

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201650120 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.06.29

(22) Дата подачи заявки
2016.12.01

(51) Int. Cl. C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C12N 15/72 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

(54) ШТАММ-ПРОДУЦЕНТ ECSOD НА ОСНОВЕ КЛЕТОК E.COLI ROSETTA (DE3)pLysS И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ECSOD

(96) 2016000108 (RU) 2016.12.01

(71) Заявитель:
ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "РД-
БИОТЕХ" (RU)

(72) Изобретатель:
Духовлинов Илья Владимирович,
Симбирцев Андрей Семенович (RU)

(74) Представитель:
Федорова Е.А. (RU)

(57) Изобретение относится к молекулярной биологии и биотехнологии и может быть использовано для получения экстраклеточной супероксид-дисмутазы (ECSOD). Предложен штамм-продуцент белка ECSOD (варианты) на основе клеток E.coli Rosetta (DE3)pLysSi плазмидной ДНК pColdIV, несущей ген, кодирующий субъединицу данного зрелого белка, кодонно оптимизированный для экспрессии в клетках E.coli. Также предложен способ получения белка ECSOD, позволяющий получать большие количества данного активного фермента.

A1

201650120

201650120

A1

Штамм-продуцент ECSOD на основе клеток *E.coli Rosetta (DE3)pLysS* и способ получения ECSOD

Изобретение относится к молекулярной биологии и биотехнологии и может быть использовано для получения экстраклеточной супероксид-дисмутазы (ECSOD).

Супероксиддисмутазы (СОД) представляют собой группу антиоксидантных ферментов, обеспечивающих защиту организма от постоянно образующихся высокотоксичных кислородных радикалов. СОД катализирует дисмутацию супероксида (O_2^-) в кислород (O_2) и пероксид водорода (H_2O_2) (McCord J.M., Fridovich I. (Nov 1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)". The Journal of Biological Chemistry. 244 (22): 6049–55.). Таким образом, СОД играет важнейшую роль в антиоксидантной защите практически всех клеток, так или иначе находящихся в контакте с кислородом.

Существует три основных семейства СОД, которые выделяют в зависимости от их фолдинга и металла-кофактора активного центра фермента (Miller A.F. "Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights". FEBS Lett. 2012 Mar 9;586(5):585-95. Review): Cu/Zn-СОД (медь как кофактор активного центра и цинк как кофактор, стабилизирующий конформацию), Fe-СОД и Mn-СОД (с железом или марганцем в активном центре), и Ni-СОД (с никелем). Cu/Zn-СОД представляют собой мономеры, и связывают по одному атому меди и цинка. Mn-СОД и Fe-СОД обычно представляют собой димеры или тетрамеры, состоящие из одинаковых субъединиц, которые связывают по одному атому металла на белковый димер (Harris J.I., Auffret A.D., Northrop F.D., Walker J.E. "Structural comparisons of superoxide dismutases". Eur J Biochem. 1980 May;106(1):297-303).

СОД различаются у разных организмов. Так, Mn-СОД и Fe-СОД чаще встречаются у прокариот (Miller A.F. "Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights". FEBS Lett. 2012 Mar 9;586(5):585-95. Review), в митохондриях и хлоропластах (Bridges S.M., Salin M.L. "Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants". Plant Physiol. 1981 Aug;68(2):275-8.). Ni-СОД встречаются у прокариот (впервые были обнаружены у *Streptomyces* sp.), таких как актинобактерии и цианобактерии (Miller A.F. "Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights". FEBS Lett. 2012 Mar 9;586(5):585-95. Review). Самая обширная группа, Cu/Zn-СОД, чаще всего встречается в клетках эукариот, включая человека.

В клетках человека представлены следующие подтипы СОД: цитоплазматическая Cu/Zn-СОД, митохондриальная MnSOD и экстраклеточная Cu/Zn-СОД (ECSOD). Такое

распределение в клетке и вне клетки подтипов СОД очень важно в компартментализованной окислительно-восстановительной передаче сигналов (Fukai T., Ushio-Fukai M.. "Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases". *Antioxid Redox Signal*. 2011 Sep 15;15(6):1583-606. Review).

Митохондриальная MnSOD представляет собой гомотетрамер с молекулярной массой 96 кДа и расположена в матриксе митохондрий (Fukai T., Ushio-Fukai M.. "Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases". *Antioxid Redox Signal*. 2011 Sep 15;15(6):1583-606. Review). Она кодируется ядерным геном и после трансляции транспортируется через две митохондриальные мембраны в матрикс. MnSOD вовлечена в поддержание наномолярных, физиологических уровней O_2^- и его вторичных частиц. На начальных стадиях образования опухоли MnSOD выступает в роли опухолевого супрессора (Miriya S., Spasojevic I., Tovmasyan A., Salvemini D., Vujaskovic Z., St. Clair D., Batinic-Haberle I. "Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics." *Biochim Biophys Acta*. 2012 May;1822(5):794-814. Review).

Цитоплазматическая Cu/Zn-СОД представляет собой основную внутриклеточную СОД. Она является гомодимером с молекулярной массой 32 кДа и в основном расположена в цитозоле, с присутствием небольшой фракции в межмембранном пространстве митохондрий (Crapo J.D., Oury T., Rabouille C., Slot J.W., Chang L.Y. "Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:10405–10409). Также сообщалось о присутствии данного подтипа СОД в ядре, лизосомах и пероксисомах, и было показано, что цитоплазматическая Cu/Zn-СОД представлена во многих типах клеток (Chang L.Y., Slot J.W., Geuze H.J., Crapo J.D. "Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes". *J Cell Biol*. 1988;107:2169–2179).

Экстраклеточная СОД (ECSOD, EC-SOD) регулирует окислительное повреждение и воспаление. Во внеклеточной жидкости она является преобладающей СОД (Marklund S.L. "Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79:7634–7638). ECSOD в больших количествах присутствует в лёгких, плевральной жидкости и сосудистой сети. В частности, ECSOD расположена в экстраклеточном матриксе в лёгких, эпителии лёгочных путей, в выстилке сосудов и на поверхности гладкой мускулатуры (Oberley-Deegan R.E., Regan E.A., Kinnula V.L., Crapo J.D. "Extracellular superoxide dismutase and risk of COPD". *COPD*. 2009 Aug;6(4):307-12. Review). ECSOD представляет собой тетрамерный гликопротеин с молекулярной массой 135000 Да, обладающий N-

концевой сигнальной последовательностью для секреции из клетки, активным доменом, связывающим Cu/Zn, на 50% гомологичным СОД1, и С-концевым гепарин-связывающим доменом (Folz R.J., Crapo J.D. "Extracellular superoxide dismutase (SOD3): tissue-specific expression, genomic characterization, and computer-assisted sequence analysis of the human EC SOD gene". *Genomics*. 1994;22:162–171). Положительно заряженный гепарин-связывающий домен позволяет ECSOD связываться с отрицательно заряженными внеклеточными элементами матрикса (такими, например, как коллаген, гиалуроновая кислота и гепарансульфат) и клетками эндотелия (Inoue M., Watanabe N., Matsuno K., Sasaki J., Tanaka Y., Hatanaka H., Amachi T. "Expression of a hybrid Cu/Zn-type superoxide dismutase which has high affinity for heparin-like proteoglycans on vascular endothelial cells". *J Biol Chem*. 1991;266:16409–16414). Распределение ECSOD во внеклеточных компонентах указывает на то, что данный фермент играет важную роль в защите внеклеточных белков матрикса от повреждений, вызванных свободными радикалами, окислительным стрессом и, возможно, в защите тканей от хронического воспаления (Marklund S.L. "Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79:7634–7638). Кроме того, ECSOD играет важную роль в патофизиологии различных заболеваний и состояний, связанных с окислительным стрессом, включающих повышенное артериальное давление, сердечную недостаточность, ишемическое и реперфузионное повреждение, повышенную агрегацию тромбоцитов и атеросклероз (Fukai T., Ushio-Fukai M.. "Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases". *Antioxid Redox Signal*. 2011 Sep 15;15(6):1583-606. Review).

