

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201792179 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2019.05.31

(22) Дата подачи заявки  
2017.10.30

(51) Int. Cl. C12P 21/02 (2006.01)  
C12N 15/70 (2006.01)  
C12N 1/21 (2006.01)  
C12R 1/19 (2006.01)

(54) ТЕХНОЛОГИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЛАГЕЛЛИНА

(96) 2017000117 (RU) 2017.10.30

(71) Заявитель:  
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ  
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ  
"АКТИВНЫЕ  
БИОСИСТЕМЫ" (ООО "АБС") (RU)**

(72) Изобретатель:  
**Духовлинов Илья Владимирович,  
Орлов Антон Иосифович (RU)**

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

(57) Изобретение относится к молекулярной биологии и биотехнологии и может быть использовано для производства рекомбинантного флагеллина. Предложен способ получения активного высокоочищенного рекомбинантного усеченного флагеллина, охарактеризованного последовательностью аминокислот SEQ ID NO:1, заключающийся в том, что используют субклон штамма-продуцента E.coli BL21(DE3)/pET151D-TOPO F27, содержащего ген, кодирующий такой флагеллин, оптимизированный по кодонному составу для экспрессии в клетках E.coli, обеспечивающий выход целевого белка до 45% от общего белка, культивируют клетки такого субклона с использованием индуктора экспрессии целевого гена 0,5 мМ ИПТГ, лизируют клетки, осаждают клеточные осадки, осуществляют выделение и очистку белка из супернатанта в денатурирующих условиях с использованием Ni-NTA сефарозы. Данная технология позволяет получить флагеллин с чистотой 98%, выход - 800 мг с 1 л питательной среды. Полученный с использованием предложенной технологии флагеллин демонстрирует эффективность в модели лабораторных животных как при введении до, так и после облучения.

A1

201792179

201792179

A1

## Технология выделения и очистки рекомбинантного флагеллина

### Описание

Изобретение относится к молекулярной биологии и биотехнологии и может быть использовано для производства рекомбинантного флагеллина.

Человечество восприимчиво к заболеваниям, вызванным радиацией, токсическими химическими веществами, вирусами и лекарственно-устойчивыми бактериями. Потенциальной эффективностью против таких заболеваний могут обладать вещества, активирующие эндогенные пути защиты организма, в частности, способные быстро индуцировать экспрессию цитопротекторных и/или антимикробных пептидов. Бактериальный белок жгутиков бактерий флагеллин является мощным активатором врожденной иммунной системы. В экспериментах показано, что бактериальный флагеллин, связываясь с TLR5, активирует NF- $\kappa$ B, не вызывая системного воспаления.

Полипептид CBLB502, полученный из бактериального флагеллина, как показали эксперименты, снижает вред при облучении мышей и приматов, улучшая регенерацию клеток гемопоэза и кишечника. Было показано, что флагеллин оказывает супрессорное воздействие на апоптоз клеток кишечника после воздействия радиацией. Показана эффективность использования рекомбинантного флагеллина в качестве радиопротектора, например, при радиационной терапии онкологических заболеваний, а также в качестве эффективного лекарственного средства при лечении болезни «трансплантат против хозяина».

Помимо радиопротективных свойств, флагеллин, как и другие агонисты TLR, продемонстрировал свою эффективность в экспериментах по иммунотерапии рака. Бактериальный флагеллин и флагеллин-экспрессирующие бактерии (*Salmonella*) показали противоопухолевый эффект в моделях метастазирования клеток рака поджелудочной железы в печени и кишечнике. Бактериальный флагеллин и его производное полипептид CBLB502 показали противоопухолевый эффект в моделях *in vivo*. Противоопухолевый эффект опосредован взаимодействием молекулы флагеллина с рецептором TLR5, экспонированным на поверхности опухолевых клеток, что ведет к синтезу таких иммуномодуляторов, как цитокины. Интересно, что агонисты рецептора TLR5, как правило, менее токсичны, чем агонисты других рецепторов TLR (в частности, липополисахаридов – агонистов TLR4), что объясняется тем, что активация TLR5 не индуцирует экспрессию таких цитокинов, как фактор некроза опухоли (TNF), интерлейкин 1 бета (IL-1 $\beta$ ), ведущих к «цитокиновому шторму» и последующему воспалению.

Флагеллин, в зависимости от происхождения из того или иного микроорганизма, различается и состоит из 259–1250 аминокислотных остатков.

Различия в структуре флагеллина наблюдаются и среди одного бактериального вида. Так, большая часть сероваров *Salmonella enterica* двухфазные, т.е. у них чередуется экспрессия разных жгутиковых антигенов (фаз). Это обусловлено возможностью нахождения в активном состоянии только 1 из 2 генов флагеллина (fliC и fljB), локализующихся в разных локусах хромосомы [Baker S., Hardy J., Sanderson K.E. et al. A novel linear plasmid mediates flagellar variation in Salmonella Typhi. PLoS Pathog, 2007, 3(5): e59. doi:10.1371/journal.ppat.0030059], FliC – phase 1 flagellin (STF), fljB – phase 2 flagellin (STF2). Данные флагеллины имеют одинаковый N-конец, гомологичный, различающийся на несколько а.о., С-конец, а также различный домен D3.

Известно получение FliC с использованием штамма на основе клеток *E.coli* BL21(DE3) и плазмидной ДНК pET151D-ТОРО, в которую введен ген, кодирующий флагеллин, дополнительно кодирующий последовательность полигистидина на N-конце для удобства очистки с помощью металлохелатной хроматографии, а также сайт узнавания антителом V5 и сайт гидролиза протеиназой TEV (патент РФ №2524133). Рекombинантный флагеллин составляет 37% общего белка клеточного лизата при индукции 0,2% лактозой. Рекombинантный флагеллин очищали из клеточных лизатов методом металлохелатной хроматографии с последующим диализом. Чистота выделенного флагеллина составила не менее 97% по результатам электрофореза в полиакриламидном геле с последующей денситометрией. Исследование активности проводилось на линии клеток.

Однако получить активность флагеллина возможно и при использовании его фрагментов. В статье ГРЕБЕНЮК А.Н. и др., 2013 г., описаны неплохие результаты усеченной формы флагеллина, представленной слитыми через гибкий мостик N- и С-концевыми доменами FliC (ГРЕБЕНЮК А.Н., АКСЕНОВА Н.В., ПЕТРОВ А.В., АЛЬШЕХАДАТ Р.И., КЛИМОВ Н.А., СИМБИРЦЕВ А.С. ПОЛУЧЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ РЕКОМБИНАНТНОГО ФЛАГЕЛЛИНА И ОЦЕНКА ИХ РАДИОЗАЩИТНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ. ВЕСТНИК РОССИЙСКОЙ ВОЕННО-МЕДИЦИНСКОЙ АКАДЕМИИ, - №3 (43), 2013 г., - с. 75-80). Данный флагеллин клонирован в клетках *E. coli* BL21[DE3]Star (Invitrogen) с использованием плазмидной ДНК pET302/NT-His (Invitrogen). Выход белка при индукции (индуцировали 0,2% лактозой) не указан. Очистка осуществлялась с использованием металлохелатной хроматографии. Исследование активности проводилось на линии клеток и мышах.

