

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035207**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.15

(21) Номер заявки
201791989

(22) Дата подачи заявки
2017.10.08

(51) Int. Cl. *C12N 15/12* (2006.01)
C07K 14/61 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)

(54) **ШТАММ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* BL21(DE3)/pET-21a(+)- ПРОДУЦЕНТ СОМАТОТРОПИНА ПРЕИМУЩЕСТВЕННО МОНОМЕРНОЙ ФОРМЫ**

(43) **2019.04.30**

(96) **2017000100 (RU) 2017.10.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДУХОВЛИНОВ ИЛЬЯ
ВЛАДИМИРОВИЧ (RU)**

(56) RU-C1-2233879
DETABASE GenBank: 1HWH_A, 10.10.2012
RU-C1-2465315

(72) Изобретатель:
**Духовлинов Илья Владимирович,
Федорова Екатерина Алексеевна (RU)**

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

(57) Изобретение относится к молекулярной биологии, биотехнологии, медицине и может быть использовано для производства гормона роста человека. Предложена плазмидная ДНК для синтеза гормона роста человека в клетках *Escherichia coli*, представленная вектором pET-21a(+), последовательность с T7 промотора по lac-оператор модифицирована и охарактеризована SEQ ID NO: 3, содержащим вставку гена, кодирующего белок, охарактеризованный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, оптимизированного по кодонному составу для экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Также предложен штамм-продуцент гормона роста человека, на основе клеток *Escherichia coli* BL21(DE3), трансформированных описанной плазмидной ДНК. Использование предложенных изобретений позволяет достичь значительного увеличения выхода мономерной формы соматотропина до 80%.

B1

035207

035207

B1

Изобретение относится к молекулярной биологии, биотехнологии, медицине и может быть использовано для производства гормона роста человека.

Гормон роста человека (соматотропин, соматропин, соматотропный гормон) - один из гормонов передней доли гипофиза. Вызывает выраженное ускорение линейного (в длину) роста, в основном, за счет роста длинных трубчатых костей конечностей. Соматотропин оказывает мощное анаболическое и антикатаболическое действие, усиливает синтез белка и тормозит его распад, а также способствует снижению отложения подкожного жира, усилению сгорания жира и увеличению соотношения мышечной массы к жировой. Кроме того, соматотропин принимает участие в регуляции углеводного обмена - он вызывает выраженное повышение уровня глюкозы в крови и является одним из антагонистов инсулина по действию на углеводный обмен. Описано также его действие на островковые клетки поджелудочной железы, иммуностимулирующий эффект, усиление поглощения кальция костной тканью и др.

Терапевтическое применение соматотропина.

1. Для лечения нарушений роста у детей.

2. Для лечения нервных расстройств. В некоторых работах показано, что соматотропин улучшает память и познавательные функции, особенно у больных с недостаточностью соматотропной функции гипофиза, и что введение соматотропина может улучшать настроение и самочувствие больных с низким уровнем соматотропина в крови.

3. Для профилактики старческих заболеваний.

4. Применение в спортивной медицине в качестве анаболического препарата.

Для получения соматотропина известно использование многих штаммов *Escherichia coli* - продуцентов на основе клеток

W3110 (RU2287574C2, RU2433185C2, RU2337968C2,

CN103173440 (A), AU731758 (B2), US5496713 (A), WO2005067601 (A2), US5932439 (A), EP0587427 (A1), CN104561020 (A)), K-12 (294, X1776, BE1201, RV308, MKD3207) (RU2337968C2, US4859600 (A), RU2287574C2, RU2433185C2, US4874703 (A), EP0089666 (A2), RU2031121C1), JM (83, 101, 105, 109) (EA200601793A1, WO2005067601 (A2), JPH0771495 (B2), AU731758 (B2)), B (RU2433185C2, EP0089666 (A2)), MT (012, 10675-10853) (AU731758 (B2), US5496713 (A), JPH09216832 (A)), HB101 (JPS60234584 (A), EP0587427 (A1), US4518690 (A)), MC1061 (JPH0771495 (B2), US6010875 (A)), ATCC №39384, 39386 (EP0173215 (A2)), D1210 (EP0067540 (A2)), HM10011-HM10020 (KR20020080108 (A)), YK537 (CN103882015 (B)), chil776 (WO2005067601 (A2)), JA221 (WO2005067601 (A2)), C41 (DE3), C43 (DE3) (CN103882015 (B)), K802 (RU1248280), Rosetta, Rosetta (DE3) (CN103882015 (B)), BL21, BL21 (DE3) (RU2002133932A, WO2014046484 (A1), CN103882015 (B), WO2011103325 (A1), NZ555206 (A), WO2004005335 (A2), US2010041153 (A1), US2011237509 (A1), WO2009057622 (A1).