Поскольку сердечно-сосудистые заболевания являются главной причиной смерти в мире (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru/index2.html>), вышеуказанные заболевания являются ведущей причиной смертности в мире, в особенности ишемическая болезнь сердца (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/ru/>), ситуация по данному вопросу крайне острая. Крайне важно развивать направление лечения с использованием веществ, позволяющих решать проблему, причем достаточно быстро.

В условиях нормального обмена СОД поддерживают стационарную концентрацию супероксидных радикалов на определенном уровне, защищая тем самым клеточные структуры от повреждающего действия и способствуя модулированию клеточных сигналов, связанных с патофизиологией различных заболеваний и состояний. Именно поэтому антиоксидантные ферменты, такие как СОД, являются возможными кандидатами на роль лекарственных средств (Fukai T., Ushio-Fukai M.. "Superoxide dismutases: role in

redox signaling, vascular function, and diseases". *Antioxid Redox Signal*. 2011 Sep 15;15(6):1583-606. Review).

Соответственно, учитывая потенциал ECSOD в защите от наиболее смертельно опасных заболеваний в мире, который сложно переоценить, получение данного активного фермента в больших количествах является актуальной задачей. Авторы настоящего изобретения считают его получение с использованием технологии рекомбинантной ДНК наиболее оптимальным вариантом.

На данный момент известно получение СОД с использованием следующих штаммов-продуцентов на основе клеток *Escherichia coli* (*E. coli*).

Для получения рекомбинантной СОД чаще всего применяются штаммы *E. coli* BL21 и K12 (Marisch K., Bayer K., Cserjan-Puschmann M., Luchner M., Striedner G. "Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production". *Microb Cell Fact*. 2013 Jun 11;12:58). Однако следует принимать во внимание некоторые недостатки такой экспрессионной системы, например, ограниченную возможность образования дисульфидных связей (Makrides S.C. "Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*". *Microbiol Rev*. 1996, 60: 512-538). Очень важен также подбор вектора, с которого синтезируется таргетный белок. Для получения больших количеств рекомбинантного белка промотор должен быть сильным и индуцируемым и проявлять минимальный уровень базальной транскрипционной активности (Marisch K., Bayer K., Cserjan-Puschmann M., Luchner M., Striedner G. "Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production". *Microb Cell Fact*. 2013 Jun 11;12:58).

В настоящее время известны продуценты СОД на основе штамма BL21 и плазмидных ДНК на основе рЕТ-векторов, из следующих документов: WO 2011/141528 A1 (11.05.2010), US 8853374 B2 (19.09.2006), WO 2016/012607 A1 (29.01.2015), US 7833752 B2 (31.01.2007), WO 2015/184466 A1 (30.05.2014), PCT/IL2001/000870 (18.09.2000). Также известны продуценты на основе штамма C600 и его производных (US 6399331 B2 (11.09.1987) и AU577298 B2 (15.07.1983)) и других штаммов, таких как, например, JM109, TGI, TG2, DHcc, и XLlblue (PCT/IL2001/000870 (18.09.2000)). Однако в вышеуказанных документах не приведена принадлежность СОД к тому или иному организму, тип и подтип СОД.

Также известны продуценты СОД эукариот (EP 0768382 B1 (13.10.1995)) и млекопитающих (US 8426167 B2 (22.06.2001)) на основе штамма BL21 и плазмидных ДНК на основе рЕТ-векторов, или на основе других штаммов *E. coli*, например, таких как K12

MM294 (ATCC 31446); X1776 (ATCC 31537); W3110 (ATCC 27325) и K5772 (ATCC 53635) (RU 2594163 C2 (25.05.2010)); 294 (ATCC 31446) (RU 2433185 C2 (11.03.2004)), 33D3, 63C1, 64B4 27C7, 64B4, JM109 (RU 2585488 C2 (05.11.2009)), или HM114 (RU 2287574 C2 (14.12.2000)). Однако в данных документах также не уточнена принадлежность СОД к тому или иному организму и не указаны тип и подтип СОД.

Известны продуценты СОД человека (CN102533687 (24.02.2012), AU 2008252990 B2 (17.05.2007)) на основе штамма BL21 и плазмидных ДНК на основе рЕТ-векторов, однако в данных документах не указаны тип и подтип СОД.

Из документа CN104450634 (A) (12.12.2014) известен продуцент Cu/Zn-СОД человека на основе штамма BL21 (DE3) и плазмидной ДНК на основе рЕТ-вектора, который позволяет сохранить природную активность СОД до 13000 Ед./г (в примерах 3300 Ед./мг, около 12300 Ед./мг), однако не указано, СОД - экстраклеточная или цитоплазматическая.

Кроме того, известны продуценты Cu/Zn-СОД человека на основе штамма С600 и его производных. Так, в документе US 5455029 А (27.08.1984) раскрыты продуценты на основе штамма *E. coli* А1645; прототрофных штаммов *E. coli* А4200 и А4255 и литических штаммов *E. coli* А4048, А1637, полученных из штамма С600 путем вставки транспозона, содержащего ген устойчивости к тетрациклину в галактозном опероне, а также лямбда системы для экспрессии, которая близка к галактозному оперону. Ферментативная активность аналогов СОД определялась путем мониторинга ингибирования восстановления феррицитохрома С, как описано McCord и Fridovich в J. Biol. Chem. (1969), 244: 6049-6055. Результаты показали, что активность продуцируемого pSODB1 T11 аналога СОД сопоставима с таковой естественной человеческой СОД (Sigma) (Superoxide Dismutase from human erythrocytes) и бычьей СОД (Orgotein: Grunenthal GMBH). В документе US 6030611 А (27.08.1984) предпочитаемая клетка-хозяин - *Escherichia coli*, в частности, автотрофного штамма А1645; прототрофных - А4200 и А4255, и литического А4048. Штамм А1637 получен из штамма С600 *E. coli*. Получаемый полипептид имеет активность природного, даже после неоднократных лиофилизаций. Из документов AU 603331 В2 (27.08.1984) и AU 671728 В2 (27.08.1984) известны продуценты Cu/Zn-СОД человека на основе штаммов *Escherichia coli* А1645 и А1637, фенотипа С600, причем получаемый аналог SOD был сравним с СОД человека - SOD (Sigma), - и бычьей СОД (Orgotein: Grunenthal GMBH); аналогичные продуценты раскрыты в документах IL 76192 (27.08.1984) и IL 110039 (27.08.1984), причем полученный полипептидный аналог человеческой Cu/Zn супероксиддисмутазы имел идентичную аминокислотную

последовательность и активность естественной человеческой Cu/Zn супероксиддисмутазы; аналогичные продуценты раскрыты в документах US 5143836 (27.08.1984) и US 5112744 (27.08.1984), причем получаемый аналог SOD был сравним с СОД человека - SOD (Sigma), - и бычьей СОД (Orgotein: Grunenthal GMBH). Однако во всех вышеупомянутых документах не указан подтип получаемой СОД (цитоплазматическая или внеклеточная).

