

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045469**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.28

(21) Номер заявки
202190311

(22) Дата подачи заявки
2019.09.05

(51) Int. Cl. **C07K 14/42** (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

(54) УЛУЧШЕННЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ЛЕКТИНА

(31) 201821008382; 201921001559

(32) 2018.09.07; 2019.01.14

(33) IN

(43) 2021.10.27

(86) PCT/IB2019/057471

(87) WO 2020/074977 2020.04.16

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЮНИКЕМ ЛАБОРАТОРИС
ЛИМИТЕД (IN)**

(72) Изобретатель:
**Сате Дхананджай, Кумар Судип,
Катдаре Мамата (IN)**

(74) Представитель:
Сагитов В.Р. (RU)

(56) WO-A2-2010095143
WO-A2-2014203261
CN-A-1483816

KELANY S. NASCIMENTO ET AL.:
"An overview of lectins purification strategies:
AN OVERVIEW OF LECTINS PURIFICATION
STRATEGIES", JOURNAL OF MOLECULAR
RECOGNITION., vol. 25, no. 11, 24 October 2012
(2012-10-24), pages 527-541, XP055643383, GB,
ISSN: 0952-3499, DOI: 10.1002/jmr.2200, the whole
document, page 529, left-hand column, last paragraph
CHALMERS J.J. ET AL.: "EFFECTS
OF TEMPERATURE ON ESCHERICHIA-
COLI OVERPRODUCING BETA LACTAMASE
OR HUMAN EPIDERMAL GROWTH
FACTOR", APPLIED AND ENVIRONMENTAL
MICROBIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY, US, vol. 56, no. 1, 1 January 1990
(1990-01-01), pages 104-111, XP008023509, ISSN:
0099-2240, abstract; table 2

EP-A1-3153581

DANIA MARTÍNEZ-ALARCÓN ET AL.:
"Expression of Lectins in Heterologous Systems",
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR
SCIENCES, vol. 19, no. 2, 21 February 2018
(2018-02-21), page 616, XP055643504, DOI:
10.3390/ijms19020616, the whole document, page 6

MIREILLE GINÉSY ET AL.: "Tuning of the
Carbon-to-Nitrogen Ratio for the Production of L-
Arginine by Escherichia coli", FERMENTATION, vol.
3, no. 4, 10 November 2017 (2017-11-10), page 60,
XP055643587, DOI: 10.3390/fermentation3040060,
the whole document

(57) Изобретение относится к способу получения рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, при этом указанный способ включает периодическую ферментацию с подпиткой клона в клетке-хозяине при определенной скорости подпитки с отношением углерода к азоту от 3:1 до 6:1. Изобретение также относится к способу очищения рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1.

B1

045469

045469 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент Индии №201821008382, поданной 7 сентября 2018 г., и предварительной заявки на патент Индии №201921001559, поданной 14 января 2019 г., содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к рекомбинантному белку лектина и способу получения рекомбинантного белка лектина. Настоящее изобретение также относится к способу очищения неочищенного рекомбинантного белка лектина.

Уровень техники

Лектины представляют собой связывающие углеводы белки, макромолекулы, высокоспецифические в отношении сахарных фрагментов других молекул. Лектины осуществляют распознавание на клеточном и молекулярном уровне и играют многочисленные роли в явлениях биологического распознавания с участием клеток, углеводов и белков. Лектины представляют собой двухвалентные или поливалентные связывающие углеводы белки, которые связывают и преципитируют гликопротеины и агглютинируют эритроциты. Лектины, обнаруженные у животных, чаще всего играют содействующую роль при клеточных взаимодействиях, тогда как лектины растений, по имеющимся данным, сдерживают потенциальных хищников или патогены. Некоторые лектины способны детектировать гликаны, ассоциированные с раком, и, следовательно, потенциально могут служить биомаркерами злокачественных опухолей и помогать в изучении изменений мотива гликозилирования в линиях раковых клеток.

