

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА CRM197 В КЛЕТКАХ *E. COLI*

И.В. Духовлинов, Е.А. Федорова, Е.Г. Богомолова, О.А. Добровольская,
Е.Н. Черняева, Р.И. Аль-Шехадат, А.С. Симбирцев

ФГУП Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Белок CRM197 является нетоксичным производным дифтерийного токсина и характеризуется одной мутацией, а именно, заменой глицина на глутаминовую кислоту в положении 52. Белок CRM197 является перспективным адъювантом нового поколения, который может быть успешно использован в вакцинных и терапевтических препаратах. Классическим способом получения дифтерийного токсина и его нетоксичных производных является продукция в клетках *Corynebacterium diphtheriae*. Преимущество использования *E. coli* в качестве продуцента состоит в том, что данный метод является более простым и дешевым, и позволяет получать рекомбинантный CRM197 в короткие сроки с использованием непатогенного микроорганизма. В данной работе использовался запатентованный высокопродуктивный штамм-продуцент рекомбинантного CRM197 на основе клеток *E. coli*. В ходе исследования подобран оптимальный протокол индукции экспрессии гена *crm197*, разработан метод получения высокоочищенного препарата рекомбинантного CRM197 путем последовательного применения ионообменной, гидрофобной и молекулярно-ситовой типов хроматографии.

Ключевые слова: рекомбинантный белок, CRM197, адъювант, конъюгированные вакцины, дифтерийный токсин, *Escherichia coli*.

PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEIN CRM197 IN *ESCHERICHIA COLI*

Dukhovlinov I.V., Fedorova E.A., Bogomolova E.G., Dobrovolskaya O.A., Chernyaeva E.N., Al-Shekhadat R.I., Simbirtsev A.S.

Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The CRM197 is a non-toxic mutant of diphtheria toxin having a single amino acid substitution of a glycine for a glutamic acid in position 52. Being naturally nontoxic, CRM197 is a promising adjuvant and ideal carrier protein for conjugate vaccines. Typically, production of diphtheria toxin and some of the non-toxic proteins are carried out by *Corynebacterium diphtheriae*. Production of recombinant protein CRM197 in *Escherichia coli* is advantageous. It is simple, cheap and permits production of the target protein in a short time using a non-patho-

Адрес для переписки:

Духовлинов Илья Владимирович
197110, Россия, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7,
ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России.
Тел.: +7 (981) 881-82-01.
E-mail: dukhovlinov@gmail.com

Contacts:

Il'ya V. Dukhovlinov
197110, Russian Federation, St. Petersburg, Pudozhskaya str., 7,
Research Institute of Highly Pure Biopreparations.
Phone: +7 (981) 881-82-01.
E-mail: dukhovlinov@gmail.com

Библиографическое описание:

Духовлинов И.В., Федорова Е.А., Богомолова Е.Г., Добровольская О.А., Черняева Е.Н., Аль-Шехадат Р.И., Симбирцев А.С. Получение рекомбинантного белка CRM197 в клетках *E. coli* // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 1. С. 37–44. doi: 10.15789/2220-7619-2015-1-37-44

Citation:

Dukhovlinov I.V., Fedorova E.A., Bogomolova E.G., Dobrovolskaya O.A., Chernyaeva E.N., Al-Shekhadat R.I., Simbirtsev A.S. Production of recombinant protein CRM197 in *Escherichia coli* // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 1, pp. 37–44. doi: 10.15789/2220-7619-2015-1-37-44

Исследование выполнено в рамках НИОКР, выполняемых по соглашению № 14.579.21.0022 с Минобрнауки РФ о предоставлении субсидии из федерального бюджета для прикладных научных исследований по лоту шифр 2014-14-579-0001 по теме: «Разработка конъюгированных вакцин на основе синтетических углеводных лигандов против возбудителей госпитальных инфекций». Соглашение о выделении субсидий № 14.579.21.0022 от 05 июня 2014 г. Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI57914X0022.

genic microorganism. In this study patented high-yield-producing *E. coli* strain was used. As a part of the study the following steps were taken: protocol adjustment for induction of *crm197* gene, production and purification of recombinant CRM197 by ion-exchange, hydrophobic and gel-filtration chromatography. The purity of the final preparation reached 97%.