Также известны продуценты Cu/Zn-СОД человека на основе других штаммов *Escherichia coli*, таких как штамм K12 (JPH0757193 (B2) (05.08.1987)), ATCC 15224 (JP2650867 (B2) (21.03.1994)), A4255, A4275, A5277, A4278, A4280, A4255 (F⁻) и Sφ930 (F⁻) (EP0303972 (A2) (14.08.1987)), причем полученные полипептидные аналоги имеют биологическую активность и аминокислотную последовательность, которая в значительной степени сходна, но все же отличается от полипептида естественного происхождения или аналогов, имеющих аминокислотную последовательность, идентичную полипептиду естественного происхождения, отличающихся в том, что полипептид ацетилирован или не гликозилирован. По примерам: активность фермента супероксиддисмутазы была измерена в сырых экстрактах по методу McCord и соавторов, J. Biol. Chem. 244: 6049-6055 (1969). Высокоочищенная СОД, около 4000 единиц/мг белка, была использована в качестве стандарта, причем метка белка на SDS геле и ферментативная активность были согласованы. При OD₆₆₀ = 30, активность фермента hSOD в среде - 0,45 г/л., в штаммах *Escherichia coli* W3110 (ATCC27325) (JPH0644875 (B2) (26.08.1986)), N4830 (JPH0646860 (A) (25.09.1992)), N4830 (JPS61139390 (A) (13.12.1984)), D1210 (pSODX8) ATCC No. 39453, D1210 (pSOD11) и D1210 (pS2OR) (US5066591 (A) (03.10.1983), EP0656418 (A1) (03.10.1983). Ферментативная активность Cu/Zn SOD человека, получаемой в штамме *E. coli* D1210 (pSODX8), была 685-3,017 ед. SOD/мг белка), в штаммах *E. coli* A4255 ATCC No. 67177, *E. coli* MC 1061, Sφ930 ATCC No. 67706 (US6010875 (A)), по примерам, активность фермента - аналога супероксиддисмутазы, - была измерена в сырых экстрактах путем мониторинга ингибирования восстановления феррицитохрома C, как описано McCord и Fridovich в J. Biol. Chem. (1969), 244: 6049-6055, результаты экспериментов свидетельствуют о том, что тетрациклин-резистентная плазмида pMF-5520 позволяет получить уровень фермента - hSOD аналога, - несколько выше, чем ампициллин-устойчивая плазмида pMF-5519, и наглядно демонстрируют, что высококопийная плазмида pMF-2005, содержащая deo P1-P2, позволяет получить примерно вдвое больше фермента - аналога hSOD, чем и другие deo P1-P2 вектора. Однако в вышеупомянутых документах не уточнен подтип СОД.

Из документа KR20140015967 (А) (27.07.2012) известен продуцент внеклеточной Cu/Zn-СОД человека (EC-SOD) на основе штамма BL21 и плазмидных ДНК на основе pET-векторов, причем белок EC-SOD человека растворим в воде при гиперэкспрессии и очистке, из-за обязательного довеска, увеличивающего растворимость. Возможен и вариант получения HBD truncated EC-SOD, СОД с удаленным гепарин-связывающим доменом, также с довеском. В примерах указано о возможности использования плазмиды pET22b для получения множества гибридных белков, со связью довеска у N-конца. Ген, кодирующий EC-SOD, был предоставлен Yonsei University College of Nursing и амплифицирован с использованием праймеров. Для удаления довеска от EC-SOD, в белок был введен сайт узнавания для TEV протеазы перед последовательностью EC-SOD. Довески: His6-, His6-Trx-, His6-GST-, His6-MBP-, His6-NusA-, штамм: *Escherichia coli* BL21 (DE3). Ген кодонно оптимизировали. Трансформанты культивировали при 37° С, в среде LB с ампициллином (50 мкг/мл) до O.D.600 0.3 - 0.4. Индуцировали экспрессию гена 0,5 mM ИПТГ в течение 3 ч при 30°С. Собирали клетки центрифугированием, замораживали. Выделение EC-SOD: осадок клеток с тагом MBP у EC-SOD ресуспендировали в буфере 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, ингибиторы протеаз (EDTA-free, Roche), 5% глицерин, 0.1% Triton-X100, разрушали ультразвуком (Vibra-Cell Ultrasonic Processor) на льду. Лизат центрифугировали для удаления клеточного дебриса, при 4°С, в течение 30 минут при 12,000 rpm. Супернатант наносили на MBP Trap HP column (GE Healthcare Life Sciences) в buffer solution A (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 5% глицерин, 1 mM DTT). Затем отмывали колонку буфером А, разведенным в 5-кратном объеме колонки buffer solution В (20 mM мальтозы добавлено к буферу А). Затем проводили диализ в растворе 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), к которому добавлены 5% глицерин и 1 mM DTT, затем наносили на HP HiTrap Q анионообменную колонку (GE Healthcare Life Sciences). MBP-His6-EC-SOD элюировали линейным градиентом 0-1M NaCl в том же буфере (linear gradient). Собирали фракции и разводили для уменьшения концентрации солей. Далее отщепляли MBP-His6 по сайту действия TEV протеазы (ENLYFQ / G) от белка MBP-His6-EC-SOD при 18°С, 2 мкг белка и 1 мкг TEV протеазы, реакцию осуществляли в течение 16 ч. Наносили далее раствор на HiTrap™ Heparin HP column (GE Healthcare Life Sciences), вносили буфер С (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5% глицерин, 1 mM DTT), наносили раствор обратно на HP HiTrap Q анионообменную колонку (GE Healthcare Life Sciences). EC-SOD связывалась с колонкой, растворялась в буфере с концентрацией NaCl 300-500 mM. В итоге выделили более 95% белка, все стадии контролировали SDS-PAGE. Измерение (in vitro) активности hEC-SOD: с использованием

WST-1 метода (J. Immunol. Methods. (2000)238: 59-68). EC-COD получали в конечной концентрации 0,05 М карбоната натрия (sodium carbonate) (pH 9.0), 1,0 ед каталазы (catalase), 10⁻⁴ М ксантина (xanthine), 5,6×10⁻⁶ М WST-1, 3,7 мЕд ксантиноксидазы, осуществляли реакцию при 25° С в течение 20 мин, в ячейку спектрофотометра вносили реакционную смесь, содержащую ксантиноксидазу, анализировали при 450 нм. Чтобы построить стандартную кривую по известной концентрации белка SOD1 (Worthington), был измерен отрицательный контроль, по сравнению с активностью EC-SOD образца субстрата (образец за вычетом отрицательного контроля), в качестве референсного. Было показано, что MBP-hEC SOD не имела COD-активности, даже после этапа связывания с металлом. После отщепления MBP тага активность hEC-SOD составила 124,7 ± 1,63 ед/мг, что выше, чем после рефолдинга, 48,6 ± 1,20 ед/мг EC-SOD.

Однако считаем, что добавление довеска, который необходимо отщеплять, усложняет процесс получения белка, что также уменьшает конечный выход белка, кроме того, возникает вероятность проникновения в смесь с конечным белком белка с неотщепившимся довеском, что может приводить к непредсказуемым последствиям. Кроме того, количество секретируемого белка зачастую ниже, чем при накоплении в клетке. Также следует учитывать, что даже при использовании системы с секрецией фолдинг белка может произойти не оптимально, что все равно потребует стадии рефолдинга, дополнительно к стадии отщепления довеска, что усложняет способ получения белка. В случае предложенного авторами настоящего изобретения также предлагается продуцент зрелой ECSOD, из субъединиц типа С, содержащей домен, связывающийся с экстраклеточным матриксом (HBD-binding domain).

