

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201890063** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2019.07.31**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.01.14**

(51) Int. Cl. *C12N 1/21* (2006.01)  
*C12N 15/09* (2006.01)  
*C12N 15/24* (2006.01)  
*C12N 15/63* (2006.01)  
*C12N 15/70* (2006.01)  
*C12R 1/19* (2006.01)

---

(54) **ШТАММ БАКТЕРИЙ ESCHERICHIA COLI - ПРОДУЦЕНТ ИЛ-17А ЧЕЛОВЕКА**

---

(96) **2018000008 (RU) 2018.01.14**

(71) Заявитель:  
**ДУХОВЛИНОВ ИЛЬЯ  
ВЛАДИМИРОВИЧ; СИМБИРЦЕВ  
АНДРЕЙ СЕМЕНОВИЧ (RU)**

(72) Изобретатель:  
**Духовлинов Илья Владимирович,  
Симбирцев Андрей Семенович,  
Климов Николай Анатольевич (RU)**

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

(57) Изобретение относится к области биотехнологии и касается рекомбинантного штамма бактерий *Escherichia coli* - продуцента биологически активного интерлейкина-17А (ИЛ-17А) человека. Охарактеризованный штамм получен трансформацией культуры клеток *E. coli* BL21 (DE3) рекомбинантной плазмидной ДНК рЕТ-28a(+)-IL-17А, представленной вектором рЕТ-28a(+), содержащим вставку гена, кодирующего ИЛ-17А, охарактеризованный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, оптимизированного по кодонному составу для экспрессии в клетках *E. coli*. Представленное решение обладает высокой стабильностью и высокой продуцирующей способностью в отношении рекомбинантного ИЛ-17А человека,

**201890063**  
**A1**

**201890063**

**A1**

## Штамм бактерий *Escherichia coli* – продуцент ИЛ-17А человека

### Описание

Изобретение относится к биотехнологии и касается рекомбинантного штамма бактерий *Escherichia coli* - продуцента биологически активного интерлейкина-17А (ИЛ-17А).

Интерлейкин-17 относится к провоспалительным цитокинам и участвует во многих этапах иммунного ответа. Он стимулирует продукцию хемокинов и, как следствие, стимулирует миграцию нейтрофилов к месту воспаления. Одним из важнейших биологических эффектов ИЛ-17 является его способность к продукции многих цитокинов и хемокинов, обладающих плеiotропным действием на разные клетки иммунной системы, в частности, ИЛ-8, ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1, а также простагландина E2. ИЛ-17 запускает обширную тканевую реакцию, приводящую к миграции нейтрофилов в зону воспаления. Он может вырабатываться многими клетками, однако наиболее выраженную продукцию обеспечивают Т-хелперы 17 типа (Th17) (1).

Многочисленными исследованиями установлено, что ИЛ-17 является ключевым цитокином, организующим иммунную защиту организма от экстраклеточных микробов, в частности, от грибков рода *Candida*.

Можно выделить несколько основных механизмов противогрибковой защиты, которые меняются в зависимости от ткани. Оральный и кожный кандидозы зависят, главным образом, от механизмов, опосредованных ИЛ-17, вагинальные кандидозы зависят как от факторов, связанных с ИЛ-17, так и от сопутствующих факторов, таких, как местная микрофлора и изменения pH. В защите от системного кандидоза важную роль играет IFN $\gamma$ , продуцируемый клетками Th1 и NK, и факторы, связанные с ИЛ-17 (2-4). Таким образом, возможно применение ИЛ-17А в качестве лекарственного препарата для лечения кандидозов, в частности, кожных и вагинальных кандидозов, для чего требуется получение рекомбинантного ИЛ-17А. В свою очередь, получение ИЛ-17А в промышленных масштабах требует создания штамма-продуцента, стабильно продуцирующего биологически активный ИЛ-17А человека в значительных количествах.