Key words: recombinant protein, CRM197, adjuvant, conjugate vaccine, diphtheria toxin, *Escherichia coli*.

Введение

Дифтерийный токсин (DTx, 58 kDa) является белковым токсином, который вызывает одноименное заболевание. Проникая в клетки, дифтерийный токсин приводит к нарушению синтеза белка и гибели клеток за счет ферментативной активности [11]. В начале 1970-х гг. были выделены нетоксичные или малотоксичные «кросс-реактивные» формы дифтерийного токсина – cross-reacting materials – CRMs. CRM30 и CRM45 утратили некоторые структурные элементы и имеют меньшую молекулярную массу по сравнению с дифтерийным токсином; они сохранили ферментативную активность *in vitro*, но лишились связывающей способности и способности к проникновению внутрь клетки, чем и обуславливается потеря ими токсичности. CRM176, CRM228 имеют ту же молекулярную массу, что и дифтерийный токсин дикого типа, но утратили и ферментативную активность, и связывающую. Белок CRM197 утратил ферментативную активность, но не потерял связывающую, он является наиболее подходящим для использования в составе вакцин и терапевтических препаратов.

Белок CRM197 является производным дифтерийного токсина, отличающимся одной мутацией, а именно заменой глицина на глутаминовую кислоту в положении 52, что элиминирует его токсичность [22]. Ген, кодирующий CRM197, принадлежит мутантному фагу $\beta 197^{tox-}$. CRM197, являясь нетоксичным, тем не менее сохраняет те же иммуностимулирующие свойства, что и дифтерийный токсин, в результате чего CRM197 широко используется в качестве безопасного носителя в конъюгированных вакцинах [17]. Белок состоит из 535 аминокислотных остатков, имеет молекулярную массу 58,4 kDa и pI 5,8. Как и дифтерийный токсин дикого типа, CRM197 содержит два домена: фрагмент А (каталитический) и фрагмент В, соединенные дисульфидным мостиком. Фрагмент В содержит субдомены, один из них связывает клеточный рецептор HB-EGF (гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста), другой участвует в процессе проникновения внутрь клетки.

Классическим способом получения дифтерийного токсина и его нетоксичных производных является продукция в клетках *Corynebacterium diphtheriae* линии PW8, инфицированных частицами β фага, геном которого несет мутантный ген *tox*, кодирующий дифтерийный токсин. При этом необходимо выращивать культуру клеток в течение 36–48 ч для достижения максимальной концентрации дифтерийного токсина или его производных. Эти белки секретируются в культуральную среду, которая, наряду с целевым белком, содержит неспецифические примеси аминокислот, пептидов и белков. Целевой белок затем выделяют центрифугированием и последующей ультрафильтрацией, либо преципитацией, и далее очищают с использованием хроматографических методов. Однако для обеспечения большего выхода целевого белка процесс ферментации требует большого количества лизогенных мутантов *C. diphtheriae* и четко контролируемых условий роста (температура, перемешивание, аэрация, концентрация железа).

Известны работы, в которых CRM197 получают с использованием клеток организма *Escherichia coli*. В большинстве случаев данным путем получают укороченные формы CRM197, включающие только домен А, либо домен А с частью домена В. Недавно было описано получение полноразмерного CRM197 в клетках *E. coli* [19]. В данной работе планировалось получить два варианта рекомбинантного CRM197 – не несущего каких-либо меток белка и белка с гистиридиновой меткой на N-конце полипептидной цепи. Для создания штаммов-продуцентов использовали клетки *E. coli* BL21AI. Гены, кодирующие белок CRM197, с меткой и без нее, клонировали в плазмиду pET9a. Индукцию экспрессии генов осуществляли с помощью добавления в среду арабинозы. Синтез рекомбинантного CRM197, не несущего меток, не наблюдали. Биосинтез рекомбинантного CRM197 с гистиридиновой меткой наблюдали на высоком уровне (250 ± 50 мг на 1 л культуры клеток штамма-продуцента), при этом белок накапливался в виде нерастворимых агрегатов. Первичную очистку белка, несущего His-tag,

осуществляли методом иммобилизованной металлоаффинной хроматографии в денатурирующих условиях. Полученный препарат дополнительно подвергали Superdex-200 гель-фильтрации. Далее удаляли гистициновую метку путем инкубации с энтерокиназой в соответствующем буфере.