Из документа US 8980841 B2 (22.03.2007), в котором, считаем, описан прототип штамма-продуцента и способа получения ECSOD с его использованием, также известен продуцент внеклеточной Cu/Zn-COD человека (EC-SOD) на основе штамма BL21 и плазмидных ДНК на основе рЕТ-векторов. Выход белка не указан. Более конкретно, в документе предложен способ лечения заболевания из аллергической астмы или анафилактического шока, по которому пациент получает эффективное количество EC-SOD. Для получения рекомбинантного белка EC-SOD, имеющего биологическую активность, клонировали ген, кодирующий EC-SOD из 209 а.о., без сигнального пептида на N-конце hEC-SOD и без 13 а.о. на С-конце. Фрагмент амплифицировали ПЦР, с использованием полимеразы PfuI, 95° С 5 мин, 30 циклов по 30 сек при 95°С, 30 сек при 55° С и 1 мин при 72° С, затем 72° С в течение 5 мин. Амплифицированный ген был рестрицирован EcoRI и XhoI, и затем лигирован в вектор рЕТ28а (NovaGene, USA), с

использованием T4 лигазы при 4°C в течение 12 ч. Вектором трансфецировали клетки *E. coli* DH5a, затем культивировали трансформанты на среде LB, содержащей 25 мг/мл канамицина, затем проводили скрининг клонов анализом генетической последовательности. Из получившихся клонов выделяли вектор и вводили в клетки *E. coli* BL21 (NovaGene, USA) для экспрессии целевого гена, затем культивировали трансформанты на среде LB, содержащей 25 мг/мл канамицина, затем проводили скрининг клонов анализом генетической последовательности. После завершения экспрессии, клетки были собраны из культуральной среды центрифугированием и ресуспендированы в буфере 50 мМ Трис (pH 7,5), содержащем 100 мМ хлорида кальция, и были разрушены ультразвуковым дезинтегратором. Суспензию клеток центрифугировали, супернатант отбрасывали, осадок промывали три раза 50 мМ Трис-буфером, содержащим 100 мМ хлорида кальция. Промытый осадок содержал тельца включения. 10 мг отмытых телец включения (содержание гибридного белка 50%) добавляли в буферный раствор Трис (50 мМ Трис-Cl, 100 мМ NaCl, pH 7,5), а затем растворяли добавлением 8М мочевины. После того, как тельца включения были полностью ресуспендированы при комнатной температуре в течение 2 часов, они были подвергнуты разделению на фазы центрифугированием. Собирали верхний водный слой, потому что в нем содержались растворенные тельца включения рекомбинантного EC-SOD (раствор телец включения). Рефолдинг и очистку рекомбинантного EC-SOD белка проводили следующим образом с помощью быстрой очистки белков методом жидкостной хроматографии (FPLC). Буферный раствор (8 М мочевины, 50 мМ Трис-Cl, 100 мМ NaCl, pH 7,5) был введен в хроматографическую колонку, набитую смолой, обладающей аффинностью к металлу (5 мл удерживающей His сырой FF, GE Healthcare, США), при скорости потока 1 мл/мин для уравнивания колонки, а затем 5 мл раствора полученных телец включения вводили в верхнюю часть хроматографической колонки, набитой смолой, обладающей аффинностью к металлу (3 мл) со скоростью потока 1 мл/мин, так что фолдированный белок адсорбировался на твердой матрице в колонке. После завершения введения, 50 мл буферного раствора вводили сверху вниз в верхнюю часть колонки при скорости потока 1 мл/мин с целью удаления не поглощенного вещества. После того как твердые частицы клетки полностью были удалены из колонки, как описано выше, Трис-буферный раствор (50 мМ Трис-буфер, 1 М мочевины, 100 мМ NaCl, 100 мМ ZnCl₂, 50 М CuSO₄, pH 7,5), содержащий 1 М мочевины и содержащий атомы Zn и Cu, оказывающие влияние на активность EC-SOD, вводили сверху вниз в верхнюю часть колонки со скоростью потока 0,5 мл/мин при применении линейного градиента концентрации, таким образом,

постепенно снижая концентрацию денатурирующих агентов в колонке. Для того, чтобы удалить большое количество имидазола от элюированного белка, полностью фолдировать белок и отделить белок по размеру, использовали колонки для быстрой очистки белков методом жидкостной хроматографии (FPLC) и гель-фильтрации методом колоночной хроматографии (колонка с Sepharose 12). Конечный выход белка не указан.

Для того, чтобы выяснить, имеет ли биологическую активность СОД полученный в очищенном виде рекомбинантный белок EC-SOD, активность данного рекомбинантного белка была проверена с помощью набора реактивов WST (Dojindo Molecular Technology, USA) согласно инструкции производителя. В результате образец (209FT), элюированный и не адсорбированный в процессе очистки, никакой активности не проявлял, изначально очищенный рекомбинантный EC-SOD (209 E1), рефолдированный с использованием металл-хелатной хроматографии, на соответствующей колонке, продемонстрировал активность 250 ед/мг белка, и рекомбинантный EC-SOD (209 E2), выделенный и очищенный с помощью гель-фильтрации на соответствующей колонке, продемонстрировал активность 360 ед/мг белка.

Ввиду особенностей использования данного белка в вышеуказанном изобретении, была удалена часть гепарин-связывающего домена. В случае предложенного авторами настоящего изобретения предлагается продуцент зрелой ECSOD, как таковой из субъединиц типа А, т.е. также без данного домена, так и таковой из субъединиц типа С, в последнем случае содержащей домен, связывающийся с экстраклеточным матриксом (HBD-binding domain).

Также авторы (прототип) вводили полигистидиновый довесок на конце белка, однако считаем, что для промышленного применения такой вариант не подходит, поскольку довесок нужно удалять, и данная стадия усложняет процесс получения белка и уменьшает конечный выход белка.

Таким образом, на данный момент не выявлены продуценты ECSOD на основе клеток *E.coli*, позволяющие получать готовый для использования фермент ECSOD, т.е. без сигнального пептида, без довеска, в большом - промышленном - количестве, а также способы получения данного белка с их использованием, приемлемые для промышленного применения, для получения безопасного и высокоактивного продукта.

Следует отметить, что клеточные реакции, вызванные рекомбинантным белком, сходны с тепловым шоком и вызывают у *E. coli* строгий ответ (Hoffmann F., Rinas U. "Stress induced by recombinant protein production in Escherichia coli". Adv Biochem Eng Biotechnol. 2004;89:73–92.). Не каждый гетерологичный белок, в том числе СОД, в том

числе ECSOD, удается получить с использованием той или иной экспрессионной системы на основе клеток *Escherichia coli*. Разработка новых продуцентов рекомбинантных белков, в частности, ECSOD, готовых для использования, в том числе суперпродуцентов, и оптимальных способов получения данного активного фермента, гомогенной смеси, в больших количествах представляет собой актуальную проблему.

Авторами настоящего изобретения предлагается решение поставленных задач.

Технический результат от использования предложенного штамма-продуцента (вариантов) и способа заключается в получении высокоактивного фермента ECSOD, благодаря, помимо структурных особенностей получаемого белка, добавлению стадии формирования дисульфидных мостиков, а также добавлению ионов меди и цинка на последней стадии очистки, а также использованию последовательных стадий очистки и фолдинга белка, с предварительным выделением белка из телец включения с использованием буфера 2 М мочевины, 100 мМ трис-HCl, 5 мМ метионин, 0,013% бридж 35, pH 12,5, в течение 2 ч.

Технический результат от использования предложенного штамма-продуцента (вариантов) и способа заключается и в большом количестве получаемого активного фермента, за счет использования клеток исходного штамма Rosetta(DE3)pLysS и плазмидной ДНК pColdIV, а также использования оптимизированного по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих гена, кодирующего субъединицу А, либо С ECSOD, без секреторного пептида, клонированного в векторе таким образом, что белок синтезируется без довесков, что позволило получить высокопродуктивный штамм, а также за счет отсутствия потерь белка в процессе отщепления довеска благодаря отсутствию данной стадии.

Технический результат от использования предложенного штамма-продуцента (вариантов) и способа получения ECSOD также выражается в увеличении безопасности получаемого фермента и, соответственно, уменьшении осложнений от его использования, за счет отсутствия риска недоотщепления довесков к белку.

Технический результат от использования штамма (вариантов) и способа получения ECSOD по изобретению заключается также в расширении спектра таковых. При невозможности применения аналогов, либо нежелании использовать аналоги, в том числе ввиду их вышеописанных недостатков, данный штамм (варианты) и способ с его использованием позволят получить активную ECSOD в больших количествах. В связи с тем, что проблема сердечно-сосудистых заболеваний стоит очень остро в мире,

предложенные изобретения позволят увеличить шансы в борьбе с данным широко распространенным недугом.