Очищенные лектины имеют важное значение в клинических ситуациях, поскольку используются для определения группы крови. Некоторые гликолипиды и гликопротеины в эритроцитах человека могут быть идентифицированы с помощью лектинов. Многие лектины применяются в качестве биомаркеров для ранней детекции злокачественного роста, или в качестве индукторов аутофагии, тогда как другие лектины демонстрируют также способность подавлять рост рака за счет апоптоза. Из-за нерегулируемой клеточной пролиферации некоторые фрагменты углеводов экспрессируются в качестве антигена на раковых клетках. Лектины применяют в качестве агентов для доставки лекарств при терапии рака, поскольку они специфически связываются со злокачественными опухолями. Кроме того, поскольку лектины также модулируют ассоциированные с раком пути, они потенциально могут применяться в качестве диагностических и терапевтических агентов.

Существует несколько антигенов, с которыми связываются лектины и которые были охарактеризованы как антигены поверхности раковых клеток; большинство антигенов специфичны для определенного типа рака, и связывание лектина с этими антигенами может приводить к ингибированию роста рака за счет индукции апоптоза указанных раковых клеток. В настоящее время большинство коммерчески доступных лектинов происходят из растений и других эукариот.

Лектин *Sclerotium rolfsii* (SRL) представляет собой лектин, который был выделен из склероциальных тел почвенного фитопатогенного гриба *S. rolfsii*. SRL обладает специфичностью в отношении антигена Томсена-Фриденрейха (TF) и антигена Tn. Антиген TF представляет собой дисахарид (Galβ1 → 3GalNAc-α-Ser/Thr), который сверхэкспрессируется на поверхности различных раковых клеток человека. Антиген Tn представляет собой моносахарид (GalNAc-α-). Благодаря специфичности в отношении антигенов TF и Tn, SRL, как было показано, связывается с клетками рака толстой кишки, рака яичников и лейкоза человека. Была определена кристаллическая структура SRL (Leonidas et al., J Mol Biol. 2007 May 11;368(4): 1145-61).

Хотя лектины в качестве противораковых средств обладают множеством преимуществ, их применение все же сопряжено со множеством ограничений, таких как недостаточная селективность, нестабильные качество и эффективность, а также сложность масштабирования производства. Кроме того, часто сообщалось, что лектины растительного происхождения связываются с множеством различных гликановых структур и, таким образом, не обладают селективностью, необходимой для многих вариантов применения. При использовании растительных лектинов также часто наблюдается варибельность между партиями. Качество продуктов зависит от методики выделения растительного материала и от качества самого исходного растительного материала.

Выделение лектина из природных источников не является надежным способом, поскольку полученный таким образом лектин не обладает достаточной стабильностью в отношении требуемых свойств. Помимо этого, выделение белков из природных источников представляет собой дорогостоящий и сложный процесс. Способы, используемые для выделения встречающихся в природе лектинов, обычно обеспечивают очень небольшой выход, в частности, при наличии белка только в низких концентрациях. Кроме того, иногда такие способы не позволяют различать изоформы одного и того же лектина. Следовательно, лектины получают в виде смесей, чем обусловлен большой диапазон неопределенности. В этом смысле получение рекомбинантных лектинов способами рекомбинантной ДНК обладает преимуществом, заключающимся в получении за значительно меньшее время одиночных белков с более высоким и более стабильным выходом, а также точными характеристиками, при простоте масштабирования. Ис-

пользуя технологию рДНК, можно переносить ген, продуцирующий представляющий интерес белок, в подходящего хозяина. Таким образом, белок может быть получен и выделен с меньшими затратами времени и усилий по сравнению с традиционными способами.

В WO 2010/095143 раскрыты варианты рекомбинантного лектина Rec-2 и Rec-3, которые получают из природной последовательности SRL путем замены 3 или 5 аминокислот, соответственно. Описана кристаллическая структура указанных вариантов (Perra et al., *Molecules*. 2015 Jun 12;20(6): 10848-65).

В WO 2014/203261 раскрыт вариант рекомбинантного лектина, который получают из природной последовательности SRL путем замены 12 аминокислот.