В ряде таких штаммов получаемый целевой белок - секретируемый либо накапливаемый в периплазматическом пространстве, однако больший выход белка возможно получить, если белок накапливается в тельцах включения. Штаммы с таким типом накопления соматотропина составляют часть приведенных выше. Однако от качества получаемых тельц включения зависит выход белка, пригодного для применения, мономеров соматотропина, при дальнейшей очистке. Задачей, на решение которой направлено создание настоящего изобретения, является создание штамма-продуцента соматотропина, позволяющего получить больший выход мономерной формы соматотропина по сравнению с известными штаммами.

Известен штамм-продуцент соматотропина на основе клеток *E. coli* BL21(DE3) и вектора pET22b(+), белок синтезируется без His-тага, в тельцах включения (RU 2002133932 A). Данный штамм, а также содержащаяся в нем плазмида являются прототипом.

Авторами настоящего изобретения выявлено с использованием штамма на основе клеток *E. coli* BL21(DE3) и вектора pET-21(+), белок синтезируется без His-тага, в тельцах включения, что специфичное изменение T7 промотора и lac-оператора позволяет достичь значительного увеличения выхода мономерной формы соматотропина на 34%, с 46 до 80%.

Технический результат от использования созданных плазмидной ДНК и штамма в значительном увеличении выхода мономерной формы соматотропина. Данный технический эффект достигается благодаря изменению кинетики накопления целевого белка в клетке за счет внесения специфичных мутаций в T7 промотор и lac-оператор плазмидной ДНК.

Технический результат от использования группы изобретений выражается также в расширении

спектра плазмид и штаммов-продуцентов для получения соматотропина, что немаловажно, учитывая широкое применение данного белка. Клинический опыт показал, что оптимизируя лечение низкорослости, целесообразно иметь в арсенале несколько аналогичных фармацевтических препаратов, получаемых различными технологиями или даже методами. Длительное лечение (годами) одним препаратом соматотропина вызывает в организме уменьшение чувствительности к нему (<http://xn--80aakgbchgf.nxn--plai/poluchenie-gormona-rosta-v-biotehno>).

Сущность изобретения

Предложена плазмидная ДНК pET-21a(+)*somat* для синтеза гормона роста человека в клетках *Escherichia coli*, представленная вектором pET-21a(+), последовательность с T7 промотора по lac-оператор охарактеризована SEQ ID NO: 3, содержащим вставку гена, кодирующего белок гормон роста человека, охарактеризованный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1, оптимизированного по кодонному составу для экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Последовательность с T7 промотора по lac-оператор вектора pET-21a(+), охарактеризованная SEQ ID NO: 3, является модифицированной, в T7 промотор введена мутация A6G, в lac-оператор - мутации T22G, T23G. Последовательность расположения элементов в плазмидной ДНК понятна среднему специалисту в данной области.

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 encorbio.com/protocols/Codon.htm, на основе аминокислотной последовательности белка.

Также предложен штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET-21a(+) - продуцент гормона роста человека, на основе клеток *Escherichia coli* BL21(DE3), трансформированных описанной плазмидной ДНК.

Изобретение проиллюстрировано следующими графическими материалами.

Фиг. 1 - графики, демонстрирующие кинетику накопления соматотропина при индукции экспрессии кодирующего его гена в клетках штамма-продуцента с вариантами строения T7 промотора и lac-оператора: ось абсцисс - время, ч, ось ординат - процент целевого белка от общего; график, построенный по "точкам" - кинетика накопления соматотропина при строении T7 промотора и lac-оператора, как охарактеризовано SEQ ID NO: 4, построенный по "треугольникам" - как охарактеризовано SEQ ID NO: 2, построенный по "квадратам" - как охарактеризовано SEQ ID NO: 3.