Таким образом, получение рекомбинантного белка CRM197 в клетках *E. coli* является достойной альтернативой классическому способу получения данного белка с использованием культуры клеток *Corynebacterium diphtheriae*. Преимущество использования *E. coli* в качестве продуцента состоит в том, что данный метод позволяет получать рекомбинантный CRM197 с использованием непатогенного микроорганизма в короткие сроки, является более простым и дешевым по сравнению с получением данного белка классическим способом. Однако целесообразно использование продуцента, который обеспечивает высокий уровень синтеза CRM197, не слитого с какой-либо последовательностью, для уменьшения количества работы с белком и увеличения вероятности прохождения препаратом доклинических и клинических исследований.

Методы

Индукция экспрессии гена *crm197*. Использовали запатентованный штамм-продуцент рекомбинантного белка CRM197 на основе клеток *Escherichia coli* BL21(DE3). Осуществляли подбор оптимального протокола индукции экспрессии гена, кодирующего рекомбинантный белок CRM197. Для этого проводили индукцию экспрессии гена двумя способами — с помощью изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозиды (ИПТГ) в трех концентрациях и 0,2% лактозы (по Штудиеру) [20].

Индукцию экспрессии гена с использованием ИПТГ осуществляли следующим образом. Инкубировали клетки при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин в течение ночи в LB среде (1% триптон, 1% дрожжевой экстракт и 1% натрий хлористый), содержащей ампициллин в концентрации 50 мкг/мл. Разводили культуру свежей LB средой в 50 раз и выращивали в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин +37°C до достижения культурой клеток оптической плотности 0.6–0.8 оптических единиц при длине волны

600 нм. После этого осуществляли индукцию экспрессии рекомбинантного гена добавлением ИПТГ к культуре до конечной концентрации 0,1; 0,5 или 1 мМ. Индукцию проводили в течение 18 ч для определения оптимальной концентрации индуктора для получения высокого уровня экспрессии гена *crm197*, после чего клетки концентрировали с помощью центрифугирования.

Индукцию экспрессии гена *crm197* 0,2% лактозой (по Штудиеру) осуществляли следующим образом. В среду RYP-5052, содержащую 1% пептон (Gibco, США), 0,5% дрожжевой экстракт (Gibco, США), 50 мМ Na₂HPO₄, 50 мМ K₂HPO₄, 25 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgSO₄, 0,5% глицерол, 0,05% глюкозу и 0,2% лактозу, ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, инокулировали единичную колонию штамма-продуцента, после чего ее инкубировали при 37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин в течение 20 ч до отсутствия существенного изменения оптической плотности при длине волны 600 нм за 1 ч. Далее отбирали аликвоту клеток на анализ.

Контроль экспрессии осуществляли с помощью диск-электрофореза аликвот клеток после индукции. Электрофорез клеточных лизатов проводили в 12,5%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях в неоднородной (ступенчатой) буферной системе (диск-электрофорез) с использованием на стадии концентрирования образца механизма изотахофореза по Леммли [10].

Очистка рекомбинантного белка CRM197. Биомассу, полученную из 1 л жидкой культуры клеток штамма-продуцента после индукции экспрессии гена *crm197* (4 г), ресуспендировали на ледяной бане, добавляя 3 мл на 1 г биомассы охлажденного ресуспендирующего буфера (40 мМ Tris-HCl, pH 8,0; 1 мМ ЭДТА; 1 мМ дитиотреитол — ДТТ) и разрушали 5 циклами соникации. Фрагменты клеток осаждали центрифугированием при 15 000g в течение 40 мин. Для осветления лизата к супернатанту добавляли по каплям 10%-ный Тритон X-100 до 0,1%, перемешивали, оставляли на 30 мин при 4°C и затем центрифугировали при 25 000g 30 мин [5].

