении оптимизированной методики очистки удалось получить 8 мг rhFGF-2 с чистотой >98% и расчет-



**Рис. 2.** Электрофорез в 16%-ном ПААГ после промежуточной очистки rhFGF-2 на NiTrap Capto MMC: М – маркер молекулярных масс белков; 1 – образец фракции после катионообменной хроматографии; 2 – стартовый образец (разбавленная в 3 раза фракция после катионообменной хроматографии); 3–5 – фракции очищенного rhFGF-2 (указан стрелкой); 6 – фракция, полученная после промывки сорбента раствором 0.5 М гидроксида натрия.

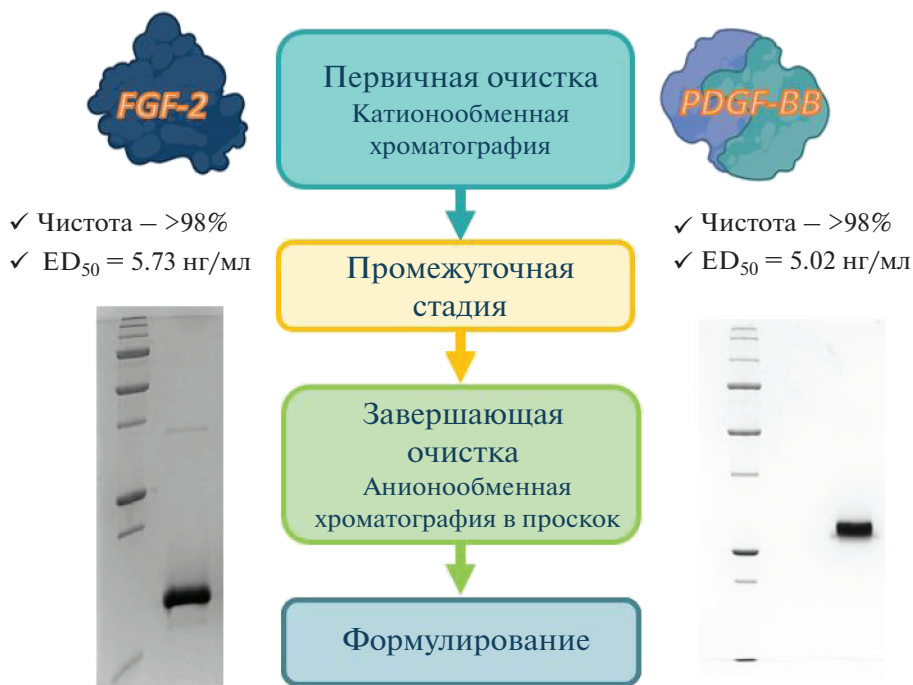


**Рис. 3.** Анализ пролиферативного эффекта rhFGF-2 методом WST-1-теста, полученного по оптимизированной методике. 1 – клеточная линия фибробластов 3Т3, 2 – клеточная линия НЕК293F (использовались в качестве отрицательного контроля).

ной эффективной концентрацией  $5.73 \pm 2.16$  нг/мл (рис. 3). По полученным данным расчетной эффективной концентрации можно сделать вывод о том, что в физическом выражении потребность в FGF-2 невелика и может составлять от 10 до 50 г в год. С учетом продуктивности полученного штамма и перспективы увеличения продуктивности при переходе на промышленное культивирование, необходимое количество целевого белка можно получить при 1 культивировании в объеме 300 л. Таким образом, в данном случае для создания полноценного производства, сертифицированного по cGMP (актуальной надлежущей производственной практике), необходимо уделить внимание рентабельности этого производства. Одним из способов устранить возможный простой площадки может быть производство нескольких ростовых факторов в рамках единой технологической платформы. Технологическую платформу можно охарактеризовать как совокупность параметров, позволяющих производить несколько близких по свойствам продуктов с помощью примерно одинакового набора технологических операций. Примером успешной технологической платформы можно считать производство моноклональных антител и Fc-слитых белков: в этом случае основой платформы является операция выделения целевой молекулы методом аффинной хроматографии на белке А. Сюда же можно отнести использование His6-тага для быстрой очистки белков методом металло-хелатной аффинной хроматографии или производство белков, слитых с альбумином, для очистки на Blue Sepharose. Ростовые факторы в свою очередь достаточно разнородны, однако среди них можно выделить несколько групп, основываясь на физико-химических свойствах молекулы. Например, на