В индийской заявке 350/MUM/2009 (заявка PCT WO 2010/095143) впервые раскрыта последовательность аминокислот SEQ ID NO:1 (обозначенная как SEQ ID 2 в 350/MUM/2009), полученная из природной последовательности аминокислот SEQ ID NO:2 (обозначенная как SEQ ID 1 в 350/MUM/2009), происходящая из гриба *Sclerotium rolfsii*. В WO 2010/095143 описано получение рекомбинантных лектинов в клетках *E. coli* в лабораторном масштабе, при этом ген, кодирующий рекомбинантный лектин, клонируют в экспрессионный вектор. Однако указанный способ отличается определенными недостатками, в том числе сложностью контроля параметров культивирования, таких как количество растворенного кислорода и уровень pH, а также отсутствие контроля экспрессии белка. Также указанная культура дает небольшую клеточную массу и, соответственно, в итоге общий низкий выход очищенного белка. Кроме того, указанный способ не может быть масштабирован для промышленности.

Лектин с последовательностью аминокислот SEQ ID NO:1 показывает высокую стабильность и растворимость по сравнению с природным лектином, происходящим из гриба *Sclerotium rolfsii*, и демонстрирует способность связываться с раковыми клетками. Лектины находят широкое применение в исследованиях, медицине и биохимических методиках. Например, лектин, имеющий последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, имеет высокий фармацевтический потенциал. Следовательно, существует потребность в разработке способа получения рекомбинантных лектинов, который будет более продуктивным, более экономически целесообразным, легче масштабируемым и/или характеризующимся повышенной эффективностью.

Настоящее изобретение было разработано с учетом указанных проблем.

Цель изобретения

Основная цель настоящего изобретения заключается в преодолении недостатков, свойственных решениям из уровня техники, и разработке высокоэффективного способа получения последовательности аминокислот SEQ ID NO:1.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение способа, который является высокопродуктивным и экономически целесообразным, и может быть осуществлен с использованием легкодоступного сырья.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение легко масштабируемого способа получения последовательности аминокислот SEQ ID NO:1.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение способа получения высокочистой формы последовательности аминокислот SEQ ID NO:1.

Краткое описание изобретения

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ получения рекомбинантного белка лектина, указанный способ включает экспрессию рекомбинантного белка лектина, кодируемого рекомбинантным геном лектина, в клетке-хозяине в культуре, при этом экспрессию осуществляют в таких условиях для клетки, чтобы время удвоения указанной клетки составляло не более 160 мин. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессию осуществляют в таких условиях для клетки, чтобы время удвоения указанной клетки составляло по меньшей мере 100 мин.

Согласно одному варианту реализации указанный способ включает экспрессию рекомбинантного белка лектина, кодируемого рекомбинантным геном лектина, в клетке-хозяине в культуре при температуре не более 22°C. Согласно другому варианту реализации экспрессию проводят при температуре по меньшей мере 15°C и не более чем 22°C.

Согласно некоторым вариантам реализации указанной клеткой-хозяином для экспрессии рекомбинантного лектина является *E. coli*.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рекомбинантный белок лектин выбран из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% гомологичной любой из указанных последовательностей.

Согласно некоторым вариантам реализации культура клеток-хозяев имеет объем по меньшей мере 10 л.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, включающее: фазу роста, во время которой клетку-хозяина культивируют перед экспрессией белка; и фазу экспрессии, во время которой осуществляют экспрессию белка. Согласно дополнительным вариантам реализации фазу роста проводят при температуре выше температуры, при которой проводят фазу экспрессии. Согласно дополнительным вариантам реализации температуру снижают при переходе от фазы роста к фазе экспрессии в течение периода, составляющего по меньшей мере 4 ч и не более чем 7 ч.