К 40 мл осветленного клеточного лизата добавляли буфер для нанесения (50 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЭДТА, 2 мМ ДТТ, 0,2 М бензамидин-HCl, 0,2 мМ PMSF, pH 7,5), после чего наносили на колонку HiPrep 16/10 Q XL

(GE Healthcare, Швеция), уравновешенную буфером для нанесения, и промывали 50 мл того же буфера при скорости 10 мл/мин. Элюцию белков, связавшихся с носителем, проводили градиентом NaCl (0% В в 5 CV, 30% В в 5 CV, 100% В в 5 CV) до 10 М NaCl. Оптический профиль элюции определяли по поглощению при 280 нм на спектрофотометре. Фракции (5 мл каждая), содержащие белок CRM197, объединяли и наносили на колонку SOURCE 15ISO (GE Healthcare, Швеция), уравновешенную буфером для нанесения (1,6 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10% глицерин, 50 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЭДТА, 2 мМ ДТТ, 0,2 мМ бензамидин-HCl, 0,2 мМ PMSF, pH 7,5). После промывания колонки 50 мл того же буфера белок элюировали буфером для элюции (50 мМ Tris-HCl, 10% глицерин, 1 мМ ЭДТА, 2 мМ ДТТ, 0,2 мМ бензамидин-HCl, 0,2 мМ PMSF, pH 7,5) при скорости 5 мл/мин. Для элюции использовали градиент — 0–16% В в 4 CV, 16–24% В в 8 CV, 24–35% В в 4 CV, 100% В в 4 CV. Объем каждой фракции составил 5 мл.

Для доочистки белка CRM197, а также перевода в нативные условия использовали гель-фильтрацию. Данный метод не только позволяет разделять молекулы по их размеру, но и обеспечивает формирование правильной пространственной структуры рекомбинантных белков [12].

Хроматографию проводили на гель-фильтрационной колонке XK26/60 с сорбентом Superdex S-100 при скорости элюции 1,3 мл/мин, элюент — 0,01 М натрий фосфатный буфер, pH 7,2–7,4. Результаты анализировали с помощью электрофореза в 12,5%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по Леммли [6], гели окрашивали Кумаси G-250. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [1].

Определение содержания бактериального липополисахарида в препарате рекомбинантного белка CRM197. Определение содержания бактериального липополисахарида в препарате рекомбинантного белка CRM197 проводили с использованием гель-тромб варианта ЛАЛ-теста, чувствительностью > 0,25 EU/мл (ToxinSensor, GenScript, США). ЛАЛ-реагентом служил лизат амебоцитов подковообразного краба *Limulus polyphemus*. ЛАЛ-реактив специфически реагирует с бактериальными эндотоксинами, в результате ферментативной реакции происходит изменение реакционной смеси, пропорциональное концентрации эндотоксина.

Был приготовлен стандартный раствор эндотоксина с концентрацией 0,5 EU/мл, полученный раствор стабилен при хранении при -20°C в течение, по крайней мере, 2-х недель.

Готовили серию разведений образца препарата белка CRM197 с шагом концентрации 10, а после предварительного определения содержания эндотоксина с шагом концентрации 2.

На дно каждой пробирки, свободной от эндотоксина, добавляли 100 мкл образца препарата белка CRM197, воды или эндотоксина, после чего добавляли 100 мкл ЛАЛ-реактива и инкубировали в течение 1 ч при 37°C на водяной бане.

Результаты оценивали по наличию или отсутствию плотного тромба на дне пробирки путем переворачивания пробирки.

Компьютерные методы анализа данных. Анализ полиакриламидных гелей проводили с помощью программы ImageJ.

Результаты

Изучали экспрессию гена *crm197* при индукции 0,1; 0,5 и 1 мМ ИПТГ, а также 0,2% лактозой по Штудиеру. Наблюдали экспрессию гена *crm197* при всех вариантах индукции, а именно — с использованием 0,1; 0,5 и 1 мМ ИПТГ и 0,2% лактозы. Подобран оптимальный протокол индукции экспрессии гена, кодирующего рекомбинантный белок CRM197 — индукция 0,5 мМ ИПТГ при 37°C в течение ночи. Этот способ является оптимальным по выходу белка и затратам на его осуществление (рис. 1).