Сущность изобретения

Предложен штамм-продуцент белка ECSOD, субъединица которого охарактеризована SEQ ID NO:1, либо а.о. 1-209 SEQ ID NO:1, на основе клеток *E.coli* Rosetta (DE3)pLysS, содержащий плазмидную ДНК pColdIIV, несущую ген, кодирующий указанную субъединицу, А или С типа, кодонно оптимизированный для экспрессии в клетках *E.coli*, а также способ получения данного белка, заключающийся в том, что культивируют клетки данного штамма-продуцента, с использованием индуктора экспрессии таргетного белка, лизируют клетки, отмывают тельца включения, выделяют белок из телец включения с использованием буфера 2 М мочевины, 100 мМ трис-HCl, 5 мМ метионин, 0,013% бридж 35, pH 12,5, в течение 2 ч, осуществляют очистку белка, включающую, последовательно, анионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, диализ с экспозицией агента, восстанавливающего дисульфидные связи, гель-фильтрацию с экспозицией ионам Cu и Zn. Способ получения подробно описан в примерах.

Результаты исследований проиллюстрированы примерами 1-5.

Пример 1. Создание штамма-продуцента белка ECSOD

1.1. Создание нуклеотидной последовательности, кодирующей субъединицу белка ECSOD

Аминокислотные последовательности субъединиц типа А и С белка ECSOD человека (без секреторного пептида), охарактеризованных SEQ ID NO:1 и а.о. 1-209 SEQ ID NO:1, переводили в нуклеотидные с одновременной кодонной оптимизацией для экспрессии в клетках *E.coli* с использованием программы на сайте molbiol.ru, а также добавлением двух стоп-кодонов, получая последовательность, например, SEQ ID NO:2 и п.о. 1-627 SEQ ID NO:2, добавлением двух стоп-кодонов, соответственно, и добавлением сайтов рестрикции NdeI и XbaI, на N- и C-конце полученной последовательности, соответственно. Кодонная оптимизация для экспрессии в клетках *E.coli* может быть проведена и с использованием иных программ, а также вручную.

Рассчитанные нуклеотидные последовательности синтезировали химическим методом с помощью синтезатора ДНК ASM-800 (БИОССЕТ, Россия).

1.2. Создание плазмидной ДНК, кодирующей белок ECSOD

Полученные гены клонировали в плазмиде pColdIV для последующей экспрессии. Для этого проводили реакцию рестрикции с использованием упомянутых выше рестриктаз, а затем лигирования гена и вектора pColdIV, с использованием соответствующего буфера и лигазы, при +20°C в течение 2 часов.

Смесь прогревали при +95°C в течение 10 мин и очищали от солей диализом на нитроцеллюлозных фильтрах с диаметром пор 0,025 мкм (Millipore, США). Диализ проводили против раствора, содержащего 0,5 мМ ЭДТА в 10% глицерине, в течение 10 мин.

1.3. Создание штамма *E.coli* для амплификации полученной плазмидной ДНК.

Полученной плазмидой трансформировали клетки *E. coli* штамма DH10B/R (Gibco BRL, США) с генотипом F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80dlacZ Δ M 15 Δ lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)769 galU galK λ - rpsL nupG.

Подготавливали вышеуказанные клетки *E. coli* следующим образом. Инкубировали клетки при +37°C в течение ночи в 5 мл L-бульона, содержащего 1% триптон, 1% дрожжевой экстракт и 1% натрий хлористый. Разводили культуру свежим L-бульоном в 50-100 раз и выращивали на качалке при +37°C до оптической плотности 0,2-0,3 при длине волны 590 нм. При достижении оптической плотности более 0,3 культуру разводили свежим L-бульоном до оптической плотности 0,1 и растили 30 мин. Переносили 100 мл культуры в стерильную центрифужную пробирку и осаждали клетки при +4°C на 5000g в течение 10 мин. Супернатант сливали, клетки ресуспендировали в деионизованной воде в исходном объеме с последующим центрифугированием. Процедуру отмывки повторяли трижды. После отмывки осадок клеток ресуспендировали в малом объеме деионизованной воды и центрифугировали 30 сек. при 5000 об/мин. на микроцентрифуге.

Трансформацию компетентных клеток осуществляли методом электропорации. Для этого 1 мкл плазмидной ДНК добавляли к 12 мкл компетентных клеток, перемешивали и проводили электропорацию с использованием электропоратора MicroPulser (BioRad) в стерильных ячейках при электрическом импульсе напряженностью 10 кВ/см длительностью 4 мсек.

После трансформации клетки инкубировали в SOC-среде (2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄, 20 мМ глюкоза) в течение 40 мин при +37°C.

Проводили скрининг клеток *E.coli* на наличие плазмид на селективной среде, содержащей LB-агар, 50 мкг/мл ампициллина. Выросшие на селективной среде колонии клеток *E.coli* проверяли на наличие вставки таргетного гена.

Из выросших клонов выделяли плазмидную ДНК с использованием набора Wizard Minipreps DNA Purification System (Promega, США). Очищенную плазмидную ДНК проверяли с помощью секвенирования с использованием стандартных праймеров для секвенирования для используемой плазмидной ДНК. В ходе работы были отобраны клоны, содержащие требуемый фрагмент ДНК в составе плазмиды, - штамм *E.coli* для амплификации плазмидной ДНК, содержащей таргетный ген, - из которого такие плазмиды были выделены для дальнейшего создания штамма-продуцента.

1.4. Создание штамма-продуцента ECSOD на основе клеток *Escherichia coli* Rosetta (DE3)pLysS.

Для экспрессии гена, кодирующего субъединицу типа А или С белка ECSOD, с полученной плазмиды, использовали клетки *E.coli* штамма Rosetta (DE3)pLysS (Novagen®), с генотипом F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pLysSRARE (CamR), содержащие в геноме λ De3 лизоген, pLysS. Наличие pLysS позволяет супрессировать базальную экспрессию T7 РНК-полимеразы, до индукции. OmpT-мутация по гену протеазы позволяет получать непротеолизированные рекомбинантные белки в больших количествах.

Подготавливали и трансформировали вышеуказанные клетки *E. coli* по п.1.3.. После трансформации клетки инкубировали в SOC-среде (2% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 10 мМ MgSO₄, 20 мМ глюкоза) в течение 40 мин. при +37°C. 10–100 мкл клеточной суспензии высевали на селективную LB-среду (Gibco BRL, США), содержащую ампициллин (50 мкг/мл), для отбора клонов, содержащих плазмиды (штаммов-продуцентов).

Полученная плазмида обеспечивала высокий уровень биосинтеза целевого рекомбинантного белка, закодированного в ней.

Таким образом, получили штамм-продуцент белка ECSOD на основе субъединиц типа А, т.е. без домена, связывающегося с экстраклеточным матриксом, и штамм-продуцент белка ECSOD на основе субъединиц типа С, т.е. с доменом, связывающимся с экстраклеточным матриксом, каждый на основе клеток *Escherichia coli* Rosetta (DE3)pLysS и плазмидной ДНК pColdIV.

Пример 2. Получение ECSOD в клетках штамма-продуцента *E.coli*

2.1. При индукции синтеза белков 0.2% лактозой по методу Штудьера

Для культивирования полученных штаммов-продуцентов использовали стандартную агаризованную LB-среду, содержащую ампициллин в концентрации 50 мкг/мл и глюкозу в концентрации 1% для блокирования неспецифической экспрессии.

Индукцию экспрессии проводили при достижении культурой клеток оптической плотности 0.6-0.8 оптических единиц при длине волны 600 нм.

Для автоиндукции экспрессии по методу Штудьера использовали среду PYP-5052, состоящую из 1% пептона (Gibco, США), 0.5% дрожжевого экстракта (Gibco, США), 50 мМ Na₂HPO₄, 50 мМ K₂HPO₄, 25 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgSO₄, 0.5% глицерола, 0.05% глюкозы и 0.2% лактозы, в качестве индуктора использовали 0.2% лактозу (Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr Purif. 2005 May;41(1):207-34).