Известно получение ИЛ-17А морской свинки из клеток *Escherichia coli*, трансформированных плазмидным вектором, содержащим ген ИЛ-17А морской свинки (5). После разрушения индуцированных бактериальных клеток и хроматографической очистки был получен рекомбинантный ИЛ-17А морской свинки, трехмерная структура которого не отличалась от структуры очищенного нативного ИЛ-17А.

Известно получение рекомбинантного ИЛ-17А человека посредством культивирования клеток *Escherichia coli* M15, трансформированных экспрессионным вектором PQE3.0, содержащим ген ИЛ-17А человека. Экспрессия данного гена осуществлялась посредством индукции промотора изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопираннозидом (ИПТГ). После разрушения клеток и последующей хроматографической очистки был получен ИЛ-17А, обладавший биологической активностью (6).

Также известно получение рекомбинантного ИЛ-17А человека путем экспрессии гена данного белка в клетках *Escherichia coli* с последующей очисткой путем сочетания катионообменной хроматографии, хроматографии в обращенной фазе и хроматографии на флуороапатите (7).

Полученные в данных работах образцы ИЛ-17А человека обладали биологической активностью. Однако задача получения штамма клеток, стабильно продуцирующего ИЛ-17А человека, решена не была.

Задачей, решаемой авторами, являлось создание штамма *Escherichia coli*, позволяющего получать биологически активный рекомбинантный ИЛ-17А со стабильным высоким выходом.

Технический результат был достигнут созданием штамма *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET-28a(+)-IL-17A - продуцента биологически активного интерлейкина-17А человека, полученного трансформацией культуры клеток *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen, США, генотип F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm me131 (DE3)) рекомбинантной плазмидной ДНК pET-28a(+)-IL-17A, созданной *in vitro* и содержащей ген, кодирующий зрелый интерлейкин-17А человека (132 а.о.), охарактеризованный SEQ ID NO:1, оптимизированный по кодонному составу для экспрессии в клетках *E. coli*. 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.

Технический результат также выражается также в расширении спектра штаммов-продуцентов для получения ИЛ-17А человека, что немаловажно, учитывая широкое применение данного белка. Клинический опыт показал, что целесообразно иметь в арсенале несколько аналогичных фармацевтических препаратов, получаемых различными технологиями или даже методами. Также длительное лечение (годами) одним препаратом может вызвать в организме уменьшение чувствительности к нему.

Штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET-28a(+)-IL-17A характеризуется следующими культурально-морфологическими и физико-биохимическими свойствами:

Культурально-морфологические особенности штамма: грамотрицательные прямые палочки, размером 1,1-1,5×2,0-3,0 мкм, одиночные, спор и капсул не образуют. Каталазоположительные. Оксидазоотрицательные. Факультативные анаэробы. Клетки хорошо растут на простых питательных средах, содержащих и не содержащих канамицин, например, на среде LB. 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. Клетки растут в интервале температур от 8°C до 43°C, интервал для культивирования - 28-38°C, оптимум роста при 37°C. Интервал pH 5-7. Катализируют D-глюкозу и некоторые другие углеводы с образованием кислоты и газа, не сбраживают галактозу. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная, не образуют H<sub>2</sub>S, гидролизуют мочевины.

Устойчив к канамицину (30 мкг/мл).

Характеристики полезного вещества, синтезируемого штаммом: рекомбинантный белок – интерлейкин 17A человека, длиной 133 аминокислотных остатка.

Продуктивность штамма - рекомбинантный ИЛ-17A человека составляет не менее 34% белка клеточного лизата при культивировании в условиях индукции.

Криоконсервация. В запаянных ампулах штамм, лиофильно-высушенный в среде, содержащей на 30 мл воды - 5 г сахарозы, 1,5 г желатина, хранится при комнатной температуре в течение 20 лет.

Культивирование штамма: культивирование при температуре 28-38°C в термостате или качалке, в агаризованной (2% агара) или жидкой LB-среде соответственно. Селективные условия - добавление 30 мкг/мл канамицина.