Способы получения флагеллина, в том числе активного, в промышленных количествах не известны.

Задачей, решаемой авторами, являлось создание технологии, позволяющей получать активный рекombинантный флагеллин в промышленных количествах. Уровень продукции

для эффективного промышленного производства по общепринятому параметру – не менее 20%. Таким образом, при оптимизации технологии получения фармацевтической субстанции необходимо было добиться получения целевого белка в количестве не менее 20% от общего белка.

Для этого был создан штамм на основе клеток *E.coli* BL21(DE3) и плазмидной ДНК pET151D-ТОРО, в которую введен ген, кодирующий усеченный флагеллин, охарактеризованный последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1, оптимизированный по кодонному составу для экспрессии в клетках *E.coli*. Среди выросших клонов выбран наиболее продуктивный - таковой, обеспечивающий наибольший выход флагеллина, - 45%, при индукции 0.2% лактозой. При дальнейшей наработке выход белка составил 800 мг с 1 л питательной среды при культивировании в ферментере на 10 л и 50 л с индукцией экспрессии целевого белка 0,5 mM ИПТГ. При очистке с использованием иммобилизованной металлоаффинной хроматографии и сорбента Ni-NTA сефарозы в денатурирующих условиях удалось получить выход 800 мг с 1 л питательной среды.

Технический результат от использования технологии – в получении активного высокоочищенного флагеллина в промышленных количествах. Данный технический эффект достигается благодаря использованию наиболее продуктивного субклона клеток штамма-продуцента флагеллина, в том числе за счет кодонной оптимизации целевого гена для экспрессии в клетках *E.coli*, использованию подходящего индуктора, выделению и очистке фармацевтической субстанции из биомассы штамма-продуцента в денатурирующих условиях с использованием определенного сорбента.

Технический результат от использования технологии выражается также в расширении спектра способов получения флагеллина, что немаловажно, учитывая широкий спектр применения и значимость данного белка, а также учитывая, что длительное применение одного препарата белка может вызвать в организме уменьшение чувствительности к нему.

#### *Сущность изобретения*

Предложен способ получения активного высокоочищенного рекомбинантного флагеллина, охарактеризованного последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1, заключающийся в том, что используют субклон штамма-продуцента *E.coli* BL21(DE3)/pET151D-ТОРО\_F27, содержащего ген, кодирующий такой флагеллин, оптимизированный по кодонному составу для экспрессии в клетках *E.coli*, обеспечивающий выход целевого белка до 45% от общего белка, культивируют клетки такого субклона с использованием индуктора экспрессии целевого гена 0,5 mM ИПТГ,

лизируют клетки, осаждают клеточные осадки, осуществляют выделение и очистку белка из супернатанта в денатурирующих условиях с использованием Ni-NTA сефарозы.

Оптимизация по кодонному составу для организма экспрессии целевого гена может быть осуществлена вручную, либо с использованием специализированного программного обеспечения, например, на сайте [molbiol.ru](http://molbiol.ru), либо [encorbio.com/protocols/Codon.htm](http://encorbio.com/protocols/Codon.htm), на основе аминокислотной последовательности белка. Последовательность расположения элементов в плазмидной ДНК понятна среднему специалисту в данной области.

Использован штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET151D-ТОРО - продуцент флагеллина, на основе клеток *Escherichia coli* BL21 (DE3), трансформированных плазмидной ДНК pET151/D-ТОРО, кодирующей целевой белок.

Технология получения флагеллина описана более подробно в примерах.

Авторами настоящего изобретения проведены лабораторные исследования, подтверждающие возможность реализации охарактеризованного изобретения. Полученные результаты исследований проиллюстрированы следующими примерами.

### **Пример 1. Создание наиболее продуктивного клона штамма-продуцента флагеллина**

#### 1.1. Создание нуклеотидной последовательности, кодирующей флагеллин

Аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, характеризующую усеченный флагеллин, переводили в нуклеотидную с одновременной кодонной оптимизацией для экспрессии в клетках *E.coli* с использованием программы на сайте [molbiol.ru](http://molbiol.ru) и добавлением старт- и стоп-кодона, а также сайтов рестрикции, фланкирующих получаемый ген. Рассчитанную нуклеотидную последовательность синтезировали химическим методом с помощью синтезатора ДНК ASM-800 (БИОССЕТ, Россия).

#### 1.2. Создание плазмидной ДНК pET151/D-ТОРО\_F27

Полученный фрагмент ДНК, а также вектор pET151/D-ТОРО (Invitrogen, США) обрабатывали соответствующими рестриктазами по инструкции к данным ферментам. Далее полученные фрагменты очищали с использованием препаративного электрофореза и использовались в реакции лигирования.

Осуществляли реакцию лигирования очищенного рестрицированного фрагмента ДНК в очищенный рестрицированный вектор. Реакционная смесь содержала 2 мкл очищенного рестрицированного фрагмента ДНК, 3,5 мкл 10X буфера для лигазы (1X буфер содержит 10 mM Tris-HCl (pH 7,5 при 37°C), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 0,1 мг/мл бычий сывороточный альбумин (БСА)) (Thermo Fisher Scientific Inc.), 3,5 мкл 50% полиэтиленгликоля 4000, 1 мкл рестрицированного вектора, 5 мкл T4 лигазы (Thermo Fisher

Scientific Inc.). Реакционная смесь доводилась до 35 мкл безнуклеазной водой и инкубировалась при 22°C в течение 4 часов. Ферментативная реакция останавливалась инкубацией реакционной смеси при 65°C в течение 15 минут.

Смесь 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 на основе клеток *Escherichia coli* DH10B/R для амплификации полученной плазмидной ДНК

Подготавливали компетентные клетки *Escherichia coli* штамма DH10B/R (Gibco BRL, США) с генотипом F-mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 deoR recA1 endA1 araD139  $\Delta$ (ara,leu)769 galU galK $\lambda$ - gpsL nupG, и далее осуществляли их трансформацию полученной лигазной смесью.

Подготавливали клетки *E. coli* для трансформации полученной плазмидной ДНК – получали компетентные клетки - следующим образом. Инкубировали клетки при +37°C в течение 16ч 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 50 мл 0,1 М CaCl<sub>2</sub>, охлажденного на льду. Инкубировали клетки 20 мин на льду. Осаждали клетки в течение 10 мин. при 5000 об./мин, +4°C. Супернатант сливали, клетки ресуспендировали в 3 мл 0,1 М CaCl<sub>2</sub>, охлажденного на льду.