В среду PYP-5052, содержащую ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, инокулировали единичную колонию штамма-продуцента. Ферментацию проводили при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об. мин. в течение 20 часов до отсутствия существенного изменения ОП₆₀₀ за 1 час. Отбирали аликвоту на анализ экспрессии гена, кодирующего белок ECSOD, методом электрофореза в ПААГ, а оставшуюся биомассу осаждали центрифугированием при 9000g.

Клетки ресуспендировали в лизирующем буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl pH 7,5, 5 мМ ЭДТА и 1 мМ феноксиметилсульфонилфторид, из расчета на 1 г клеток 5-7 мл буфера. Суспензию клеток обрабатывали ультразвуком 7 раз по 30 сек с интервалом в 30 сек (частота ультразвука составляет 22 кГц), отбирали пробу на анализ SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis with Sodium dodecyl sulfate). Полученный препарат содержал около 26% белка ECSOD от общего количества белков *E.coli*, в случае белка на основе субъединиц типа C, и 24% в случае белка на основе субъединиц типа A.

Лизат центрифугировали 10 мин. при +4°C, 5000 g. Отбирали пробу надосадочной жидкости (супернатанта) и осадка для анализа локализации белков и оценки их растворимости, с использованием SDS-PAGE. Осадок содержал белок, соответствующий по молекулярной массе ECSOD, таким образом, анализ продемонстрировал нерастворимость полученного белка, в обоих случаях (на основе субъединиц A и C).

Супернатант сливали, к осадку добавляли раствор 1 М мочевины из расчета 10 мл на 1 г клеток, интенсивно перемешивали. Повторяли центрифугирование. Супернатант сливали, осадок ресуспендировали в растворе 2М мочевины того же объема. Повторяли

центрифугирование, сливали супернатант, осадок (тельца включения) использовали для выделения белка ECSOD.

2.2. при индукции синтеза белков ИПТГ.

Индукцию экспрессии генов с использованием ИПТГ осуществляли следующим образом. Инкубировали клетки единичной колонии штамма-продуцента 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 мМ, 0,5 мМ или 1 мМ. Индукцию проводили в течение 18 часов для определения оптимальной концентрации индуктора для получения высокого уровня экспрессии таргетного гена, после чего отбирали пробу для анализа с использованием SDS-PAGE, клетки концентрировали с помощью центрифугирования.

Также проводили индукцию экспрессии гена следующим образом. При достижении культурой клеток оптической плотности 0.4-0.5 оптических единиц при длине волны 600 нм, быстро остужали питательную среду до 15°C и оставляли на 30 мин. Далее добавляли ИПТГ к культуре до конечной концентрации 0,5 мМ и продолжали культивирование при 15°C в течение 24 ч, после чего отбирали пробу для анализа с использованием SDS-PAGE, клетки концентрировали с помощью центрифугирования.

Клетки ресуспендировали в лизирующем буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl pH 7,5, 5 мМ ЭДТА и 1 мМ феноксиметилсульфонилфторид, из расчета на 1 г клеток 5-7 мл буфера. Суспензию клеток обрабатывали ультразвуком 7 раз по 30 сек с интервалом в 30 сек (частота ультразвука составляет 22 кГц), отбирали пробу на анализ SDS-PAGE. Накопление белка оказалось примерно одинаковым в случае белка ECSOD на основе субъединиц типа А и в случае белка ECSOD на основе субъединиц типа С. Полученный препарат содержал при индукции при 37° после оптимального времени индукции в случае использования 0,1 мМ ИПТГ около 20% белка ECSOD от общего количества белков *E.coli*, при индукции 0,5 мМ ИПТГ - около 29% белка ECSOD от общего количества белков *E.coli*, при индукции 1 мМ ИПТГ - около 21% белка ECSOD от общего количества белков *E.coli*, при индукции при 15° в течение 24 ч 0,5 мМ ИПТГ - около 30% белка ECSOD от общего количества белков *E.coli*. Лизат центрифугировали 10 мин. при +4°C,

5000 g. Отбирали пробу надосадочной жидкости (супернатанта) и осадка для анализа локализации белка и оценки его растворимости, с использованием SDS-PAGE. Анализ проб после индукции ИПТГ во всех исследуемых концентрациях и при всех исследуемых температурах показал наличие белка с требуемой молекулярной массой в осадке, таким образом, анализ продемонстрировал нерастворимость полученного белка.

Таким образом, наблюдали экспрессию генов, кодирующих субъединицы белка ECSOD, при всех вариантах индукции, а именно – с использованием ИПТГ, и при низкой, и при высокой температуре, и 0,2% лактозы. При всех исследованных вариантах индукции белок ECSOD получали в нерастворимой фракции (тельцах включения). Подобран оптимальный протокол индукции экспрессии генов, кодирующих субъединицы рекомбинантного белка ECSOD, - индукция 0,5 mM ИПТГ при 37°C в течение 3 ч. Данный способ является оптимальным по выходу белка и затратам на его осуществление.

Также определяли содержание белка ECSOD в тельцах включения после отобранного режима индукции экспрессии, с использованием набора Human Cu/Zn Superoxide Dismutase ELISA Kit (ab119520), по инструкции. Содержание ECSOD на основе субъединицы типа C составило 75%, субъединицы типа A – 71%.

Пример 3. Очистка рекомбинантного белка ECSOD.

Осуществляли очистку белка ECSOD, полученного с использованием индукции 0,5 mM ИПТГ в течение 3 ч.

Биомассу, полученную из жидкой культуры клеток штамма-продуцента после индукции экспрессии гена ECSOD, ресуспендировали в лизирующем буфере (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1% Triton X-114, 10 mM EDTA, 5 % Glucose, pH 8.0) из расчета 3 мл буфера на 1 г влажных клеток, инкубировали при комнатной температуре 30 минут с интенсивным встряхиванием и разрушали 5 циклами соникации. Лизис клеток может быть осуществлен и иными способами, известными из уровня техники, например, с использованием френч-пресса.

Отмывка телец включения

Фрагменты клеток осаждали центрифугированием при 20000 g в течение 40 мин. При +4°C, супернатант отбрасывали, смывали верхнюю зону клеточного дебриса. Тельца включения ресуспендировали в отмывочном растворе (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 2% Tween-20, 10 mM EDTA, pH 8.0), объемом лизирующего буфера, центрифугировали 30 минут, при 20000 g, +4°C, супернатант отбрасывали. Данную процедуру повторяли еще 5 раз, при этом после добавления отмывочного буфера осуществляли инкубацию в течение 1 ч при постоянном перемешивании, в последнем случае – 30 мин., на второй раз

отмывочный раствор содержал 50 mM Tris-HCl, 2% дезоксихолат натрия, 50 mM EDTA, pH 8.5, третий - 50 mM Tris-HCl, 1% дезоксихолат натрия, 20 mM EDTA, pH 8.5, четвертый и пятый - 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 8.5, шестой - 20% этанол. Полученные тельца включения замораживали при -20°C.

Отмывка телец включения может быть осуществлена и иными способами, известными из уровня техники.

Выделение белка из телец включения

В 200 г замороженных телец включения добавляли 200 мл воды очищенной. Полученный раствор телец включения в воде подвергали перемешиванию в течение 30 мин. Вливали раствор телец включения в 4 л солюбилизирующего буфера (2 М мочевины, 100 mM трис-HCl, 5 mM метионин, 0,013% бридж 35, pH 12,5). Проводили солюбилизацию при постоянном перемешивании на механической мешалке в течение 60 мин. с постоянным подведением pH до 12,5. Осуществляли фильтрование, диаметр пор 0,50 мкм.