Ферментация: ферментацию ведут в жидкой среде РУР-5052, содержащей 0,2% лактозы, с добавлением 30 мкг/мл канамицина, при перемешивании и аэрировании, при температуре 28-38°C в течение 18 часов. Возможна также ферментация с использованием ИПТГ.

#### *Краткое описание графических материалов*

Фиг.1. Электрофореграмма спектра белков, полученного из лизатов клеток *Escherichia coli* штамма BL21 (DE3)/pET-28a(+)-IL-17A после индукции синтеза белка 0,2% лактозой, 1 – маркер молекулярных весов, 2 - без индукции, 3 – индукция лактозой.

Таблица 1. Показатели стабильности плазмиды pET-28a(+)-IL-17A в различных клонах штамма *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET-28a(+)-IL-17A, левый столбец - номер

клона, правый столбец - содержание клонов, сохранивших плазмидную ДНК рЕТ-28a(+)-IL-17A после выращивания в неселективных условиях в течение 18 часов.

Таблица 2. Содержание рекомбинантного ИЛ-17A в лизатах клеток различных субклонов клона №4 при индукции синтеза белка 0,1 мМ ИПТГ, левый столбец - номер анализируемого субклона-производителя, правый столбец - доля рекомбинантного ИЛ-17A от суммы всех белков на денситограмме.

Таблица 3. Секрция в среду культивирования ИЛ-6 клетками U937 при добавлении полученного рекомбинантного ИЛ-17A человека, левый столбец - концентрация рекомбинантного ИЛ-17A, нг/мл, правый столбец - концентрация ИЛ-6 в среде культивирования клеток, пг/мл (среднее ± станд. отклонение).

Сущность изобретения поясняется следующими примерами.

**Пример 1.** Создание генетической конструкции, обеспечивающей синтез ИЛ-17A человека в клетках *Escherichia coli*.

Аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, характеризующую ИЛ-17A человека, без сигнальной последовательности, переводили в нуклеотидную с одновременной кодонной оптимизацией для экспрессии в клетках *E.coli* с использованием программы на сайте molbiol.ru и добавлением старт- и стоп-кодона, а также сайтов рестрикции, фланкирующих получаемый ген. Методом химико-ферментативного синтеза был синтезирован фрагмент ДНК, содержащий последовательность нуклеотидов, кодирующую зрелую форму ИЛ-17A человека, фланкированную короткими участками, содержащими сайты рестрикции Nco I и Xho I (SEQ ID NO:2).

Полученный фрагмент ДНК, а также вектор рЕТ-28a(+) (Novagen, США) обрабатывали эндонуклеазами рестрикции Nco I и Xho I по инструкции к данным ферментам. Далее полученные фрагменты очищали с использованием препаративного электрофореза и использовали в реакции лигирования.

Осуществляли реакцию лигирования очищенных рестрицированных фрагментов 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 мМ Tris-HCl (pH 7,5 при 37°C), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ 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.). Реакционную смесь доводили до 35 мкл безнуклеазной водой и инкубировали при 22°C в течение 4 часов. Ферментативную реакцию останавливали 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..

Подготавливали компетентные клетки *Escherichia coli* штамма DH10B/R (Gibco BRL, США) с генотипом F-mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M 15  $\Delta$ lacX74 deoR recA1 endA1 araD139  $\Delta$ (ara,leu)769 galU galK $\lambda$ - rpsL 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 канамицином 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 pET-28a(+)-IL-17A.

Наработку и выделение плазмидной ДНК осуществляли следующим образом. Единичную колонию клеток продуцента плазмид *E. coli*, выращенную на LB-агаре в чашке Петри с добавлением канамицина, инокулировали в стандартную жидкую среду LB (Gibco BRL, США), 2–10 мл, содержащую канамицин 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.