Фиг. 2 - электрофореграмма плазмидной ДНК pET-21a(+)*somat*, 0,8% агарозный гель: 1 - маркер молекулярного веса DNA ladder GeneRuler 1 kb; 2 - отрицательный контроль - данная плазмидная ДНК без обработки рестриктазами; 3-6 - данная плазмидная ДНК, обработанная рестриктазой: 3 - HindIII; 4 - BglII; 5 - NdeI; 6 - XhoI;

Фиг. 3 - электрофореграмма плазмидной ДНК pET-21a(+)*somat*, 0,8% агарозный гель: 1 - маркер молекулярного веса DNA ladder GenRuler 1 kb; 2 - отрицательный контроль - данная плазмидная ДНК без обработки рестриктазами; 3-8 - данная плазмидная ДНК, обработанная рестриктазами: 3 - HindIII+BglII; 4 - HindIII+NdeI; 5 - HindIII+XhoI; 6 - BglII+NdeI; 7 - BglII+XhoI; 8 - NdeI+XhoI.

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

Пример 1. Создание плазмидной ДНК pET-21a(+)*somat* - вариантов с различиями в T7 промоторе и lac-операторе.

1.1. Создание нуклеотидной последовательности, кодирующей гормон роста человека, и вариантов фрагмента плазмидной ДНК pET-21a(+) с T7 промотора по lac-оператор.

Аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, характеризующую гормон роста 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, в одном из вариантов двух стоп-кодонов, а также сайтов рестрикции, фланкирующих получаемый ген. Рассчитанную нуклеотидную последовательность синтезировали химическим методом с помощью синтезатора ДНК ASM-800 (БИОССЕТ, Россия).

Был синтезирован также фрагмент плазмидной ДНК pET-21a(+), ограниченный сайтами рестрикции BglII и XbaI, содержащий T7 промотор и lac-оператор, а именно три его варианта, содержащие, соответственно, нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 4, характеризующие варианты фрагмента плазмидной ДНК pET-21a(+) с T7 промотора по lac-оператор, (1) без мутаций, (2) с мутацией A6G в T7 промоторе и с мутациями T22G, T23G в lac-операторе, (3) с мутацией C7G в T7 промоторе и с мутацией T16C в lac-операторе.

1.2. Создание вариантов плазмидной ДНК pET-21a(+)*somat*.

Полученные фрагменты ДНК, а также вектор pET-21a(+) (Novagen, США) обрабатывали соответствующими рестриктазами по инструкции к данным ферментам. Далее полученные фрагменты очищались с использованием препаративного электрофореза и использовались в реакции лигирования.

Осуществлялась реакция лигирования очищенных рестрицированных фрагментов ДНК в очищенный рестрицированный вектор последовательно. 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 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 0,1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (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 ч. Ферментативная реакция останавливалась 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.

1.3. Создание штамма (вариантов) на основе клеток *Escherichia coli* DH10B/R для амплификации полученной плазмидной ДНК (вариантов).

Подготавливали компетентные клетки *Escherichia coli* штамма DH10B/R (Gibco BRL, США) с генотипом F-mcrA A(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM 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 5000 g в течение 10 мин. Супернатант сливали, клетки ресуспендировали в 50 мл 0,1M 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 0,1M CaCl₂, охлажденного на льду.

Трансформацию полученных компетентных клеток осуществляли методом электропорации. Использовали электропоратор Eporator (Erpendorf, Германия) и стерильные кюветы для электропорации (Erpendorf, 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 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 разработанных плазмидных ДНК (вариантов). Данные штаммы использовали для получения вариантов плазмидной ДНК pET-21a(+)*somat*.

1.4. Получение вариантов плазмидной ДНК pET-21a(+)*somat*.

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 4000 g 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. Создание штамма-продуцента соматотропина преимущественно мономерной формы.

2.1. Создание штамма-продуцента гормона роста человека на основе клеток *Escherichia coli* BL21(DE3) (вариантов).

Выделенными согласно описанной в примере 1 методике вариантами плазмидной ДНК pET-21a(+)*somat* с различиями в строении T7 промотора и lac-оператора трансформировали клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) (Invitrogen, USA), с генотипом F-ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3), содержащие в геноме λDe3 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 (вариантами), 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. В итоге выбрали клон клеток *E.coli*, который далее использовали для получения гормона роста человека (штамм-производитель), варианты.

2.2. Выявление штамма-производителя соматотропина преимущественно мономерной формы из созданных вариантов.