Трансформацию полученных компетентных клеток осуществляли методом электропорации. Использовали электропоратор Eporator (Eppendorf, Германия) и стерильные кюветы для электропорации (Eppendorf, Германия), объемом 100 мкл, щель 1 мм.

К 12 мкл компетентных клеток добавляли 1 мкл десятикратно разведенной лигазной смеси, осуществляли перемешивание и перенос в кювету, которую помещали в электропоратор. Трансформацию проводили при электрическом импульсе напряженностью 1,7 кВ длительностью 5 мсек. После трансформации клетки помещали в 1 мл SOC-среды (2% бактотриптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 10 мМ NaCl; 2,5 мМ KCl; 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>; 20 мМ глюкоза) и инкубировали в течение 40 минут при 37°C, после чего вмазывали в LB-агар с антибиотиком на чашке Петри и инкубировали 16 ч при 37°C.

Выросшие на чашке Петри с ампициллином клоны *E.coli* анализировали на наличие используемой в настоящем эксперименте плазмидной ДНК, с одновременным переносом анализируемых клонов клеток *E.coli* на отдельные чашки Петри с селективной средой. Из таких клонов выделяли плазмидную ДНК и анализировали секвенированием с использованием специфичных праймеров. Это позволило отобрать клоны-продуценты разработанной плазмидной ДНК. Данные штаммы использовали для получения плазмидной ДНК pET151/D-ТОРО\_F27.

#### 1.4. Получение плазмидной ДНК pET151/D-ТОРО\_F27

Наработку и выделение плазмидной ДНК осуществляли следующим образом. Единичную колонию клеток продуцента плазмид *E.coli*, выращенную на LB-агаре в чашке Петри с добавлением ампициллина, инокулировали в стандартную жидкую среду LB (Gibco BRL, США), 2–10 мл, содержащую ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, и осуществляли ферментацию при 37°C в термостатированном шейкере роторного типа в течение 16 ч при 250 об./мин. Полученную культуру бактериальных клеток осаждали центрифугированием при 4000g в течение 10 мин. при +4°C. Удаляли супернатант и из осадка клеток выделяли плазмидную ДНК с помощью набора для выделения плазмидной ДНК (Цитокин, Россия), по инструкции к набору. Выделенную плазмидную ДНК анализировали электрофорезом в 0,8%-ном агарозном геле.

#### 1.5. Создание штамма-продуцента флагеллина

Выделенной согласно описанной выше методике плазмидной ДНК pET151/D-ТОРО\_F27 трансформировали клетки *E.coli* штамма BL21 (DE3) (Invitrogen, USA), с генотипом F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3), содержащие в геноме  $\lambda$ De3 лизоген и мутацию rne131. Мутированный ген *rne* (*rne131*) кодирует усеченную форму РНКазы E, что уменьшает внутриклеточное разрушение мРНК, приводя к увеличению ее ферментативной стабильности. Ion- и ompT-мутации по генам протеаз позволяют получать непротеолизированные рекомбинантные белки в больших количествах.

Получали компетентные клетки *E.coli* BL21(DE3) и трансформировали их полученной плазмидной ДНК как описано выше, вместо десятикратно разведенной лигазной смеси использовали раствор плазмиды в воде. Выросшие клоны проверяли на наличие целевой плазмидной ДНК с использованием секвенирования выделенной плазмидной ДНК.

#### 1.6. Выявление наиболее продуктивного клона штамма-продуцента флагеллина

Ночную культуру исследуемых клеток выращивали в минимальном объеме LB. На следующий день ночную культуру вносили в соотношении 1:100 в 100 мл жидкой питательной среды. Измерение оптической плотности осуществляли на спектрофотометре

при длине волны 600 нм. В период лог-фазы экспоненциального роста клеток делали высевы через каждые 15 мин на твердую питательную среду с ампициллином, 100 мкг/мл (селективная среда), и без антибиотика.

Строили кривую зависимости количества клеток от времени в полулогарифмических координатах. По кривой определяли время удвоения числа клеток (период генерации). Производили подсчет количества клеток, содержащих плазмиду (колонии, выросшие на селективной среде) относительно общего числа клеток (количество колоний на среде без антибиотика) до и после удвоения клеток. Вычисляли количество клеток, потерявших плазмиду, и сопоставляли с общим числом клеток.

Стабильность клона вычисляли на основании следующей математической модели.

Пусть  $N$  - число клеток, содержащих плазмиду,  $n$  - число удвоений (каждое удвоение имеет определенный период времени). Тогда количество клеток в какой-то момент времени -  $N^n$ .

Пусть  $p$  - количество клеток, теряющих плазмиду за одну генерацию, выраженное в долях. Тогда количество клеток, содержащих плазмиду, -  $N(1-p)^n$ .

Допустим, нас интересует, через сколько делений половина клеток потеряет плазмиду, то есть  $N(1-p)^n = N/2$ .

Отсюда  $n = \log_{(1-p)} 1/2$ .

Таким образом, если потеря плазмиды составляет 5% за генерацию, то через  $n = \log_{0,95} 1/2 = -13,5$  делений половина клеток не будет содержать плазмиды. Минус означает, что идет процесс уменьшения числа плазмид в растущей массе клеток.

Показано, что процент клеток, теряющих плазмиду за одну генерацию в логарифмической фазе в различных выбранных клонах штамма-продуцента существенно различается. Наибольшая стабильность зафиксирована в клоне номер 4.

Далее этот клон рассевали истончающим штрихом на чашки Петри, и были получены субклоны штамма *E.coli* BL21(DE3)/pET151D-TOPO\_F27 для анализа уровня экспрессии целевого гена. Всего в последующей работе использовалось 4 субклона штамма 4 – 4-1, 4-2, 4-3, 4-4 соответственно.

Индукцию экспрессии рекомбинантных белков в выбранных субклонах осуществляли следующим образом:

Инкубировали клетки при +37°C на качалке в течение 16 ч в 10 мл LB среды (1% триптон, 1% дрожжевой экстракт и 1% натрий хлористый). Разводили культуру свежей LB средой в 50 раз и выращивали на качалке при +37°C до достижения культурой клеток оптической плотности 0.6-0.8 оптических единиц при длине волны 600 нм. После этого осуществляли индукцию экспрессии рекомбинантных белков с помощью добавления



ИПТГ к культуре до конечной концентрации 1 мМ. Оставляли на 8 часов для определения уровня экспрессии белка. Для этого отбирали аликвоты клеток через 8 часов после добавления ИПТГ. Оставшиеся клетки концентрировали с помощью центрифугирования.

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

Лизаты клеток готовили из 1 мл клеточной культуры следующим способом: осаждали клетки центрифугированием и ресуспензировали в 100 мкл буфера (0,2М трис-НСl рН 7,5; 0,2М NaCl; 0,01М ацетат натрия; 0,01М  $\beta$ -меркаптоэтанол и 5% - глицерин), после чего кипятили десять минут. Полученный лизат использовали для анализа белкового состава.