**Пример 2.** Получение штамма-продуцента ИЛ-17А человека и исследование его стабильности.

Выделенной согласно описанной в Примере 1 методике плазмидной ДНК pET-28a(+)-IL-17A трансформировали клетки *E. coli* штамма BL21 (DE3) (Invitrogen, USA), с генотипом F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm mel31 (DE3), содержащие в геноме ген, кодирующий полимеразу фага T7 под контролем бактериального промотора, индуцируемого лактозой,  $\lambda$ De3 лизоген и мутацию mel31. Мутированный ген *rne* (*rne131*) кодирует усеченную форму РНКазы E, что уменьшает внутриклеточное разрушение мРНК, приводя к увеличению ее ферментативной стабильности и, как следствие, к повышению продукции клетками данного штамма рекомбинантного белка. *lon*- 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 в Примере 1, вместо десятикратно разведенной лигазной смеси использовали раствор плазмиды в воде. Выросшие клоны проверяли на наличие целевой плазмидной ДНК с использованием секвенирования выделенной плазмидной ДНК и анализировали.

Трансформированные клетки высевали на плотную агаризованную LB-среду, содержащую 30 мкг/мл канамицина и 1% глюкозы. Далее отдельные выросшие колонии трансформантов выращивали в жидкой питательной среде LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина, до окончания логарифмической фазы роста, после чего культуру вносили в соотношении 1:100 в 100 мл жидкую среду LB без антибиотика. После выращивания в течение 18 часов, культуры клеток раститровывали и высевали на плотную

питательную среду LB с канамицином (30 мкг/мл) и на аналогичную среду, не содержащую антибиотика. Число колоний, выросших в среде с антибиотиком, отражающее число клеток, сохранивших плазмиду при выращивании без селективного давления, делили на число клеток, выросших в среде без антибиотика (общее число клеток). Результаты, представленные в таблице 1, показали, что отдельные клоны значительно различаются по скорости потери плазмидной ДНК в неселективных условиях (Таблица 1). Плазмида рЕТ-28a(+)IL-17A была наиболее стабильной в клоне №4, в котором за 18 часов культивирования плазмиду потеряли 6% клеток.

Для дальнейшей работы был отобран наиболее стабильный клон - №4. Далее этот клон рассеивали истоющим штрихом на чашки Петри и изолировали его субклоны, обозначенные как 4-1, 4-2, 4-3, 4-4, 4-5, которые выращивали в жидкой среде LB в термостатированной качалке роторного типа при температуре 37°C, скорости вращения платформы 250 об/мин, до  $A_{600} = 0,6$ , после чего проводили индукцию синтеза рекомбинантного белка индуктором ИПТГ, добавляя его к культуре до конечной концентрации от 1 мМ до 2 мМ. Через 4 часа клетки собирали центрифугированием, лизировали и анализировали продукцию рекомбинантного белка с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях. Денситометрический анализ результатов электрофореза клеточных лизатов с помощью программы TotalLab показал, что субклон 4-2 способен обеспечивать наиболее высокий уровень синтеза белка с ожидаемым для рекомбинантного ИЛ-17A молекулярным весом (Таблица 2). Аналогичные результаты были продемонстрированы при индукции ИПТГ и в иных концентрациях – 0,5 мМ, 1 мМ.

Клетки клона №4-2 выращивали в жидкой питательной среде в термостатированной качалке роторного типа при температуре 37°C, скорости вращения платформы 250 об/мин до середины логарифмической фазы роста и криоконсервировали под названием штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3)/рЕТ-28a(+)IL-17A – продуцент рекомбинантного ИЛ-17A человека.

**Пример 3.** Исследование продуктивности полученного штамма-продуцента ИЛ-17A человека

Продуктивность полученного штамма-продуцента изучали путем культивирования клеток в жидкой питательной среде РУР-5052, состоящей 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 (9).

В среду РУР-5052, содержащую канамицин 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 18 часов до отсутствия существенного изменения ОП<sub>600</sub> за 1 час. Отбирали аликвоту на анализ экспрессии гена, кодирующего ИЛ-17А человека, методом электрофореза в ПААГ, каждый час, по окончании индукции биомассу осаждали центрифугированием при 9000g.