2.2.1. Индукция синтеза соматотропина в штамме-производителе (вариантах).

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

2.2.1.1. При индукции синтеза соматотропина 0,2% лактозой по методу Штудьера.

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

Индукцию экспрессии проводили при достижении культурой клеток оптической плотности 0,6-0,8 оптических единиц при длине волны 600 нм.

Для автоиндукции экспрессии по методу Штудьера использовали среду RYP-5052, состоящую из 1% пептона (Gibco, США), 0,5% дрожжевого экстракта (Gibco, США), 50 мМ Na₂HPO₄, 50 мМ K₂HPO₄, 25 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgSO₄, 0,5% глицерола, 0,05% глюкозы и 0,2% лактозы, в качестве индуктора использовали 0,2% лактозу (Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr Purif. 2005 May; 41(1):207-34).

В среду RYP-5052, содержащую ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, инокулировали единичную колонию штамма-производителя (варианта). Ферментацию проводили при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об/мин в течение 14 ч до отсутствия существенного изменения ОП₆₀₀ за 1 ч. Отбирали аликвоту на анализ экспрессии гена, кодирующего соматотропин, методом электрофореза в ПААГ, каждый час, по окончании индукции биомассу осаждали центрифугированием при 9000 g.

2.2.1.2. При индукции синтеза соматотропина ИПТГ.

Индукцию экспрессии гена с использованием ИПТГ осуществляли следующим образом.

Инкубировали клетки единичной колонии штамма-производителя (вариантов) при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об/мин в течение 16 ч 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 от 1 до 2 мМ. Индукцию проводили в течение 14 ч, отбирали пробу для анализа с использованием SDS-PAGE каждый час, по окончании индукции биомассу осаждали центрифугированием.

2.2.2. 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 с с интервалом в 30 с (частота ультразвука составляет 22 кГц), отбирали пробу на анализ SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis with Sodium dodecyl sulfate). Процент содержания целевого белка от общего белка при использовании анализируемых трех штаммов-производителей соматотропина приведен на графиках фиг. 1.

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 соматотропина.

2.2.1.3. Описание кинетики накопления соматотропина.

Кинетика накопления соматотропина в клетках штамма-производителя (вариантов) была выявлена с использованием денситометрического сканирования электрофореграмм спектра белков, полученного из лизатов клеток *E.coli* штамма-производителя (вариантов) после индукции экспрессии, с помощью программы ImageJ и оказалась сходной при индукции экспрессии 0,2% лактозой и ИПТГ (от 1 до 2 мМ) и приведена на фиг. 1.

2.2.2. Рефолдинг.

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 0,2М дезоксихолятом натрия, что позволяло получить препарат без примесей бактериальных эндотоксинов.

Растворяли тельца включения в 8М растворе мочевины, затем осуществляли рефолдинг белка в буфере для рефолдинга (0,1М Tris pH 8,0, 0,2 мМ ЭДТА) с 0,5М L-аргинином.

Проводили хроматографическую очистку полученного раствора белка. Около 1200 мл обессоленного супернатанта помещали на 20 мл S-Sepharose колонку, уравновешенную 20 мМ Tris-HCl 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. Фракция очищенного на S-Sepharose гормона роста человека была помещена 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, кон-

центрацию белка в них определяли по методу Бредфорд. Колонку откалибровывали с использованием 10 мг бычьего сывороточного альбумина, овальбумина и соевого трипсинового ингибитора.

Формы соматотропина анализировали с использованием электрофореза в ПААГ при нанесении препаратов рефолдированного соматотропина, полученных с использованием трех штаммов и двух типов индукторов.

Удалось получить наибольший процент мономерной формы соматотропина, 80%, при использовании штамма-продуцента со строением T7 промотора и lac-оператора, как охарактеризовано SEQ ID NO: 3. 46% мономерной формы соматотропина получили с использованием штамма-продуцента со строением T7 промотора и lac-оператора, как охарактеризовано SEQ ID NO: 2, т.е. оригинального для вектора pET-21a(+). При внесении же мутаций в данные элементы, как охарактеризовано SEQ ID NO: 4, получили значительное уменьшение выхода мономерной формы соматотропина при рефолдинге до 21%. Полученные данные подтверждают нетривиальность предложенного решения.