Получен высокоочищенный препарат рекомбинантного белка CRM197 в результате проведения нескольких этапов хроматографического разделения. Осветленный лизат клеток штамма-продуцента рекомбинантного белка CRM197 был подвергнут ионообменной хроматографии на колонке HiPrep 16/10 Q XL (GE Healthcare, Швеция), после чего препарат, содержащий целевой белок, подвергали гидрофобной хроматографической очистке на колонке SOURCE 15ISO (GE Healthcare, Швеция). Окончательную очистку рекомбинантного белка и его рефолдинг осуществляли с помощью гель-фильтрации на колонке XK26/60 с сорбентом Superdex S-100. В результате был получен препарат белка с чистотой 97%, выход составил 0,3 г из 1 литра жидкой культуры штамма-продуцента.

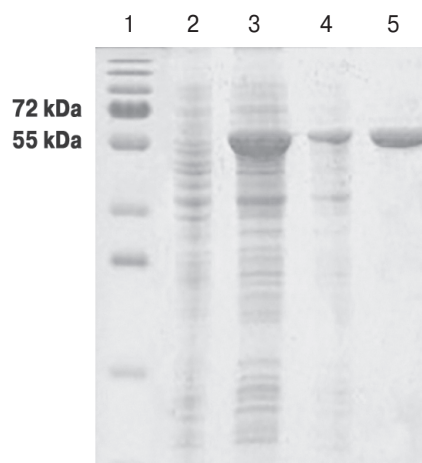


Рисунок 1. Электрофореграмма результатов индукции экспрессии гена *crm197*

0,5 mM IPTG; 12,5% ПААГ; 0,1% ДДС-Na

1. Маркер молекулярного веса (Fermentas).
2. Лизат клеток штамма-продуцента до индукции.
3. Лизат клеток штамма-продуцента после индукции 0,5 mM IPTG.
4. Препарат рекомбинантного CRM197, полученный после проведения гидрофобной хроматографии.
5. Высокоочищенный препарат рекомбинантного CRM197, полученный после проведения гель-фильтрации.

Также проводили исследование чистоты препарата от примесей эндотоксина с использованием ЛАЛ-теста. В проведенных исследованиях значение рН исходного раствора с концентрацией 2 мг/мл составил $6,92 \pm 0,03$, что соответствует значению, рекомендованному для реакции с ЛАЛ-реактивом — 6,0–8,0. Гель-тромб не образовывался при исследовании тотального (неразведенного) образца, то есть при чувствительности метода 0,25 EU/мл. В образце с концентрацией 2 мг/мл содержится менее 0,25 EU/мл, то есть на 1 мг белка приходится менее 0,125 EU.

Обсуждение

Вакцины на основе полисахаридов эффективны для формирования защиты взрослых от бактериальных инфекций, однако они не столь эффективны в случае группы риска, к которой относятся младенцы, дети раннего возраста, пожилые люди или лица с ослабленным иммунитетом [4]. Это привело к разработке вакцин, в которых полисахаридные компоненты конъюгированы с белком-носителем, что приводит к активации Т-зависимого иммунного ответа и, таким образом, в значительной степени повышает иммуногенность препарата. Экспериментальные исследования показали, что при использовании в качестве белка-носителя CRM197 наблюдаются

повышенные уровни IgG к целевому полисахаридному антигену. Также происходит увеличение уровня синтеза таких цитокинов, как IL-4 и IL-5, которые являются маркерами Т-хелперов 2 типа [15]. Следует отметить, что вакцинация младенцев из группы риска полисахаридными вакцинами, конъюгированными с CRM197, безопасна [23].

