

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034521**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.17

(21) Номер заявки
201890063

(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

(43) 2019.07.31

(96) 2018000008 (RU) 2018.01.14

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**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)

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

(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 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. Представленное решение обладает высокой стабильностью и высокой продуцирующей способностью в отношении рекомбинантного ИЛ-17А человека.

B1

034521

**034521
B1**

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- α , ИЛ-1, а также простагландина Е2. 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 грибов 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 γ , 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- β -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 tne131 (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, либо encor-bio.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: граммотрицательные прямые палочки размером 1,1-1,5 \times 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 до 43 $^{\circ}$ C, интервал для культивирования - 28-38 $^{\circ}$ C, оптимум роста при 37 $^{\circ}$ C. Интервал pH 5-7. Катализи-

руют D-глюкозу и некоторые другие углеводы с образованием кислоты и газа, не сбраживают галактозу. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная, не образуют H₂S, гидролизуют мочевины.

Устойчив к канамицину (30 мкг/мл).

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

Продуктивность штамма - рекомбинантный ИЛ-17А 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 ч. Возможна также ферментация с использованием ИПТГ.

Краткое описание графических материалов

На чертеже: 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.

Табл. 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 pET-28a(+)-IL-17A после выращивания в неселективных условиях в течение 18 ч.

Таблица 1

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

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

Таблица 2

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

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

Таблица 3

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

Сущность изобретения поясняется следующими примерами.

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

Аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, характеризующую ИЛ-17А 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-17А человека, фланкированную короткими участками, содержащими сайты рестрикции *Nco* I и *Xho* I (SEQ ID NO: 2).

Полученный фрагмент ДНК, а также вектор pET-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 mM Tris-HCl (pH 7,5 при 37°C), 10 mM MgCl₂, 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.). Реакционную смесь доводили до 35 мкл безнуклеазной водой и инкубировали при 22°C в течение 4 ч. Ферментативную реакцию останавливали инкубацией реакционной смеси при 65°C в течение 15 мин.

Смесь очищали от солей диализом на нитроцеллюлозных фильтрах с диаметром пор 0,025 мкм (Millipore, США). Диализ проводили против раствора, содержащего 0,5 mM ЭДТА в 10% глицерине в течение 10 мин.

Подготавливали компетентные клетки *Escherichia coli* штамма DH10B/R (Gibco BRL, США) с генотипом F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZAM 15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara,leu)769 galU galKλ- 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 16 ч 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 M CaCl₂, 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 M CaCl₂, 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 мс. После трансформации клетки помещали в 1 мл SOC-среды (2% бактотриптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄; 20 mM глюкоза) и инкубировали в течение 40 мин 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%-м 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 tne131 (DE3), содержащие в геноме ген, кодирующий полимеразу фага T7 под контролем бактериального промотора, индуцируемого лактозой, λ De3 лизоген и мутацию tne131. Мутированный ген tne131 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 ч 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 табл. 1, показали, что отдельные клоны значительно различаются по скорости потери плазмидной ДНК в неселективных условиях (табл. 1). Плазмида pET-28a(+)-IL-17A была наиболее стабильной в клоне №4, в котором за 18 ч культивирования плазмиду потеряли 6% клеток.

Для дальнейшей работы был отобран наиболее стабильный клон - №4. Далее этот клон рассеивали истощаящим 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 A600 = 0,6, после чего проводили индукцию синтеза рекомбинантного белка индуктором ИПТГ, добавляя его к культуре до конечной концентрации от 1 до 2 мМ. Через 4 ч 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-17А молекулярным весом (табл. 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)/pET-28a(+)-IL-17A - продуцент рекомбинантного ИЛ-17А человека.

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

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

В среду YYP-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 ч до отсутствия существенного изменения ОП₆₀₀ за 1 ч. 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 (ОП₆₀₀) 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-НСl 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 с с интервалом в 30 с (частота ультразвука составляет 22 кГц), отбирали пробу на анализ SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis with Sodium dodecyl sulfate).

Результат представлен на чертеже. Как видно из чертежа, 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 чертеже, 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 ч 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 с с перерывом в 2 мин на льду. Затем трехкратно отмывали тельца включения 0,2 М дезоксихолатом 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 мМ 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 мМ Tris-НСl pH 8,0. Колонку отмывали 200 мл 50 мМ Tris pH 8,0, белок элюировали 160 мл линейного градиента 50 мМ Tris pH 8,0 1М 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 5×10^4 на лунку в 12-луночный плоскодонный культуральный планшет ("Costar", США) в 2 мл среды RPMI1640 с 10% фетальной сыворотки. Планшет инкубировали 48 ч в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO₂ 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 ч в CO₂-инкубаторе и в культуральной среде каждой ячейки определяли концентрацию ИЛ-6 с помощью коммерческого набора на основе твердофазного иммуоферментного 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 табл. 3.

Из табл. 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-17A 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.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

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*.