Согласно некоторым вариантам реализации фазу экспрессии индуцируют добавлением индуктора в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,1 мМ и не более 0,7 мМ. Согласно другим вариантам реализации индуктор добавляют в культуру в концентрации не более 0,5 мМ. Согласно дополнительным вариантам реализации фазу экспрессии индуцируют добавлением индуктора, когда оптическая плотность культуры составляет по меньшей мере 25 и не более 40.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает фазу экспрессии, которую индуцируют добавлением индуктора при достижении культурой оптической плотности, равной по меньшей мере 25 и не более 40, при этом концентрация добавленного индуктора составляет по меньшей мере 0,1 мМ и не более 0,7 мМ.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ культивирования клетки-хозяина, отличающийся тем, что фазу экспрессии индуцируют добавлением индуктора в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,1 мМ и не более 0,7 мМ, и при этом экспрессию осуществляют в таких условиях для клетки, чтобы время удвоения указанной клетки не превышало 160 мин. Согласно некоторым вариантам реализации индуктор добавляют в культуру в концентрации не более 0,5 мМ.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложен способ культивирования клетки-хозяина, отличающийся тем, что фазу экспрессии индуцируют добавлением индуктора при достижении культурой оптической плотности, равной по меньшей мере 25 и не более 40, и при этом экспрессию осуществляют в таких условиях для клетки, чтобы время удвоения указанной клетки не превышало 160 мин.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рекомбинантный белок лектин выбран из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% гомологичной любой из указанных последовательностей.

Согласно некоторым вариантам реализации оптическая плотность является показателем популяции клетки-хозяина в культуре и ее измеряют при 600 нм.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный индуктор представляет собой IPTG.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения рекомбинантного белка лектина, указанный способ включает экспрессию рекомбинантного белка лектина, кодируемого рекомбинантным геном лектина, в клетке-хозяине в культуре, при этом экспрессию осуществляют в таких условиях для клетки, что время удвоения указанной клетки составляет не более 160 мин, и при этом культура клеток-хозяев имеет объем по меньшей мере 10 л.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ получения рекомбинантного лектина, при этом указанный способ включает:

a) необязательно, клонирование рекомбинантного гена лектина в экспрессионный вектор и инсерцию экспрессионного вектора в клетку-хозяина;

b) культивирование клетки-хозяина в подходящей среде, при этом указанное культивирование включает фазу роста, которую проводят при температуре от 25°C до 40°C, и фазу экспрессии, во время которой происходит экспрессия рекомбинантного белка лектина, кодируемого рекомбинантным геном лектина, причем фазу экспрессии проводят при температуре от 15°C до 30°C, и при этом отношение углерода к азоту в фазе экспрессии поддерживают на уровне от 3:1 до 6:1;

c) необязательно, выделение рекомбинантного белка лектина, экспрессированного на этапе (b), с получением неочищенного рекомбинантного белка лектина; и

d) необязательно, очищение неочищенного рекомбинантного белка лектина с получением изолята рекомбинантного белка лектина.

Согласно одному варианту реализации экспрессионный вектор на этапе a) соответствует изображению на фиг. 1. Согласно другому варианту реализации на этапе "b" источник углерода добавляют в культуру со скоростью по меньшей мере 0,5 г л⁻¹ч⁻¹ и со скоростью не более 2 г л⁻¹ч⁻¹ во время фазы индукции, при этом источником углерода является глюкоза или глицерин. Согласно альтернативному варианту реализации на этапе "b" источник азота добавляют в культуру со скоростью по меньшей мере 0,4 г л⁻¹ч⁻¹ и не более 1,5 г л⁻¹ч⁻¹ в течение фазы индукции, при этом источником азота является триптон, пептон или дрожжевой экстракт.

Согласно другому варианту реализации выделение неочищенного рекомбинантного белка лектина на этапе "c" проводят путем центрифугирования с последующим разрушением поверхности клеток. Согласно дополнительному варианту реализации очищение неочищенного рекомбинантного белка лектина на этапе "d" включает, по меньшей мере, один хроматографический этап. Согласно дополнительному варианту реализации указанный по меньшей мере один хроматографический этап включает анионообменную хроматографию и/или катионообменную хроматографию. Согласно альтернативному варианту реализации указанный по меньшей мере один хроматографический этап включает хроматографию гидрофобного взаимодействия. Согласно дополнительному варианту реализации очищение неочищенного рекомбинантного белка лектина на этапе "d" включает этап фильтрации.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рекомбинантный белок лектин выбран из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% гомологичной любой из указанных последовательностей.