Полученные электрофореграммы были использованы для определения уровня экспрессии целевого белка относительно общих клеточных белков с помощью компьютерной программы TotalLab.

На основании полученных данных для последующей работы был выбран субклон штамма-продуцента 4-2, который обеспечил уровень синтеза 35% целевого белка от общего белка.

## **Пример 2. Индукция экспрессии целевого гена с использованием полученного субклона штамма-продуцента флагеллина**

Индукцию экспрессии получали и с использованием ИПТГ, и 0,2% лактозы.

2.1. индукция в объемах для лабораторной работы

2.1.1. при индукции синтеза флагеллина 0.2% лактозой по методу Штудиера

Для культивирования полученного субклона штамма-продуцента 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 Штудиера использовали среду РУР-5052, состоящую из 1% пептона (Gibco, США), 0.5% дрожжевого экстракта (Gibco, США), 50 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 мМ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 25 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 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 РҮР-5052, содержащую ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, инокулировали единичную колонию штамма-продуцента (варианта). Ферментацию проводили при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об. мин. в течение 14 часов до отсутствия существенного изменения ОП<sub>600</sub> за 1 час. Отбирали аликвоту на анализ экспрессии гена, кодирующего флагеллин, методом электрофореза в ПААГ, каждый час, по окончании индукции биомассу осаждали центрифугированием при 9000g.

#### 2.1.2. при индукции синтеза флагеллина ИПТГ

Индукцию экспрессии гена с использованием ИПТГ осуществляли следующим образом. Инкубировали клетки единичной колонии субклона штамма-продуцента при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин. в течение 16ч 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 0,5 мМ и 1 мМ. Индукцию проводили в течение 14 часов, отбирали пробу для анализа с использованием SDS-PAGE каждый час, по окончании индукции биомассу осаждали центрифугированием.

#### 2.1.3. Анализ отобранных проб

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).

Максимальный уровень экспрессии гена, кодирующего флагеллин, в клетках *E.coli*, составляющий 28±0,5% при индукции 1 мМ ИПТГ при +37°C в течение 3 часов и 19±0,7% при индукции 0.5 мМ ИПТГ при +37°C в течение 3 часов. При индукции экспрессии гена, кодирующего флагеллин, 0.2% лактозой, был получен следующий результат: содержание целевого белка от общего клеточного белка составило 44,5±0,5%. Таким образом, наиболее оптимальным - обеспечивающим максимальный выход белка, - режимом индукции экспрессии гена, кодирующего целевой белок, в клетках субклона *E.coli* штамма BL21(DE3)/pET151D-TOPO\_F27 оказалось культивирование с использованием 0.2% лактозы в качестве индуктора.

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 продемонстрировал, что целевой белок при культивировании с использованием разных режимов и индукторов остается растворимым, что косвенно говорит о его правильной (нативной) конформации (третичной структуре).

## 2.2. индукция при масштабировании

Осуществляли масштабирование процесса получения флагеллина.

### 2.2.1. в объеме 10 л

Для подготовки использовали 5-кратную концентрированную среду LB: в колбы объемом 2 литра помещали 35 г дрожжевого экстракта, 70 г кислотного гидролизата казеина и 35 г хлорида натрия; добавляли дистиллированную воду до объема 1,4 л, перемешивали на магнитной мешалке до полного растворения компонентов и стерилизовали в автоклаве в течение 30 мин при давлении 1,1 кгс/см<sup>2</sup>.

Лабораторный ферментер «Саяны» (Биоссет) с рабочим объемом 10 л подготавливали согласно инструкции по эксплуатации. В сосуд ферментера с соблюдением правил асептики устанавливали датчики pH и pO<sub>2</sub> и герметизировали. К барбатуру подключали магистраль подачи сжатого воздуха от компрессора со стерилизующим фильтром. Кран на магистрали закрывали. На компьютере активизировали программу управления.

Соблюдая правила асептики, в емкость ферментера заливали 1,400 л концентрированного 5-кратного LB-бульона, 35 мл раствора ампициллина, стерильной дистиллированной воды до 8 л, закрывали крышку, устанавливали двигатель магнитной мешалки. С помощью программы управления доводили скорость вращения турбины до (1200-1500) об/мин и перемешивали среду в течение 3 - 5 мин, после чего двигатель выключали, снимали, приоткрывали крышку и заливали в емкость ферментера 315 мл посевного материала.

Крышку ферментера герметизировали, к технологическому отверстию в крышке подключали шланг перистальтического насоса, шланг, подсоединенный к манометру для измерения давления в ферментере, а к брызгоулавливателю подключали шланг для отведения выдуваемого воздуха. С помощью управляющей программы включали нагрев ферментера, устанавливали автоматическую регулировку температуры в пределах (37,0±0,5)°C и доводили скорость вращения турбины до 1200-1500 об/мин. К ловушке на крышке ферментера подключали шланги от криостата проточной системы охлаждения, включали криостат. Контролировали pH среду в ферментере: значение pH должно было

быть в пределах 6,8-7,2. В случае необходимости через технологическое отверстие в крышке с помощью перистальтического насоса подавали раствор HCl или NaOH до достижения указанного значения pH.

Включали компрессор, устанавливали давление воздуха в системе 0,20 атм. Контролировали значение  $pO_2$ . Величину  $pO_2$  поддерживали путем постепенного увеличения давления сжатого воздуха. Расход воздуха контролировали ротаметром, регулируя его с помощью крана на выходе ловушки. Расход воздуха должен был оставаться в пределах (10-15) л/мин. В случае невозможности поддержания необходимой величины  $pO_2$ , в систему подачи сжатого воздуха через тройник подавали кислород из баллона с редуктором.

Продолжали культивирование, контролируя значение pH и оптическую плотность культуры. Для измерения оптической плотности культуры через 2 ч после засева и в последующем каждые 30 мин открывали кран пробоотборника на ферментере и отбирали пробы культуры. Измерение оптической плотности при длине волны 600 нм ( $A_{600}$ ) производили с помощью денситометра «Ультраспек-10». Аликвоты культуры сохраняли для последующего контроля содержания белка с использованием метода диск-электрофореза. Ферментацию проводили в течение 3-9 ч (при индукции ИПТГ), 20 ч (при индукции 0,2% лактозой) после достижения  $OP_{600}$  6 оптических единиц.

Индукцию экспрессии проводили при достижении культурой клеток оптической плотности 0.65-0.82 оптических единиц при длине волны 600 нм. Индуцировали экспрессии гена, кодирующего целевой белок, посредством использования двух режимов: проводили индукцию экспрессии ИПТГ в различных концентрациях и 0.2% лактозой.