основании значения изоэлектрической точки можно выделить ростовые факторы “щелочные” (FGF-2, PDGF-BB, NGF- $\beta$ , IGF-1) с изоэлектрической точкой выше 8.0, и “кислые” (GM-CSF, EGF, FGF-1) с изоэлектрической точкой в районе 4.0–6.0. В таком случае основой платформы для производства этих ростовых факторов станет ионообменная хроматография, в частности, для “щелочных” факторов – катионообменная хроматография. Если рассмотреть два цитокина – PDGF-BB и FGF-2, они оба представляют собой сильнощелочные белки небольшой молекулярной массы и сложной структуры. PDGF-BB является димером с 8 дисульфидными связями, тогда как FGF-2, хоть и является мономером, склонен к образованию неактивных межмолекулярных агрегатов, поскольку имеет 2 экспонированных на поверхности свободных остатка цистеина. Кроме того, для каждой системы экспрессии существует набор примесей, которые образуются в процессе культивирования именно этого организма: компоненты питательных сред, хозяйские белки и ДНК, эндотоксины, компоненты клеточных мембран. При разработке биопроцесса важно наиболее полным образом охарактеризовать эти примеси, чтобы на основе этих знаний можно было разработать наиболее эффективные способы их удаления, о чем гласит принцип Quality by Design. Результаты, полученные при оптимизации очистки rhPDGF-BB из культуральной жидкости *P. pastoris* в ходе предыдущих исследований [9], показывают, что rhPDGF-BB и rhFGF-2, полученные нами, возможно выделить одним и тем же способом с использованием одной методики, не применяя компоненты животного происхождения и аффинные сорбенты. Кроме того, разработанный метод для очистки rhPDGF-BB (щелочная отмывка + анионообменная хроматография в проскок), позволил снизить количество НСР в образце белка до приемлемо низкого уровня, а результаты похожего эксперимента для rhFGF-2 (экспрессирован в цитоплазме *E. coli*) продемонстрировали снижение уровня НСР до  $34 \pm 4$  ppm нг/мг целевого белка [10]. Это позволяет предположить, что оптимизированный метод очистки также эффективно удаляет НСР из образца rhFGF-2, экспрессированного в *P. pastoris*, поскольку *P. pastoris* не выделяет эндотоксины. Таким образом, способы получения двух “щелочных” ростовых факторов PDGF-BB и FGF-2 могут сформировать единую технологическую платформу (рис. 4). В дальнейшем эти принципы можно применить при разработке способов получения и других ростовых факторов, имеющих промышленную значимость.

Разработана оптимизированная схема очистки рекомбинантного фактора роста фибробластов человека rhFGF-2. Полученный rhFGF-2 имел чистоту >98%. Пролиферативная активность продемонстрирована на клеточной линии фиброб-



**Рис. 4.** Технологическая схема для получения рекомбинантных ростовых факторов в *P. pastoris* на примере rhFGF-2 и rhPDGF-BB.