Согласно некоторым вариантам реализации культура клеток-хозяев имеет объем по меньшей мере 10 л.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен способ очищения неочищенного рекомбинантного белка лектина, который включает:

- a) начальное очищение неочищенного рекомбинантного белка лектина путем анионообменной хроматографии с получением первого очищенного элюата;
- b) необязательное очищение первого очищенного элюата хроматографией с гидрофобным взаимодействием с получением второго очищенного элюата;
- c) необязательное очищение второго очищенного элюата путем катионообменной хроматографии с получением третьего очищенного элюата;
- d) дополнительное очищение второго или третьего очищенного элюата путем анионообменной хроматографии с получением четвертого очищенного элюата; и
- e) замену буфера четвертого очищенного элюата путем диафильтрации с получением очищенного изолята рекомбинантного белка лектина.

Согласно некоторым вариантам реализации неочищенный рекомбинантный белок лектин получают описанными выше способами. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рекомбинантный белок лектин выбран из SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 или последовательности аминокислот, по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% гомологичной любой из указанных последовательностей.

Согласно некоторым вариантам реализации культура клеток-хозяев имеет объем по меньшей мере 10 л.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложен рекомбинантный белок лектин, получаемый описанными выше способами.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ получения рекомбинантного белка лектина, содержащего менее 20% рекомбинантного лектина с инициаторным метионином, включающий по меньшей мере одно из следующих условий:

- a) температура экспрессии по меньшей мере 15°C и не более 22°C;
- b) фазу экспрессии (т.е. индукции) проводят в течение по меньшей мере 10 ч;
- c) источник углерода добавляют в культуру со скоростью от 0,5 до 2 гл⁻¹ч⁻¹;
- d) источник азота добавляют в культуру со скоростью от 0,4 до 1,5 гл⁻¹ч⁻¹;
- e) концентрация индуктора составляет по меньшей мере 0,1 мМ и не более 0,5 мМ;
- f) очищение неочищенного рекомбинантного белка лектина с использованием по меньшей мере одного этапа хроматографии.

Согласно последнему аспекту настоящего изобретения предложен рекомбинантный белок лектин, содержащий менее 20% рекомбинантного лектина с инициаторным метионином. Иными словами, предложена смесь с рекомбинантным белком лектином, в которой менее 20% полимеров рекомбинантного белка лектина содержат инициаторный метионин. Согласно конкретным вариантам реализации указанные полимеры белка лектина в других отношениях соответствуют другим аспектам настоящего изобретения. Настоящее изобретение также относится к рекомбинантному белку лектину, полученному с

применением способов согласно настоящему изобретению. В частности, согласно настоящему изобретению предложен рекомбинантный белок лектин, содержащий менее 20% рекомбинантного лектина с инициаторным метионином.

Краткое описание чертежей и таблиц

Фиг. 1 - аннотированная схема вектора pET27b с нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:5, кодирующей последовательность аминокислот SEQ ID NO:1.

Фиг. 2 - анализ способом ДСН-ПААГ очищенного рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1.

Фиг. 3 - вестерн-блоттинг очищенного рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1.

Табл. 1 - анализ доли лектина с метионином, полученного при различных условиях ферментации.

Табл. 2 - время удвоения *E. coli* при различных условиях ферментации.

Подробное описание изобретения

Используемый в настоящей заявке термин "время удвоения" относится к периоду времени, необходимому для удвоения числа клеток, например, для размножения одной клетки с образованием двух клеток, или для удвоения численности популяции клеток. Специалисту в данной области техники будет понятно, что время удвоения может быть рассчитано путем деления натурального логарифма двух на показатель роста.

"Рекомбинантный" продукт в контексте настоящего изобретения относится к продукту, получаемому с помощью генной инженерии. Подразумевается, что генная инженерия представляет собой не происходящие в природе манипуляции с генами. Таким образом, рекомбинантный продукт представляет собой продукт, который существует или синтезирован в среде, не встречающейся в природе, такой как клетка-хозяин, в которой продукт не присутствует в природе. Термин "белок" в настоящей заявке относится к полимеру, состоящему из остатков аминокислот.

В контексте настоящего изобретения термин "фаза роста" относится к периоду культивирования, в течение которого клетки-хозяева культивируют до требуемой плотности популяции.

Термин "фаза экспрессии" в настоящей заявке относится к периоду культивирования, в течение которого клетка-хозяин экспрессирует рекомбинантный лектин. Следует понимать, что фазу экспрессии можно отличить от фазы роста на основании повышенной экспрессии в фазе экспрессии по сравнению с фазой роста.