Оптическая плотность (ОП<sub>600</sub>) культуры после окончания культивирования составила 7 О.Е. В качестве контроля использовали неиндуцированную культуру (без добавления лактозы). Образцы биомассы клеток лизировали и анализировали методом диск-электрофореза в ПААГе в денатурирующих условиях с последующей денситометрией.

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).

Результат представлен на фиг.1. Как видно из фиг.1, индукция лактозой культуры клеток *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET-28a(+)-IL-17A приводит к синтезу белка с молекулярным весом примерно 15 кДа, что соответствует ожидаемому молекулярному весу для зрелого ИЛ-17А человека. Анализ денситограммы полиакриламидного геля, представленного на фиг.1, выполненный с помощью программы TotalLab, показал, что рекомбинантный ИЛ-17А составляет 37% общего белка клеточного лизата. Данный эксперимент повторяли еще два раза в аналогичных условиях, при этом доля рекомбинантного белка составила 34% и 36% от общего белка клеточных лизатов.

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 нерастворимость полученного ИЛ-17А человека.

**Пример 4.** Очистка рекомбинантного ИЛ-17А и изучение его биологической активности.

Выращенные в условиях, идентичных изложенным в примере 3, в течение 18 часов клетки *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET-28a(+)-IL-17A осаждали центрифугированием, лизировали, после чего рекомбинантный ИЛ-17А рефолдировали и очищали.

После окончания индукции осажденную биомассу лизировали с помощью 3 циклов соникации по 30 сек с перерывом в 2 мин на льду. Затем трехкратно отмывали

тельца включения 0.2 М дезоксихолятом натрия, что позволяло получить препарат без примесей бактериальных эндотоксинов.

Растворяли тельца включения в 8 М растворе мочевины, затем осуществляли рефолдинг белка в буфере (0.1М Tris pH 8.0, 0.2 mM ЭДТА) с 0.5 М L-аргинином. В одном из вариантов удаляли метионин на N-конце белка.

Проводили хроматографическую очистку полученного раствора белка. Около 1200 мл обессоленного супернатанта помещали на 20 мл S-Sepharose колонку, уравновешенную 20 mM Tris-HCl pH 8.0. Колонку отмывали 200 мл 50 mM Tris pH 8.0, белок элюировали 160 мл линейного градиента 50 mM Tris pH 8.0 1M NaCl. Фракцию очищенного на S-Sepharose ИЛ-17А человека помещали на S-100 колонку (2.5\*80 см), предварительно уравновешенную фосфатным буфером. Собирали фракции по 1 мл, анализировали электрофоретически в 20% ПААГ-ДДС-Na, фракции с целевым белком объединяли, концентрацию белка в них определяли по методу Бредфорд. Колонку откалибровывали с использованием 10 мг бычьего сывороточного альбумина, овальбумина и соевого трипсинового ингибитора.

Чистота выделенного ИЛ-17А человека составила не менее 97% по результатам электрофореза в полиакриламидном геле с последующей денситометрией.

Биологическую активность рекомбинантного ИЛ-17А оценивали в тесте, основанном на способности клеток U937 (макрофагальная клеточная линия человека) секретировать интерлейкин-6 (8).

Для постановки теста клетки линии U937 вносили в количестве  $5 \times 10^4$  на лунку в 12-луночную плоскодонный культуральный планшет («Costar», США) в 2 мл среды RPMI1640 с 10% фетальной сыворотки. Планшет инкубировали 48 часов в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в условиях абсолютной влажности. За время инкубации клетки образовывали плотный монослой. Далее к клеткам добавляли очищенный рекомбинантный ИЛ-17А человека, получение которого описано в примере 3, в объеме 100 мкл в культуральной среде (использовали по 3 параллельных лунки для каждой концентрации). Затем планшет инкубировали еще 24 часа в CO<sub>2</sub>-инкубаторе и в культуральной среде каждой ячейки определяли концентрацию ИЛ-6 с помощью коммерческого набора на основе твердофазного иммуноферментного анализа (ООО «Цитокин»). Результаты для белка с метионином и без него на N-конце были сходными.