Первыми белками-носителями были дифтерийный и столбнячный токсины, которые демонстрировали протективность при использовании их в качестве антигенов в вакцинах. В настоящее время для этих целей используется как минимум пять различных белков-носителей, в число которых входит белок CRM197, нетоксичный вариант дифтерийного токсина [18]. CRM197 используется как белок-носитель во многих конъюгированных вакцинах, таких как пневмококковые (Prevenar™) [3], менингококковые (Menveo®, Menjugatec®, Meningitec®) [6], а также против гемофильной палочки *H. influenzae B* (HibTITER®, Vaxm-Hib®) [7]. В настоящее время помимо оценки эффективности уже применяющихся препаратов, в состав которых входит CRM197, активно идет разработка новых поли- и олигосахаридных вакцин против различных бактериальных инфекций с CRM197 в своем составе. Проводятся исследования, целью которых является создание противогрибковых вакцин, в которых CRM197 также является белком-носителем [2].

В данный момент активно осуществляется разработка таргетных препаратов, опосредованных действием CRM197 [16]. Ключевой проблемой применения многих терапевтических препаратов является отсутствие у их активных компонентов способности достигать тканей или клеток, на которые должно быть направлено их действие. К таким труднодоступным сайтам относятся гематopoэтические клетки и клетки центральной нервной системы. Для решения данной проблемы разрабатываются различные специфические переносчики, способные доставить к мишеням активные терапевтические агенты. Зрелый HB-EGF является мембран-ассоциированным белком, экспрессированным на многих типах клеток, в том числе линии гематopoэтических клеток, включая моноциты, гранулоциты и лимфоциты. HB-EGF также является рецептором дифтерийного токсина, который используется для проникновения внутрь клетки [13]. CRM197, как уже упоминалось, обладает способностью присоединяться к HB-EGF. Присоединение белка к лиганду вызывает его захват клетками путем эндоцитоза. Это делает потенциально возможным применение CRM197 в качестве белка, доставляющего активные агенты к лейкоцитам [9]. Таким образом, возможна разработка терапевтических препаратов против гематологических опухолей, в том числе хронической лимфоцитарной лейкемии, острой миелоидной лейкемии, В-клеточной лимфомы.

Интерес к CRM197 возрастает все больше и в связи с его самостоятельной противоопухолевой активностью, реализующейся, возможно, за счет способности связывать растворимую форму HB-EGF, высокоэкспрессированную при некоторых формах рака [24]. Противоопухолевая активность CRM197 была продемонстрирована на мышах и у человека, однако не установлено, зависит ли она лишь от способности данного белка связывать HB-EGF, либо реализуется за счет высокой иммуногенности при утрате токсичности [14]. При введении белка CRM197 в случае Т-клеточной острой лимфобластной лейкемии показана индукция апоптоза, а при сочетании CRM197 с доксорубицином (противоопухолевым антибиотиком антрациклинового ряда) продемонстрирована увеличенная цитотоксичность в отношении опухолевых клеток [8]. Противоопухолевая активность CRM197 продемонстрирована и в случае карциномы яичника, которая характеризуется повышенным уровнем экспрессии

HB-EGF, на культуре клеток и в опытах с лабораторными животными [21].

Показано, что CRM197 является мощным и эффективным адьювантом, который может быть использован в разработке терапевтических противоопухолевых вакцин, за счет мощного ответа Т-хелперов 1 и 2 типов. Так, в экспериментах на модели рака толстой кишки мыши данный белок демонстрировал мощную адьювантную активность [25].

Целью исследования являлось создание адьюванта, который, наряду с высокой эффективностью, обладал бы относительной безопасностью применения. Для реализации поставленной цели был создан высокопродуктивный штамм-производитель рекомбинантного белка CRM197 и разработан метод его очистки.