#### 2.2.1.1. Индукция ИПТГ.

В качестве индуктора экспрессии использовался ИПТГ в концентрации 1 мМ, 0.5 мМ и 0.1 мМ. Был оптимизирован уровень экспрессии гена, кодирующего целевой белок, при этом варьировало время индукции.

В первом случае в ферментер не был добавлен ИПТГ (Sigma, США) (описание ферментации выше, это контроль), во втором был добавлен ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ, в третьем – до 0.5 мМ, в четвертом – до 0.1 мМ, ферментацию проводили в течение 9 часов, через каждый час отбирали аликвоты клеток (по 1 мл) для измерения  $OP_{600}$  (200 мкл от 1 мл), анализа белков с использованием метода диск-электрофореза (800 мкл от 1 мл).

Электрофорез клеточных лизатов проводили в 12.5% ПААГ в денатурирующих условиях в неоднородной (ступенчатой) буферной системе (диск-электрофорез) с

использованием механизма изотахофореза на стадии концентрирования образца (Laemmli, 1970).

Лизаты клеток были приготовлены из 800 мкл клеточной культуры следующим способом: клетки были осаждены центрифугированием, ресуспензированы в 200 мкл буфера (0.2М Трис-НСl, рН 7.5, 0.2М NaCl, 0.01М ацетат натрия, 0.01М  $\beta$ -меркаптоэтанол и 5% глицерин), подвергнуты кипячению в течение 2 минут. Полученный лизат использовали для анализа белкового состава.

Показано, что максимальный уровень экспрессии гена, кодирующего флагеллин, при индукции ИПТГ в концентрации 1 мМ наблюдается после 4 - часовой ферментации, 0.5 мМ и 0.1 мМ – 6. При этом выход белка составляет  $28 \pm 0,5\%$ ,  $30 \pm 0,8\%$  и  $19 \pm 0,7\%$ , соответственно, от общего клеточного белка по данным денситометрического анализа (программа Total Lab). Без индукции ни в одном из штаммов не было обнаружено непреднамеренного синтеза целевого белка, «подтекания T7 промотора», часто наблюдаемого в данной системе экспрессии (Grossman, 1998).

#### 2.2.1.2. Индукция 0,2% лактозой

Проводили индукцию экспрессии по методу Штудиера (Studier, 2005). Использовалась среда RYP-5052, состоящая из 1% пептона (Gibco, США), 0.5% дрожжевого экстракта (Gibco, США), 50 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50 мМ  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 25 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 0.5% глицерола, 0.05% глюкозы и 0.2% лактозы.

В среду RYP-5052, содержащую ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, была инокулирована единичная колония штамма-продуцента. Культивирование и индукцию экспрессии проводили в ферментере на 10 л до отсутствия существенного изменения  $\text{OP}_{600}$  за 1 час. Отбиралась аликвота клеток на анализ методом электрофореза, а оставшаяся биомасса была подвержена центрифугированию при 9000g.

Проводили электрофорез клеточных лизатов, приготовленных по методу, описанному выше, по методике, описанной выше.

Выход белка составил  $35 \pm 0,5\%$  от общего белка, что превысило показатели, полученные при индукции экспрессии целевого гена ИПТГ.

Несмотря на то, что наибольший выход белка наблюдали при индукции его синтеза лактозой, при использовании периодического культивирования выгоднее использовать требующий меньшее время для наращивания индуктор. Также важно учитывать расход реагентов. В связи с этим при культивировании штамма *Escherichia coli* для получения рекомбинантного флагеллина использовали метод периодических культур с подпиткой и

0,5 мМ ИПТГ в качестве индуктора. Культура с подпиткой оказалась наиболее эффективным путем для достижения высокой плотности клеток и высокой продуктивности.

Прекращали культивирование, открывали сливной кран на ферментере, сливали культуру в емкость вместимостью 10 л, закрывали крышку и оставляли емкость с культурой в холодильнике при температуре (4-7)°С.

Выключали и снимали двигатель турбины, выключали компрессор, выключали криостат охлаждения ловушки, отсоединяли все шланги, снимали крышку ферментера. Сосуд ферментера последовательно промывали двумя порциями дистиллированной воды по 8 л, промывные воды сливали в две полипропиленовые канистры объемом 10 л, в каждую канистру добавляли раствор перекиси водорода (30%), закрывали крышки канистр и их содержимое тщательно перемешивали. Канистры оставляли при комнатной температуре в течение 12-16 часов. В ферментер заливали 9 л дистиллированной воды, 1 л 30% раствора перекиси водорода, закрывали крышку и включали турбину ферментера (1000 оборотов/мин, 5 минут). Затем турбину ферментера останавливали и оставляли ферментер для стерилизации в течение 24 часов.

#### 2.2.2. в объеме 50 л

Штамм *E.coli* BL21(DE3)/pET151D-ТОРО\_F27 стерильно пересевали на скошенные косяки ЭДТА-содержащего агара и выдерживали в термостате 1 сутки. Для получения инокулята осуществляли, смыв культуры с косяков, заседали в жидкую среду с ЭДТА и культивировали 2 суток. После инокулят в количестве 10 мл переносили в стерильные 750-мл колбы с 200 мл стерильной жидкой среды и культивировали в течение 10 суток на качалке при 150 - 200 об/мин при температуре 28°С - 30°С.

Жидкую питательную среду (MgSO<sub>4</sub>\*7 H<sub>2</sub>O 10 мл/л, CaCl<sub>2</sub>\*2 H<sub>2</sub>O 20 мл/л, KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + NaН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*12 H<sub>2</sub>O 10 мл/л, EDTA 10 мл/л, Микроэлементы 1 мл/л; доводили до pH= 4,2; + 5,6 г/л ЭДТА, FeCl<sub>2</sub>\*4 H<sub>2</sub>O 1,5 г/л, Н<sub>3</sub>ВО<sub>3</sub> 0,06 г/л, MnCl<sub>2</sub>\*6 H<sub>2</sub>O 0,1 г/л, CaCl<sub>2</sub>\*6 H<sub>2</sub>O 0,12 г/л, ZnCl<sub>2</sub> 0,07 г/л, NiCl<sub>2</sub>\*6 H<sub>2</sub>O 0,025 г/л, CuCl<sub>2</sub>\*2 H<sub>2</sub>O 0,015г/л, Na<sub>2</sub>MoCl<sub>4</sub> 0,025 г/л, Витамины: Пиридоксин 20 мг, Тиамин 10 мг, Рибофлавин 10 мг, Никотиновая кислота 10 мг, Р - аминокислота 10 мг, липоевая кислота 10 мг, никотинамид 10 мг, Витамин В12 10 мг, биотин 4 мг, фолиевая кислота 4 мг. Растворяли все компоненты в 200 мл воды, стерилизовали при 0,5 атм. 30 минут и добавляли в жидкую питательную среду в количестве (1мл/л) применяли для получения посевного материала и для периодического культивирования.