ластов ЗТЗ, расчетная эффективная концентрация составила  $5.73 \pm 2.16$  нг/мл. Полученные результаты могут быть использованы для разработки более эффективной промышленной технологии производства rhFGF-2 для использования в научных исследованиях и регенеративной медицине. Анализ результатов позволяет предположить возможное создание единой технологической платформы для производства промышленно значимых рекомбинантных ростовых факторов.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках текущего финансирования деятельности университета и не получала дополнительного финансирования извне.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе не содержится никаких исследований с участием людей или животных.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhang D., Mai Q., Li T., Huang J., Ding C., Jia M. et al. // Stem Cell Res. Ther. 2016. V. 7. № 1. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0347-7>
- Estapé D., Heuvel J.V.D., Rinas U. // Biochem. J. 1998. V. 335. № 2. P. 343–349.
- Chen R., John J., Lavrentieva A., Müller S., Tomala M., Zhao Y. et al. // Engineering in Life Sciences. 2012. V. 12. № 1. P. 29–38.
- Mu X., Kong N., Chen W., Zhang T., Shen M., Yan W. // Protein Expr. Purif.. 2008. V. 59. № 2. P. 282–288.
- Sauer D.G., Mosor M., Frank A.C., Weiß F., Christler A., Walch N. et al. // Protein Expr. Purif.. 2019. V. 153. P. 70–82.
- Патент РФ. 2023. № 2804544.
- Garcia-Ortega X., Adelantado N., Ferrer P., Montesinos J.L., Valero F. // Process Biochemistry. 2016. V. 51. № 6. P. 681–691.
- Sauer D.G., Mosor M., Jungbauer A., Dürauer A. // Sep. Purif. Technol. 2021. V. 254. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117564>
- Мустерова А.-А.В., Чичерин В.А., Герасимов А.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2023. Т. 59. № 4. С. 383–391.
- Bolten S.N., Knoll A.S., Li Z., Gellermann P., Pepelanova I., Rinas U. et al. // Journal of Chromatography A. 2020. V. 1626. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461367>
- Abdelhakim M., Lin X., Ogawa R. // Dermatol. Ther. (Heidelb.). 2020. V. 10. № 4. P. 569–587.
- Kanemaru S. // Operative Techniques in Otolaryngology-Head and Neck Surgery. 2021. V. 32. № 2. P. 111–115.
- Nagayasu-Tanaka T., Anzai J., Takedachi M., Kitamura M., Harada T., Murakami S. // Regenerative Therapy. 2023. V. 23. P. 84–93.

14. *Fu X.* Regenerative Medicine in China. / Ed. Fu X. Singapore: Springer Singapore, 2021. 485 p.
15. *Zheng K., Feng G., Zhang J., Xing J., Huang D., Lian M. et al.* // Int. J. Neurosci. 2021. V. 131. № 7. P. 625–633.
16. *Moghtader F., Tabata Y., Karaöz E.* // Gels. 2024. V. 10. № 8. <https://doi.org/10.3390/gels10080493>
17. *Chen B., He J., Yang H., Zhang Q., Zhang L., Zhang X. et al.* // Sci Rep. 2015. V. 5. № 1. <https://doi.org/10.1038/srep09017>
18. *Kona S., Dong J.F., Liu Y., Tan J., Nguyen K.T.* // Int. J. Pharm. 2012. V. 423. № 2. P. 516–524.
19. *Auletta J.J., Zale E.A., Welter J.F., Solchaga L.A.* // Stem Cells International. 2011. V. 3. <https://doi.org/10.4061/2011/235176>

## Purification Method Optimization of Recombinant Basic Fibroblast Growth Factor rhFGF-2 Expressed in Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*

A.-A. V. Misterova<sup>a,\*</sup> and A. S. Gerasimov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Vyatka State University, Kirov, 610000 Russia

\*e-mail: [usr21438@vyatsu.ru](mailto:usr21438@vyatsu.ru)

Basic human fibroblast growth factor FGF-2 plays a major role in wound healing. Thus, its regenerative potential attracts both researchers and commercial drug manufacturers, including cell therapy developers. This research aims to optimize purification method to obtain high purity rhFGF-2 expressed in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Suggested method allows purification of rhFGF-2 with purity of >98% as determined by SDS-PAGE. The effective proliferative dose of rhFGF-2 determined by WST-1 proliferative assay on 3T3 mouse fibroblast cell culture is  $5.73 \pm 2.16$  ng/ml. The presented optimized technique may be attractive for the development of an industrial technology for rhFGF-2 production.

**Keywords:** basic human fibroblast growth factor, growth factors, *Pichia pastoris*, recombinant proteins, regenerative cell products, industrial platform