Для получения высокоочищенного белка CRM197 в больших количествах при малых затратах осуществлен ряд действий. Подобран протокол индукции экспрессии гена, кодирующего рекомбинантный белок CRM197, обеспечивающий высокий выход белка при наименьших затратах — индукция 0,5 мМ ИПТГ при 37°C в течение ночи. Нарботан и очищен путем последовательного применения нескольких видов хроматографии рекомбинантный белок CRM197. Для успешной очистки немеченого белка необходимо следовать многостадийному подходу для проведения извлечения, промежуточной и финишной очистки. Каждая из этих стадий решает свои задачи. При извлечении выделяют, концентрируют и стабилизируют целевой белок. При промежуточной очистке удаляют основные примеси, такие как нуклеиновые кислоты, эндотоксины и другие белки. И, наконец, на этапе финишной очистки достигается высокая чистота продукта путем удаления оставшихся примесей или близких по строению веществ. Высокоочищенный препарат рекомбинантного белка CRM197 (с чистотой 97%) был получен путем последовательного применения ионообменной, гидрофобной и молекулярно-ситовой хроматографий. С использованием гель-трoмб варианта ЛАЛ-теста определено содержание бактериального липополисахарида в препарате рекомбинантного белка CRM197, а именно, в препарате с концентрацией 1 мг/мл его содержится менее 0,125 ЕУ/мл. Максимально допустимый уровень эндотоксина при внутривенном введении — 5 ЕУ на кг массы тела в течение часа.

Таким образом, белок CRM197, являющийся нетоксичным вариантом дифтерийного токсина, представляет собой перспективный адъювант нового поколения, который может быть успешно использован в вакцинных и терапевтических препаратах. Получение CRM197

с использованием разработанного авторами высокопродуктивного штамма-продуцента на основе клеток *E. coli*, а также трехступенчатой очистки является конкурентоспособным вариантом и может быть внедрен в производственную практику.

Список литературы/References

- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol. 72, pp. 248–254.
- Bromuro C., Romano M., Chiani P., Berti F., Tontini M., Proietti D., Mori E., Torosantucci A., Costantino P., Rappuoli R., Cassone A. Beta-glucan-CRM197 conjugates as candidates antifungal vaccines. *Vaccine*, 2010, vol. 28, no. 14, pp. 2615–2623.
- Bryant K.A., Block S.L., Baker S.A., Gruber W.C., Scott D.A. PCV13 Infant Study Group. Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatrics*, 2010, vol. 125, no. 5, pp. 866–875.
- Dagan R., Poolman J., Siegrist C.A. Glycoconjugate vaccines and immune interference: a review. *Vaccine*, 2010, vol. 28, no. 34, pp. 5513–5523.
- DeWalt B.W., Murphy J.C., Fox G.E., Willson R.C. Compaction agent clarification of microbial lysates. *Protein Expr. Purif.*, 2003, vol. 28, no. 2, pp. 220–223.
- Gill C.J., Baxter R., Anemona A., Ciavarrò G., Dull P. Persistence of immune responses after a single dose of Novartis meningococcal serogroup A, C, W-135 and Y CRM-197 conjugate vaccine (Menveo®) or Menactra® among healthy adolescents. *Hum. Vaccin.*, 2010, vol. 6, no. 11, pp. 881–887.
- Hwang K.W. Haemophilus influenzae type b (Hib) vaccine and its carrier proteins. *Arch. Pharm. Res.*, 2010, vol. 33, no. 6, pp. 793–795.
- Kunami N., Yotsumoto F., Ishitsuka K., Fukami T., Odawara T., Manabe S., Ishikawa T., Tamura K., Kuroki M., Miyamoto S. Antitumor effects of CRM197, a specific inhibitor of HB-EGF, in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Res.*, 2011, vol. 31, no. 7, pp. 2483–2488.
- Kuo Y.C., Chung C.Y. Transcytosis of CRM197-grafted polybutylcyanoacrylate nanoparticles for delivering zidovudine across human brain-microvascular endothelial cells. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 2012, vol. 91, pp. 242–249.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685.
- Leka O., Vallese F., Pirazzini M., Berto P., Montecucco C., Zanotti G. Diphtheria toxin conformational switching at acidic pH. *FEBS J.*, 2014, vol. 281, no. 9, pp. 2115–2122.
- Li M., Su Z.G., Janson J.C. In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expr. Purif.*, 2004, vol. 33, no. 1, pp. 1–10.
- Park K. Targeted delivery to monocytes. *J. Control. Release*, 2012, vol. 158, no. 1, p. 1.
- Rivetti S., Lauriola M., Voltattorni M., Bianchini M., Martini D., Ceccarelli C., Palmieri A., Mattei G., Franchi M., Ugolini G., Rosati G., Montroni I., Taffurelli M., Solmi R. Gene expression profile of human colon cancer cells treated with cross-reacting material 197, a diphtheria toxin non-toxic mutant. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2011, vol. 24, no. 3, pp. 639–649.
- Safari D., Dekker H.A., De Jong B., Rijkers G.T., Kamerling J.P., Snippe H. Antibody- and cell-mediated immune responses to a synthetic oligosaccharide conjugate vaccine after booster immunization. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 38, pp. 6498–6504.
- Schenk G.J., Haasnoot P.C., Centlivre M., Legrand N., Rip J., De Boer A.G., Berkhout B. Efficient CRM197-mediated drug targeting to monocytes. *J. Control. Release*, 2012, vol. 158, no. 1, pp. 139–147.
- Shinefield H.R. Overview of the development and current use of CRM(197) conjugate vaccines for pediatric use. *Vaccine*, 2010, vol. 28, no. 27, pp. 4335–4339.
- Skinner J.M., Indrawati L., Cannon J., Blue J., Winters M., Macnair J., Pujar N., Manger W., Zhang Y., Antonello J., Shiver J., Caulfield M., Heinrichs J.H. Pre-clinical evaluation of a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15-CRM197) in an infant-rhesus monkey immunogenicity model. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 48, pp. 8870–8876.
- Stefan A., Conti M., Rubboli D., Ravagli L., Presta E., Hochkoeppler A. Overexpression and purification of the recombinant diphtheria toxin variant CRM197 in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 2010, vol. 156, no. 4, pp. 245–252.
- Studier F.W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.*, 2005, vol. 41, no. 1, pp. 207–234.
- Tang X.H., Deng S., Li M., Lu M.S. The anti-tumor effect of cross-reacting material 197, an inhibitor of heparin-binding EGF-like growth factor, in human resistant ovarian cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012, vol. 422, no. 4, pp. 676–680.
- Uchida T., Pappenheimer A.M.Jr., Greany R. Diphtheria toxin and related proteins. I. Isolation and properties of mutant proteins serologically related to diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.*, 1973, vol. 248, no. 11, pp. 3838–3844.