Очистка белка

Анионообменная хроматография

Уравновешивали колонку AXIOMA ПСК 50-240 стартовым буфером I (20 mM трис-HCl, 0,4 М мочевины, 0,01 % бридж 35, pH 8) в течение 30 мин., наносили фолдированный белок на колонку, осуществляли промывку колонки стартовым буфером I в течение 30 мин, элюировали белок с колонки, буфер 20 mM трис-HCl, 1М хлорид натрия, 0,01 % бридж 35, pH 8.

Гидрофобная хроматография

Уравновешивали колонку стартовым буфером II (20 mM трис-HCl, 2 М хлорид натрия, 0,01 % бридж 35, pH 7) в течение 30 мин., наносили фолдированный белок на колонку, элюировали белок с колонки градиентом понижения концентрации 2М NaCl от 90% до 35%.

Диализ

Осуществляли диализ элюата в буфере 20 mM Tris-Hcl pH 8.0, 5% глицерин, 1 mM DTT в течение 16 ч при 4°C. Вместо DTT возможно использование β-меркаптоэтанола.

Гель-фильтрация

Данный метод не только позволяет разделять молекулы по их размеру, но и обеспечивает формирование правильной пространственной структуры рекомбинантных белков (Li M., Su Z.-G., Janson J.-C. In vitro protein refolding by chromatographic procedures // Protein Expr. Purif. 2004. Vol. 33, № 1. P. 1–10).

Хроматографию проводили на гель-фильтрационной колонке XK26/60 с сорбентом Sephacryl S-100. Предварительно колонку уравнивали 2CV (640 мл) 0,01М фосфатно-солевого буфера, pH 7,2-7,4, содержащего ионы Cu, Zn, 25 мМ каждого, при скорости потока 2,6 мл/мин. Для получения данных ионов в указанном количестве могут быть использованы любые соли данных металлов, дающие при диссоциации такие ионы. Нанесение белка осуществляли при постоянной скорости 0,8 мл/мин, объем вносимой пробы – 3,2 мл. Далее осуществляли элюцию, буфер 150 мМ NaCl 20 мМ Na₂HPO₄ pH7.0.

Результаты анализировали с помощью ВЭЖХ. Проба начинала выходить примерно со 100 мл элюирующего буфера, первыми выходили с колонки два небольших пика примесных белков, целевой белок сходил одним пиком примерно в объеме 140-160 мл элюирующего буфера. Собирали целевую фракцию в пределах поглощения 400 – 400 mAU при длине волны 280 нм. После пика целевого белка с колонки выходили низкомолекулярные примеси.

Данный метод очистки позволяет получать супероксиддисмутазу с чистотой более 98%. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд (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. P. 248–254).

В результате был получен препарат белка ECSOD, на основе субъединиц С или А, с чистотой 98%, выход белка составил 0,5 г и 0,47 г из 1 литра жидкой культуры штамма-продуцента, соответственно.

Пример 4. Свойства полученных штаммов-продуцентов белка ECSOD.

Культуральные свойства Грам-отрицательные прямые палочки, размером 1,1-1,5-2,0-3,0 мкм, одиночные, спор и капсул не образуют. Каталазоположительные. Оксидазоотрицательные. Факультативные анаэробы. Интервал pH 5-7. Катализируют D-глюкозу и некоторые другие углеводы с образованием кислоты и газа, не сбраживают лактозу, арабинозу и галактозу. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная, не образуют H₂S, но гидролизуют мочевины.

Ростовые характеристики Клетки растут в интервале температур от 8°C до 43°C, интервал для культивирования – 28-38°C, оптимум роста при 37°C.

Описание визуальных и цитологических наблюдений при стандартных условиях культивирования Клетки хорошо растут на простых питательных средах, содержащих и не содержащих ампициллин. На агаризованной среде – колонии гладкие, круглые, слабо выпуклые, с ровным краем. В жидких средах образуют равномерную светорассеивающую суспензию, при хранении без перемешивания оседают на дно.

Пример 5. Анализ активности получаемых белков ECSOD

Активность СОД определяли путем определения степени торможения супероксиддисмутазой реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в формазан супероксидными радикалами, генерируемыми системой ферментативного окисления ксантина в мочевую кислоту в присутствии ксантиноксидазы.

1. Перед началом реакции определяли собственную ксантиноксидазную активность исследуемого образца (ЕЗ). Для этого в кювету к среде инкубации, не содержащей ксантиноксидазу, добавляли исследуемый образец. Регистрировали изменение оптической плотности в течение 3-5 мин при длине волны 560 нм по полученной кинетической кривой. Скорость реакции восстановления НСТ супероксидным радикалом, генерируемым собственной ксантиноксидазой исследуемого образца, выражена в единицах нарастания оптической плотности раствора в минуту в пересчете на количество белка в пробе. При изменении оптической плотности раствора больше 0,001 единицы в минуту, она вводится в формулу расчета активности СОД (ЕЗ).

2. В инкубационную смесь, содержащую растворы карбоната натрия - 50 мМ, ЭДТА - 0,1 мМ, НСТ - 37,5 мкМ в 50 мМ фосфатном буфере рН 10,2 добавляли 73 мкл 0,1 мМ раствора ксантина в 0,5 N NaOH. Реакцию запускали добавлением ксантиноксидазы (0,05 единиц активности на пробу).

3. Регистрировали изменение оптической плотности раствора по кинетической кривой в течение 3-5 мин при длине волны 560 нм и определяли начальную скорость восстановления НСТ без СОД. Рассчитывали изменение оптической плотности за одну минуту в пересчете на количество белка в пробе (Е0).

4. В ту же кювету добавляли исследуемый образец, содержащий СОД в количестве, приводящем к изменению оптической плотности раствора, связанному с восстановлением НСТ 0,017-0,02 единицы в минуту и подобранному экспериментально для однотипных образцов так, чтобы измерение проходило в условиях избытка субстрата, которое приводит к пропорциональному изменению регистрируемой скорости реакции.

Измеряли оптическую плотность полученной кинетической кривой (Е2).

5. Измеряли количество белка в изучаемом образце.

Рассчитывали активность СОД исследуемого материала по формуле, в которой использовали коэффициент молярной экстинкции образующегося диформаза: (Е=3,0 мМ/см [1]):

$$\frac{(E_1/\text{мин} + E_2/\text{мин}) - E_0/\text{мин}}{3 \cdot 10^{-2}} \cdot \frac{(2150 + V)\text{мкл}}{V \cdot C} = U(\text{мМ формазан}/\text{мг белка}/\text{мин}).$$

где U - единица активности фермента;

2150 мкл - объем среды инкубации;

$3 \cdot 10^{-2}$ - коэффициент молярной экстинкции диформаза;

V - объем исследуемого материала;

C - концентрация белка, мг/мл;

E1 - единицы оптической плотности раствора, восстанавливающего НСТ до диформаза без СОД за одну минуту;

E2 - единицы оптической плотности раствора, восстанавливающего НСТ до диформаза в присутствии СОД изучаемого образца за одну минуту;

E3 - единицы оптической плотности раствора, восстанавливающего НСТ до диформаза супероксидом, генерируемым ксантиноксидазой изучаемого образца.

За единицу активности СОД принимали разницу в количестве восстановленного диформаза без участия СОД и количеством диформаза восстановленного при ингибировании этой реакции СОД за одну минуту в 1 мл раствора, в пересчете на 1 мг белка в пробе. $U = (\text{мкМ формазана} / \text{мг белка} / \text{мин})$.

Получали следующие результаты активности СОД: активность ECSOD из субъединиц типа C (проба 3 мг/мл) после гидрофобной хроматографии - $0,27 \cdot 10^6$ ед/мг белка, после диализа (0,5 мг/мл) - $0,30 \cdot 10^6$ ед/мг белка, после очистки гель-фильтрацией (4,5 мг/мл) - $0,37 \cdot 10^6$ ед/мг белка. Показатели активности ECSOD из субъединиц типа A были практически идентичными.