Результаты двух экспериментов по определению биологической активности рекомбинантного ИЛ-17А представлены в таблице 3.

Из таблицы 3 следует, что рекомбинантный ИЛ-17А человека, продуцируемый клетками штамма *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET-28a(+)-IL-17A, обладает

биологической активностью и дозозависимо усиливает продукцию ИЛ-6 клетками U937, 50% эффективная доза для рекомбинантного ИЛ-17А в использованном тесте составляет примерно 20 нг/мл.

Таким образом, показано, что полученный штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET-28a(+)IL-17А обладает высокой стабильностью и продуктивностью, и способен обеспечивать получение биологически активного ИЛ-17А человека.

#### *Список литературы*

1. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. С-Пб, 2008
2. Conti H.R., Gaffen S.L. IL-17-mediated immunity to the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Immunol.* 2015; 195(3): 780–788.
3. Sparber F., Gut-Landmann SL. Interleukin 17-Mediated Host Defense against *Candida albicans*. *Pathogens* 2015, 4, 606-619
4. Pietrella D., Rachini A., Pines M., Pandey N., Mosci P., Bistoni F., d'Enfert C., Vecchiarelli A. Th17 Cells and IL-17 in Protective Immunity to Vaginal Candidiasis. *PLoS ONE*, 2011, 6(7): e22770
5. Dirisala V.R., Jeevan A., Ramasamy S.K., McMurray D.N. Molecular Cloning, Expression, and In Silico Structural Analysis of Guinea Pig IL-17. *Mol Biotechnol* (2013) 55: 277–287
6. Liu G.Q., Wu H.Y., Zhang G.B., Ma H.B., Ma Z.N., Ju S.G., Zhang X.G. Prokaryotic expression, purification and biological activity of recombinant human IL-17/His protein. *Xi Bao\_Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2007; 23(8): 715-718).
7. Wu B., Nemeth J.F., Janecki D.J., Jones B., Obmolova G., Malia T.J., Baker A., Bethea D., Elloso M.M., Naso M., Taudte S. Expression, refolding and purification of a human interleukin-17A variant. *Cytokine*. 2011; 53(1): 107-114).
8. Jovanovic D.V., Di Battista J.A., Martel-Pelletier J., Jolicoeur F.C., He Y., Zhang M., Mineau F., Pelletier J.P. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol.* 1998; 160(7): 3513-3521
9. Studier F.W. Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures. *Protein Expr Purif.* 2005; 41(1): 207–234.

Штамм бактерий Escherichia coli - продуцент ИЛ-17А человека  
Перечень последовательностей

<110> Духовлинов И.В., Симбирцев А.С.

<120> Штамм бактерий Escherichia coli - продуцент ИЛ-17А человека

<130>

<160> 2

<210> SEQ ID NO:1

<211> 132

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> зрелый ИЛ-17А человека

<400> 1

Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys  
1 5 10 15  
Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn  
20 25 30  
Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr  
35 40 45  
Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser  
50 55 60  
Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp  
65 70 75 80  
Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile  
85 90 95  
Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu  
100 105 110  
Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val  
115 120 125  
His His Val Ala  
130

<210> SEQ ID NO:2

<211> 414

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> последовательность ДНК, кодирующая зрелый ИЛ-17А, для клонирования в  
плазмиде рЕТ28а