Таким образом, оптимальным для получения высокого процента мономерной формы соматотропина является использование штамма *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET-21a(+) со строением T7 промотора и lac-оператора плазмидной ДНК pET-21a(+), как охарактеризовано SEQ ID NO: 3.

Пример 3. Характеристика штамма-продуцента соматотропина преимущественно мономерной формы.

3.1. Рестрикционный анализ.

Из полученного штамма-продуцента мономерной формы соматотропина выделяли плазмидную ДНК, как описано выше.

При обработке выделенной плазмидной ДНК эндонуклеазами рестрикции наблюдали картину, приведенную на фиг. 2 и 3, которая характеризует созданный штамм-продуцент соматотропина преимущественно мономерной формы. Соответствие полученных результатов ожидаемым было подтверждено.

3.2. Культуральные характеристики.

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

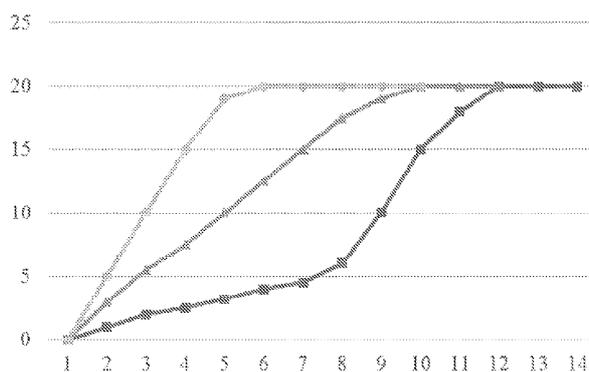
Ростовые характеристики: клетки растут в интервале температур от 8 до 43°C, интервал для культивирования 28-38°C, оптимум роста при 37°C.

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

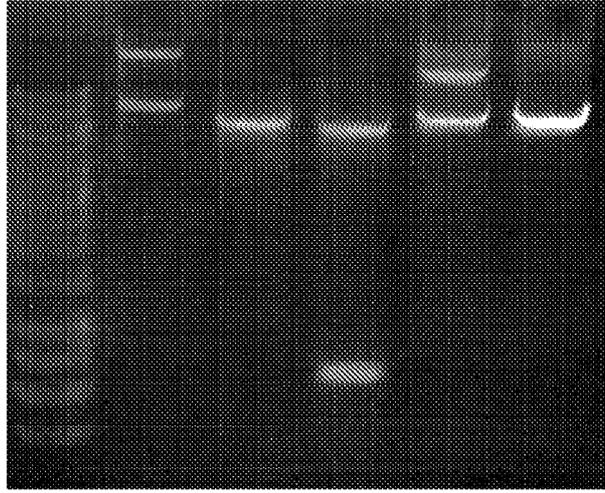
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Плазмидная ДНК pET-21a(+)*somat* для синтеза гормона роста человека в клетках *Escherichia coli* на основе вектора pET-21a(+), который содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 3, включающую участок с T7 промотора, имеющего мутацию A6G, по lac-оператор, имеющий мутации T22G и T23G включительно, и также содержит ген, кодирующий белок гормона роста человека, охарактеризованный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 и оптимизированный по кодонному составу для экспрессии в клетках *Escherichia coli*, причем на границе T7 промотора и lac-оператора расположен элемент GG.

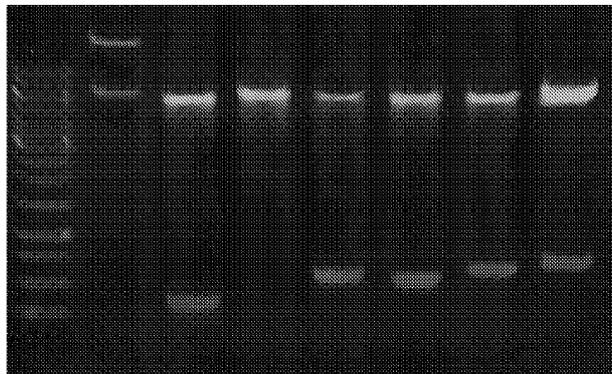
2. Штамм бактерий *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET-21a(+), содержащий плазмидную ДНК по п.1, продуцент гормона роста человека.



Фиг. 1



1 2 3 4 5 6
Фиг. 2



1 2 3 4 5 6 7 8
Фиг. 3