Штамм-продуцент ECSOD на основе клеток E.coli Rosetta (DE3)pLysS и способ получения ECSOD

Перечень последовательностей

<110> Духовлинов И.В., Симбирцев А.С.
<120> Штамм-продуцент ECSOD на основе клеток E.coli Rosetta (DE3)pLysS
и способ получения ECSOD
<160> 2

<210> 1
<211> 222
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens
<220>
<223> субъединица типа С экстраклеточной СОД
<400> 1

Trp	Thr	Gly	Glu	Asp	Ser	Ala	Glu	Pro	Asn	Ser	Asp	Ser	Ala	Glu	Trp	1	5	10	15
Ile	Arg	Asp	Met	Tyr	Ala	Lys	Val	Thr	Glu	Ile	Trp	Gln	Glu	Val	Met	20	25	30	
Gln	Arg	Arg	Asp	Asp	Asp	Gly	Ala	Leu	His	Ala	Ala	Cys	Gln	Val	Gln	35	40	45	
Pro	Ser	Ala	Thr	Leu	Asp	Ala	Ala	Gln	Pro	Arg	Val	Thr	Gly	Val	Val	50	55	60	
Leu	Phe	Arg	Gln	Leu	Ala	Pro	Arg	Ala	Lys	Leu	Asp	Ala	Phe	Phe	Ala	65	70	75	80
Leu	Glu	Gly	Phe	Pro	Thr	Glu	Pro	Asn	Ser	Ser	Ser	Arg	Ala	Ile	His	85	90	95	
Val	His	Gln	Phe	Gly	Asp	Leu	Ser	Gln	Gly	Cys	Glu	Ser	Thr	Gly	Pro	100	105	110	
His	Tyr	Asn	Pro	Leu	Ala	Val	Pro	His	Pro	Gln	His	Pro	Gly	Asp	Phe	115	120	125	
Gly	Asn	Phe	Ala	Val	Arg	Asp	Gly	Ser	Leu	Trp	Arg	Tyr	Arg	Ala	Gly	130	135	140	
Leu	Ala	Ala	Ser	Leu	Ala	Gly	Pro	His	Ser	Ile	Val	Gly	Arg	Ala	Val	145	150	155	160
Val	Val	His	Ala	Gly	Glu	Asp	Asp	Leu	Gly	Arg	Gly	Gly	Asn	Gln	Ala	165	170	175	
Ser	Val	Glu	Asn	Gly	Asn	Ala	Gly	Arg	Arg	Leu	Ala	Cys	Cys	Val	Val	180	185	190	
Gly	Val	Cys	Gly	Pro	Gly	Leu	Trp	Glu	Arg	Gln	Ala	Arg	Glu	His	Ser	195	200	205	
Glu	Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Arg	Glu	Ser	Glu	Cys	Lys	Ala	Ala			210	215	220	

<210> 2
 <211> 672
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Нуклеотидная последовательность, кодирующая SEQ ID NO:1
 <400> 2

```

tggaccggcg aagattccgc ggaaccgaat tccgattccg cggaatggat tcgtgatatg 60
tatgcgaaag tgaccgaaat ttggcaggaa gtgatgcagc gtcgtgatga tgatggcgcg 120
ctgcatgcgg cgtgccaggt gcagccgtcc gcgaccctgg atgcggcgca gccgcgtgtg 180
accggcggtg tgetgtttcg tcagctggcg ccgcgtgcga aactggatgc gttttttgcg 240
ctggaaggct ttccgaccga accgaattcc tcctcccgtg cgattcatgt gcatcagttt 300
ggcgatctgt cccagggctg cgaatccacc ggcccgcatt ataatccgct ggcggtgccg 360
catccgcagc atccgggcga ttttggcaat tttgcggtgc gtgatggctc cctgtggcgt 420
tatcgtgcgg gcctggcggc gtccctggcg ggcccgcatt ccattgtggg ccgtgcggtg 480
gtggtgcatg cgggcgaaga tgatctggcg cgtggcgcca atcaggcgtc cgtggaaaat 540
ggcaatgcgg gccgtcgtct ggcgtgctgc gtggtggcg tgtgcggccc gggcctgtgg 600
gaacgtcagg cgcgtgaaca ttccgaacgt aaaaaacgtc gtcgtgaatc cgaatgcaaa 660
gcggcgtgat aa 672
  
```


Штамм-продуцент ECSOD на основе клеток *E.coli Rosetta (DE3)pLysS* и способ получения ECSOD

Формула изобретения

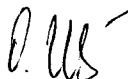
1. Штамм-продуцент белка ECSOD, субъединица которого охарактеризована SEQ ID NO:1, либо а.о. 1-209 SEQ ID NO:1, на основе клеток *E.coli Rosetta (DE3)pLysS*, содержащий плазмидную ДНК pColdIV, несущую ген, кодирующий данную субъединицу, кодонно оптимизированный для экспрессии в клетках *E.coli*.
2. Способ получения белка ECSOD, заключающийся в том, что культивируют клетки штамма-продуцента по п.1, с использованием индуктора экспрессии таргетного белка, лизируют клетки, отмывают тельца включения, выделяют белок из телец включения с использованием буфера 2 М мочевины, 100 мМ трис-HCl, 5 мМ метионин, 0,013% бридж 35, pH 12,5, в течение 2 ч, осуществляют анионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, диализ с экспозицией агента, восстанавливающего дисульфидные связи, гель-фильтрацию с экспозицией ионам Cu и Zn.

ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ
ПОИСКЕ(статья 15(3) ЕАПК и правило 42
Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201650120

Дата подачи: 01 декабря 2016 (01.12.2016)		Дата испрашиваемого приоритета:										
Название изобретения: Штамм-продуцент ECSOD на основе клеток E.coli Rosetta (DE3)pLysS и способ получения ECSOD												
Заявитель: ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "РД-БИОТЕХ"												
☐ Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа) ☐ Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)												
А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;"></td> <td style="width: 50%; text-align: right;">C12N 1/21 (2006.01)</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: right;">C12N 15/52 (2006.01)</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: right;">C12N 15/55 (2006.01)</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: right;">C12N 15/72 (2006.01)</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: right;">C12N 9/02 (2006.01)</td> </tr> </table>				C12N 1/21 (2006.01)		C12N 15/52 (2006.01)		C12N 15/55 (2006.01)		C12N 15/72 (2006.01)		C12N 9/02 (2006.01)
	C12N 1/21 (2006.01)											
	C12N 15/52 (2006.01)											
	C12N 15/55 (2006.01)											
	C12N 15/72 (2006.01)											
	C12N 9/02 (2006.01)											
Согласно Международной патентной классификации (МПК) или национальной классификации и МПК												
Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:												
Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК) C12N 1/21, 15/52, 15/55, 15/72, 9/02												
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:												
В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ												
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №										
A	RU 2539780 C2 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ИМ. Г.К. СКРЯБИНА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИБФМ РАН)) 27.01.2015, формула	1, 2										
A	CN 103626874 A (BEIJING GENOMICS INST CHINESE ACAD SCI) 12.03.2014, формула	1, 2										
A	RU 2557306 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. Г.Б.ЕЛЯКОВА ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ТИБОХ ДВО РАН)) 20.07.2015, формула	1, 2										
☐ последующие документы указаны в продолжении графы В ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении												
* Особые категории ссылочных документов: "А" документ, определяющий общий уровень техники "Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее "О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д. "Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета "D" документ, приведенный в евразийской заявке												
"Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения "Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности "У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории "&" документ, являющийся патентом-аналогом "L" документ, приведенный в других целях												
Дата действительного завершения патентного поиска:		24 марта 2017 (24.03.2017)										
Наименование и адрес Международного поискового органа: Федеральный институт промышленной собственности РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., д. 30-1. Факс: (499) 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		Уполномоченное лицо:  О. Н. Шанова Телефон № (499) 240-25-91										