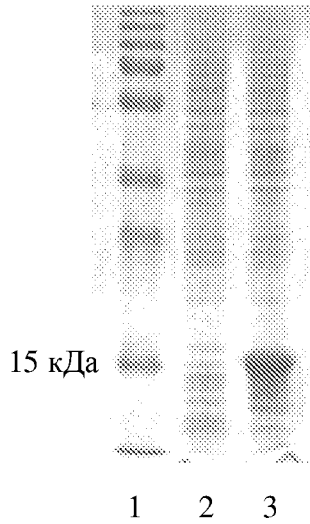
<400> 2

ccatggatgg gcattacat tccgcgtaat ccgggctgcc cgaattccga agataaaaat 60  
tttccgcgta ccgtgatggg gaatctgaat attcataatc gtaataccaa taccaatccg 120  
aaacgttccct ccgattatta taatcgttcc acctccccgt ggaatctgca tcgtaatgaa 180  
gatccggaac gttatccgct cgtgatttgg gaagcgaaat gccgtcatct gggctgcatt 240  
aatgcggatg gcaatgtgga ttatcatatg aattccgtgc cgattcagca ggaaattctg 300  
gtgctgcgct gtgaaccgcc gcattgcccc aattcctttc gtctggaaaa aattctgggtg 360  
tccgtgggct gcacctgcgt gacccccgatt gtgcatcatg tggcgtgact cgag 414  
1

**Штамм бактерий *Escherichia coli* – продуцент ИЛ-17А человека**

## Формула

Штамм бактерий *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET-28a(+)*IL-17A* – продуцент ИЛ-17А человека, на основе клеток *E. coli* BL21 (DE3), трансформированных плазмидной ДНК pET-28a(+)*IL-17A*, представленной вектором pET-28a(+), содержащим вставку гена, кодирующего ИЛ-17А, охарактеризованный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, оптимизированного по кодонному составу для экспрессии в клетках *E. coli*.

Штамм бактерий *Escherichia coli* – продуцент ИЛ-17А человека

Фиг. 1

|    |     |
|----|-----|
| 1  | 50% |
| 2  | 47% |
| 3  | 37% |
| 4  | 94% |
| 5  | 70% |
| 6  | 75% |
| 7  | 35% |
| 8  | 30% |
| 9  | 88% |
| 10 | 90% |

Табл. 1

|     |     |
|-----|-----|
| 4-1 | 20% |
| 4-2 | 25% |
| 4-3 | 17% |
| 4-4 | 21% |
| 4-5 | 18% |

Табл. 2

|     |           |
|-----|-----------|
| 200 | 4,10±5,1  |
| 100 | 3,53±0,71 |
| 20  | 2,35±0,43 |
| 10  | 1,65±0,25 |
| 2   | 0,44±0,11 |
| 0   | 0,05±0,2  |

Табл. 3

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

Номер евразийской заявки:  
201890063

Дата подачи: 14 января 2018 (14.01.2018) | Дата испрашиваемого приоритета:  
Название изобретения: Штамм бактерий Escherichia coli- продуцент ИЛ-17А человека

Заявитель: ДУХОВЛИНОВ Илья Владимирович

- Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа)  
 Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)

A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

|            |           |
|------------|-----------|
| C12N 1/21  | (2006.01) |
| C12N 15/09 | (2006.01) |
| C12N 15/24 | (2006.01) |
| C12N 15/63 | (2006.01) |
| C12N 15/70 | (2006.01) |
| C12R 1/19  | (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, 15/09, 15/24, 15/63, 15/70, 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 № |
|------------|---|----------------------|
| Y          | JAYA LAKSHMI G. et al. Molecular cloning, high level expression and activity analysis of constructed human interleukin- 25 using industrially important IPTG inducible Escherichia coli BL21 (DE3). International journal of bio-science and bio-technology, 2014, vol. 6, No. 3, pp. 19-30, с. 20, абзац 6, с. 21-24, раздел Materials and methods, с. 29, абзац 1 | 1                    |
| Y          | База данных EPOP:JB026970, 04.04.2013, sequence 20 from patent EP 2485763   | 1                    |

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


- "Г" 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: 02 августа 2018 (02.08.2018)

Наименование и адрес Международного поискового органа:

Уполномоченное лицо :

**Федеральный институт  
промышленной собственности**  
РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб.,  
д. 30-1. Факс: (499) 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

  
Т. Ф. Владимирова  
Телефон № (499) 240-25-91