Твердая питательная среда использовалась для получения свежей культуры штамма. Ее готовили, как жидкую, с добавлением 3% агара.

Поскольку наибольший выход белка наблюдали при периодическом культивировании с индукцией экспрессии 0,5 мМ ИПТГ, использовали данный индуктор и описанный режим ферментации для наработки целевого белка.

При достижении оптической плотности (ОП<sub>600</sub>) культурой клеток *E.coli* 6.0 О.Е., добавляли индуктор экспрессии – 0,5 мМ ИПТГ. Осуществляли индукцию экспрессии в течение 12 ч, с периодической подачей необходимых элементов, после чего клетки осаждали центрифугированием при 13000 g, в течение 6 мин при температуре 10°C. Осадок клеток взвешивался.

Клетки были ресуспендированы в 30 мл буфера (50 мМ ТрисНСl, рН, 50 мМ ЭДТА, 20 мМ L-цистеин, рН8.6) и были разрушены с использованием ультразвука.

По окончании культивирования субклона штамма-продуцента целевого белка и индукции экспрессии гена, кодирующего данный белок, 0,5 мМ ИПТГ, в ферментере объемом 50 литров, культуру клеток *E. coli* BL21(DE3)/pET151D-ТОРО\_F27 охлаждали, переносили в центрифужные стаканы и осаждали центрифугированием при 2000g. С помощью электрофореза с последующим денситометрическим сканированием электрофореграммы проверяли уровень экспрессии целевого гена. Полученную биомассу ресуспендировали в буфере следующего состава: 50мМ Трис-НСl рН 8.6, 50 мМ EDTA, 20 мМ L-цистеина в объеме 2 л.

Проводили лизис бактериальной масс: разрушали клетки с использованием ультразвука (время озвучивания – 10 мин, время импульса – 30 сек, время паузы между импульсами – 30 сек, амплитуда – 70%). После разрушения клеток суспензию осаждали с использованием центрифугирования при 30000g в течение 20 мин при температуре 10°C.

Проверку полноты лизиса клеток осуществляли следующим способом. Брали аликвоту лизата (2 мл), добавляли в питательную среду LB, содержащую 1% глюкозу, объемом 100 мл и инкубировали при 37°C в термостатируемом шейкере в течение 6 часов. Питательная среда осталась прозрачной и имела оптическую плотность менее 0.025 при длине волны 600 нм, что подтверждает полноту лизиса.

Таким образом, выход белка составил 800 мг с 1 л питательной среды при культивировании в ферментере на 50 л с индукцией экспрессии целевого гена 0,5 мМ ИПТГ.

### **Пример 3. Выделение и очистка флагеллина**

Емкость сорбента влияет на итоговый выход белка. В качестве сорбентов были исследованы Ni-NTA Agarose (Ni-NTA сефароза) фирмы QIAGEN, каталожный номер 30230, ProBond™ Nickel-Chelating Resin фирмы Invitrogen, каталожный номер R801-15, Ni Sepharose 6 Fast Flow фирмы Amersham Bioscience.

Обоснование выбора именно этих сорбентов заключается в том, что в технологии очистки составы реагентов, используемых для отмывки белков, подходят для зарядов частиц этих сорбентов, и можно варьировать только сорбенты, сохраняя общую технологию идентичной.

Была проведена очистка флагеллина из лизатов клеток *E.coli* штамма BL21(DE3)/pET151D-ТОРО\_F27 методом иммобилизованной металлоаффинной хроматографии (ИМАХ) с использованием сорбента Ni-NTA сефарозы. Связывание с данным сорбентом происходит за счет 6 остатков гистидина, имеющих на N-конце полученного рекомбинантного белка. Процедуру очистки белка проводили в нативных и денатурирующих условиях.

Для очистки синтезированного белка в нативных условиях биомассу клеток *E.coli* штамма BL21(DE3)/pET151D-ТОРО\_F27 разрушали с использованием буфера, содержащего имидазол, Тритон X-100, Твин 20, лизоцим и ДНКазу 1. После разрушения остатки бактериальных клеток осаждали центрифугированием, супернатант фильтровали через ПВДФ фильтр с диаметром пор 0,22 микрона. Далее к полученному фильтрату добавляли сорбент Ni-NTA сефарозу, уравновешенный буфером для разрушения клеток без ферментов, из расчета, что 1 мл сорбента связывает, как минимум, 40 мг белка, и проводили связывание при постоянном перемешивании в течение 2 ч. После сорбент осаждали центрифугированием и в минимальном объеме наносили на гравитационную хроматографическую колонку. Элюцию проводили ступенчатым градиентом имидазола (40 мМ, 100 мМ, 150 мМ, 200 мМ и 300 мМ), при этом на каждую ступеньку приходился объем элюирующего раствора, равный 10 объемам колонки. Выход и чистота белка контролировали методом диск-электрофореза и измерением концентрации белка по методу Бредфорд.

Белок флагеллин элюируется с колонки размытым пиком: начинает сходить при концентрации имидазола 40 мМ, достигает максимума при концентрации имидазола 100 мМ и заканчивает элюироваться при концентрации имидазола 150 мМ. При этом чистота белка в мажорных фракциях, элюируемых 100 мМ имидазолом, составила 80% от примесных белков бактериальных клеток.

Для очистки целевого белка в денатурирующих условиях биомасса клеток *E.coli* штамма BL21(DE3)/pET151D-ТОРО\_F27 разрушалась с использованием буфера, содержащего 6М гуанидин гидрохлорид. После разрушения остатки бактериальных клеток осаждали центрифугированием, супернатант фильтровал через ПВДФ фильтр с диаметром пор 0,22 микрона. К полученному раствору белка добавляли 600 мл сорбента Ni-NTA-FF (диаметр частицы сорбента - 165 микрометров, связывающая способность – 1 мл сорбента



связывает 40 мг рекомбинантного белка, 1 миллилитр сорбента имеет  $6 \times 10^{14}$  связывающих центров), уравновешенного буфером для разрушения клеток, из расчета, что 1 мл сорбента связывает как минимум 40 мг белка. Сорбцию проводили при постоянном перемешивании в течение 2 часов. После сорбент осаждали центрифугированием и в минимальном объеме наносили на гравитационную хроматографическую колонку или промывали с использованием ступенчатого градиента pH буфером, содержащим 8М мочевины, без нанесения на гравитационную колонку. В первом случае сорбент промывали десятикратным объемом буфера следующего состава: 10 mM Tris-HCL pH 7.8, затем - десятикратным объемом буфера следующего состава: 10 mM Tris-HCL pH 6.0. Во втором случае элюцию проводили буфером, содержащим 10 mM Tris-HCl pH 8.6 100 mM имидазол, на каждую ступеньку приходилось как минимум две промывки, по 10 объемов колонки каждая. Элюцию проводили буфером с pH 3.8-4.