23. Van den Biggelaar A.H., Pomat W., Bosco A., Phuanukoonnon S., Devitt C.J., Nadal-Sims M.A., Siba P.M., Richmond P.C., Lehmann D., Holt P.G. Pneumococcal conjugate vaccination at birth in a high-risk setting: no evidence for neonatal T-cell tolerance. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 33, pp. 5414–5420.
24. Yotsumoto F., Oki E., Tokunaga E., Maehara Y., Kuroki M., Miyamoto S. HB-EGF orchestrates the complex signals involved in triple-negative and trastuzumab-resistant breast cancer. *Int. J. Cancer*, 2010, vol. 127, no. 11, pp. 2707–2717.
25. Zhang H.L., Yuan C., Zhang D.M., Shi H.S., Li M., Luo Z.C., Wan Y., Lu L., Luo S.T., Yang L. A novel combined conjugate vaccine: enhanced immunogenicity of bFGF with CRM197 as a carrier protein. *Mol. Med. Rep.*, 2011, vol. 4, no. 5, pp. 857–863.

Авторы:

Духовлинов И.В., к.б.н., начальник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Федорова Е.А., научный сотрудник ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Богомолова Е.Г., младший научный сотрудник ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Добровольская О.А., младший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Черняева Е.Н., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Аль-Шехадат Р.И., к.б.н., заместитель начальника лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия;

Симбирцев А.С., д.м.н., профессор, директор ФГУП ГосНИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Dukhovlinov I.V., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

Fedorova E.A., Researcher, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

Bogomolova E.G., Junior Researcher, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

Dobrovolskaya O.A., Junior Researcher, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

Chernyaeva E.N., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

Al-Shekhadat R.I., PhD (Biology), The Deputy Head, Laboratory of Genetic Engineering of Vaccines, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation;

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 15.01.2015
Отправлена на доработку 02.02.2015
Принята к печати 16.02.2015

Received 15.01.2015
Revision received 02.02.2015
Accepted 16.02.2015