Выход и чистоту белка контролировали методом диск-электрофореза и измерением концентрации белка по методу Бредфорд.

При очистке в нативных условиях, т.е. без разрушения третичной структуры белка, с хорошим выходом за один хроматографический цикл получили целевой белок с чистотой 80%, выход белка при этом составил 5 мг с 1 литра культуры клеток.

В результате очистки синтезированного белка в денатурирующих условиях, т.е. с разрушением третичной структуры белка, с хорошим выходом за один хроматографический цикл, удалось избавиться от всех примесных белков штамма-продуцента за один хроматографический цикл с использованием только одного типа сорбента - Ni-NTA сефарозы. По данным денситометрического анализа полученной электрофореграммы, чистота выделенного и очищенного белка составила 98%. Количество белка, выделенного и очищенного из 50 мл культуры бактерий, было определено по методу Бредфорд и составило 40 мг белка, что соответствует выходу 600 мг на 1 литр культуры.

Наибольший выход белка наблюдали при использовании сорбента Ni-NTA Agarose фирмы QIAGEN (600±25 мг на 1 литр культуры). При использовании ProBond™ Nickel-Chelating Resin выход белка составил 300±42 мг на литр культуры, при использовании сорбента Ni Sepharose 6 Fast Flow выход белка составил 420±12 мг.

#### **Пример 4. Получение флагеллина в промышленных количествах**

Культивирование осуществляли в ферментере объемом 50 литров. Было проведено три цикла (серии) по наработке образцов фармацевтической субстанции. Нарботка проводилась по следующей схеме.

Осуществляли высеv субклона штамма-продуцента из рабочего музея. Клетки штамма *Escherichia coli* - продуцента флагеллина - рассевали микробиологической петлей

из криофлаконов на поверхность чашки Петри, содержащей LB-агар с добавлением 100 мкг/мл ампициллина. После инкубации в термостате в течение 18 часов выросшие колонии использовали в качестве посевного материала.

Материал 5 колоний, выросших на чашке Петри, переносили с помощью микробиологической петли с поверхности агара в стерильную коническую колбу емкостью 1000 см<sup>3</sup>, в которую помещали 150,0 см<sup>3</sup> стерильной среды LB, содержащей 100 мкг/см<sup>3</sup> ампициллина. Колбу помещали в орбитальный шейкер и инкубировали в нем при температуре +37°C и скорости вращения платформы 250 оборотов/минуту. Полученной культурой засеивали ферментер объемом 50 литров. Индукцию синтеза целевого белка осуществляли при использовании 0,5 мМ ИПТГ. Ферментация длилась 12 часов, при периодическом культивировании. Оптическая плотность биомассы после культивирования определяли в кювете на спектрофотометре, и она составляла 16 оптических единиц при длине волны 600 нм.

Осуществляли концентрирование биомассы. При центрифугировании при 2000g получали 1.5 л концентрированной биомассы, которая содержала 90 г клеток на сырой вес. С помощью электрофореза в ПААГ (12,5%) проверяли уровень экспрессии рекомбинантных белков в штаммах-продуцентах. Он составлял 35% от общих бактериальных белков. Эту долю определяли с помощью денситометрического сканирования электрофореграммы. Полученную биомассу ресуспендировали в буфере следующего состава: 50 мМ Трис-НСl pH 8.6, 50 мМ EDTA, 20 мМ L-цистеина в объеме 1 литр.

Осуществляли лизис бактериальной массы соницированием 30 с пульс, 30 с пауза, амплитуда 70% (от 750 Вт), время 10 минут. Использовали прибор Sonics Vibra Cell 750.

Проверку полноты лизиса клеток осуществляли двумя независимыми способами. Отбирали аликвоту лизата 2 мл, добавляли в питательную среду LB, содержащую 1% глюкозу, объемом 100 мл и инкубировали при 37°C в термостатируемом шейкере в течение 6 часов. При этом питательная среда оставалась прозрачной и имела оптическую плотность менее 0.025 при длине волны 600 нм.

Полученный лизат центрифугировали при 20 000 g в течение часа. Отбирали супернатант, и с образцом объемом 20 мкл проводили электрофорез по Леммли. На электрофореже были видны только белки *E.coli*, и отсутствовала фракция, соответствующая экспрессии каждого рекомбинантного белка.

Для очистки рекомбинантного флагеллина использовали ИМАХ в денатурирующих условиях. К супернатанту, полученному после осаждения клеточных остатков, разрушенных в денатурирующих условиях, добавляли сорбент Ni-NTA сефарозу (GE

Helthcare, США), отмытый несколько раз в буфере для разрушения клеток, из расчета, что 1 мл сорбента связывает 40 мг белка. Связывание проводили при комнатной температуре в термостатированном шейкере роторного типа при 200 об. в мин. После чего сорбент осаждали центрифугированием при 600g, ресуспендировали в малом объеме буфера для разрушения клеток без использования ферментов и наносили на гравитационную колонку. Отмывку сорбента проводили ступенчатым градиентом pH (7.8, 6.0 и 5.3) в буфере, содержащем 20 mM K-Na фосфатного буфера, 500 mM NaCl и 8M мочевины. Элюцию белка с сорбента проводили с использованием буфера, содержащего 20 mM K-Na фосфатного буфера, 500 mM NaCl и 8M мочевины, pH 3.8-4.0. Полученные фракции анализировали методом диск-электрофореза в ПААГ с SDS, концентрацию белка в них определяли по методу Бредфорд.

В результате очистки целевого рекомбинантного белка в денатурирующих условиях удалось избавиться от всех примесных белков штамма-продуцента за один хроматографический цикл с использованием только одного типа сорбента - Ni-NTA сефарозы. По данным денситометрического анализа полученной электрофореграммы, чистота выделенного и очищенного белка составила 98%. Количество белка, выделенного и очищенного из культуры бактерий, было определено по методу Бредфорд, выход составил 800 мг на 1 литр культуры.

Однородность полученной фармацевтической субстанции целевого белка проверяли с помощью метода ВЭЖХ (Высокоэффективная жидкостная хроматография).

Хроматографическую однородность препарата флагеллина проверяли методом обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ) на колонке P20 RPC HR 16/10 ("Фармация", Швеция) в режиме HPLC. Нагрузка на колонку составляла 1,0 мг. Элюцию проводили градиентом концентрации ацетонитрила в трифторуксусной кислоте (ТФУ) при комнатной температуре (раствор А=0,1 %-ная ТФУ, раствор В-ацетонитрил в 0,1 %-ной ТФУ). Регистрацию белка в элюате проводили по поглощению при 280 нм.

Хроматография показала, что полученная фармацевтическая субстанция флагеллина однородна, поскольку белок выходит при ОФХ одним пиком, чистота белка достигает 99,88% у образца номер 1, 100% у образца номер 2 и 100% у образца номер 3.

#### **Пример 5. Анализ активности полученного флагеллина**

Анализ активности полученного флагеллина проводили на белых аутбредных крысах массой 200 грамм возрастом 5 месяцев, что соответствует углубленным испытаниям (Каркищенко; 2007).

Модель, основанная на крысах, предпочтительнее, так как большинство литературных данных имеются именно по этой модели – на основе крыс, и поэтому

получаемые данные легче сравнивать с имеющимися в литературе данными (на 1000 публикаций по экспериментам с крысами – 240 публикаций с мышами и 12 публикаций с хомячками). Второе обоснование крысиной модели – это способность организма этого животного выдерживать меньшие дозы радиации, чем у мыши или хомячка (у крысы полуметальная доза составляет 7,5 грей, у мыши и хомячка – 9), поэтому эффект от препарата имеет более достоверные значения, если он обнаруживается. К тому же многие имеющиеся радиационные установки дают дозу не более 8 грей. Таким образом, использование крыс более предпочтительно и по этой третьей, технической причине.

Для эксперимента использовали взрослых самцов крыс линии Вистар, 180 – 190 г. Экспериментальные животные поступили из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН. Животных содержали в условиях вивария с соблюдением режима приема пищи и воды. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней. В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы (опыт и контроль) с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, были исключены из исследования в течение карантина. Клетки с животными были помещены в отдельные комнаты. Световой режим: 12 ч — свет, 12 ч — темнота. Температура воздуха поддерживалась в пределах 19–25°C, относительная влажность — 50–70%. Температура и влажность воздуха регистрировали ежедневно. При изменении погодных условий контролировался воздухообмен в помещении с помощью анемометра и путем измерения содержания в воздухе углекислого газа и аммиака. Был установлен режим проветривания, обеспечивающий около 15 объемов помещения в час, концентрацию CO<sub>2</sub> не более 0.15 объемных %, аммиака — не более 0.001 мг/л. Животные получали воду *ad libitum*.

В качестве источника радиационного облучения использовалась установка типа «Гамма-панорама» с модификациями, смонтирована в специальных защитных условиях. Источником излучения служит <sup>137</sup>Cs, запаянный в двойную ампулу из нержавеющей стали и находящийся за защитным экраном в нерабочем положении установки.

В качестве режима облучения была отработана дозировка 8,0 Гр, и на пробных группах животных были проведены испытания, с целью апробации выбранной модели. Испытания носили предварительный характер, и целью ставилось выяснение дозы препарата флагеллина (ФЛ) и рабочих диапазонов параметров в эксперименте. Результаты представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, полученный препарат флагеллина является активным – эффективен как при применении до облучения, так и после.

Таблица 1 - Выживаемость животных после облучения (8,0 Гр, LD<sub>80-90</sub>).

Группы животных		N	30 сутки после облучения
<b>ФЛ за 15-30' до облучения</b>			
<b>1</b>	ФЛ в дозе 2,0 мг/кг	<b>15</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	ФЛ в дозе 1,0 мг/кг	<b>15</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	ФЛ в дозе 0,5 мг/кг	<b>15</b>	<b>9</b>
<b>4</b>	ФЛ в дозе 0,2 мг/кг	<b>15</b>	<b>10</b>
<b>5</b>	Контроль	<b>15</b>	<b>3</b>
<b>ФЛ через 15-30' после облучения</b>			
<b>6</b>	ФЛ в дозе 2,0 мг/кг	<b>12</b>	<b>8</b>
<b>7</b>	ФЛ в дозе 1,0 мг/кг	<b>12</b>	<b>8</b>
<b>8</b>	ФЛ в дозе 0,5 мг/кг	<b>13</b>	<b>7</b>
<b>9</b>	ФЛ в дозе 0,2 мг/кг	<b>14</b>	<b>3</b>
<b>10</b>	Контроль	<b>8</b>	<b>1</b>

**Технология выделения и очистки рекомбинантного флагеллина****Формула изобретения**

Способ получения активного высокоочищенного рекомбинантного флагеллина, охарактеризованного последовательностью аминокислот SEQ ID NO.:1, заключающийся в том, что используют субклон штамма-продуцента *E.coli* BL21(DE3)/pET151D-ТОРО\_F27, содержащего ген, кодирующий такой флагеллин, оптимизированный по кодонному составу для экспрессии в клетках *E.coli*, обеспечивающий выход целевого белка до 45% от общего белка, культивируют клетки такого субклона с использованием индуктора экспрессии целевого гена 0,5 мМ ИПТГ, лизируют клетки, осаждают клеточные осадки, осуществляют выделение и очистку белка из супернатанта в денатурирующих условиях с использованием Ni-NTA сефарозы.

## ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

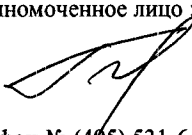
## ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42

Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201792179

Дата подачи: 30 октября 2017 (30.10.2017)		Дата испрашиваемого приоритета:
Название изобретения: Технология выделения и очистки рекомбинантного флагеллина		
Заявитель: ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "УНИВЕРСАЛЬНЫЕ БИОСИСТЕМЫ" (ООО "УБС")		
<input type="checkbox"/> Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа) <input type="checkbox"/> Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)		
А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:		<i>C12P 21/02 (2006.01)</i> <i>C12N 15/70 (2006.01)</i> <i>C12N 1/21 (2006.01)</i> Согласно международной патентной классификации (МПК) <i>C12R 1/19 (2006.01)</i>
Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:		
Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК) C12P 21/02, C12N 15/70, 1/21, C12R 1/19		
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 2524133 C2 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ "ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОСОБО ЧИСТЫХ БИОПРЕПАРАТОВ" ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА) 27.07.2014	1
A	RU 2012116413 A (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "БИОИНЖЕНЕРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ") 27.10.2013	1
A	LU Y et al. Escherichia coli-based cell free production of flagellin and ordered flagellin display on virus-like particles. Biotechnol Bioeng, 2013, 110(8): pp. 2073-2085 (реферат) [найдено 18.07.2018] Найдено из PubMed, PMID:23519642	1
A	ГРЕБЕНЮК А.Н. и др. Получение различных вариантов рекомбинантного флагеллина и оценка их радиозащитной эффективности. Вестник Российской военно-медицинской академии, 2013, 3(43): с. 75-80	1
<input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы В		<input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении
* Особые категории ссылочных документов:		"Т" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
"А" документ, определяющий общий уровень техники		"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее		"У" документ, имеющий наиболее близкое от поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.		"&" документ, являющийся патентом-аналогом
"Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета		"L" документ, приведенный в других целях
"D" документ, приведенный в евразийской заявке		
Дата действительного завершения патентного поиска:		20 июля 2018 (20.07.2018)
Наименование и адрес Международного поискового органа: Федеральный институт промышленной собственности РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., 30-1. Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		Уполномоченное лицо:  М. Белугин Телефон № (495) 531-6481