Термин "лектин" в настоящей заявке относится к связывающему углеводы белку.

Термин "аминокислота" в настоящей заявке относится к встречающимся в природе и синтетическим аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые имеют функцию, аналогичную функции встречающихся в природе аминокислот. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, и включают протеиногенные аминокислоты. Встречающиеся в природе аминокислоты также включают аминокислоты, модифицированные после трансляции в клетках. Синтетические аминокислоты включают неканонические аминокислоты, такие как селеноцистеин и пирролизин. Как правило, синтетические аминокислоты не являются протеиногенными аминокислотами.

Термины "гомология" или "гомологичный" в настоящей заявке относятся к двум или более упоминаемым объектам, которые по меньшей мере частично идентичны в пределах заданной области или части. Участки, области или домены гомологии или идентичности относятся к части двух или более упоминаемых объектов, которые гомологичны или идентичны, либо одинаковы. Таким образом, если две последовательности идентичны в пределах одной или нескольких областей последовательностей, они идентичны в указанных областях. Гомология по существу относится к молекуле, которая структурно или функционально консервативна, так что она обладает или предположительно обладает, по меньшей мере частично, структурой или функцией из одной или нескольких структур или функций (например, биологической функции или активности) референсной молекулы, или релевантной/соответствующей области или части референсной молекулы, которой она гомологична.

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложен способ получения рекомбинантного белка лектина, включающий экспрессию рекомбинантного белка лектина, кодируемого рекомбинантным геном лектина, в клетке-хозяине в культуре, причем экспрессию осуществляют в таких условиях для клетки, что время удвоения указанной клетки составляет не более 160 мин.

Согласно некоторым вариантам реализации ген рекомбинантного лектина не является встречающимся в природе геном. Рекомбинантный белок лектин не обязательно имеет последовательность аминокислот природного белка лектина. Например, рекомбинантный белок лектин может не содержать последовательности аминокислот SEQ ID NO:2 или не состоять из нее.

Согласно некоторым вариантам реализации экспрессию осуществляют в таких условиях для клетки, что время удвоения указанной клетки составляет по меньшей мере 100 мин.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что экспрессия рекомбинантного белка лектина в условиях культивирования, которые ограничивают время удвоения клетки-хозяина, обеспечивает получение более высокого уровня растворимого белка. Кроме того, было обнаружено, что такие условия экспрессии приводят к улучшенному отщеплению инициаторного метионина от рекомбинантного лектина, что приводит к увеличению выхода белка, в котором отсутствует инициаторный метионин. Обеспечение способа, который приводит к получению повышенного количества растворимого белка, от которого уже отщеплен метионин, снижает потребность в последующей обработке белка, которая была бы необходима в случае экспрессии значительной части белка в виде нерастворимых телец включения. Это снижает сложность способа, повышает эффективность и делает способ более экономически обоснованным.

В настоящей заявке термин "растворимый" относится к модифицированному белку лектину, экспрессируемому в растворимой или по меньшей мере частично растворимой форме. Согласно одному варианту реализации растворимость модифицированного белка лектина определяют путем клеточного лизиса клетки-хозяина, которая экспрессирует указанный модифицированный белок лектин, с последующим ДСН-ПААГ-анализом супернатанта и осадка лизата. Присутствие модифицированного белка лектина в супернатанте лизата указывает на его растворимость. Присутствие модифицированного белка лектина в супернатанте и осадке лизата указывает на то, что он частично растворим. Согласно одному варианту реализации термин "растворимый" в настоящей заявке относится к модифицированному белку лектину, не образующему телец включения. При использовании описанного выше способа присутствие модифицированного белка лектина в осадке указывает на то, что он экспрессируется в виде телец включения.

Термин "отщепление инициаторного метионина" в настоящей заявке относится к удалению N-концевого (инициаторного) метионина из последовательности аминокислот. Согласно одному варианту реализации отщепление инициаторного метионина катализирует фермент метионинаминопептидаза (МАР). Согласно одному варианту реализации отщепление инициаторного метионина определяют с применением масс-спектрометрического анализа, известного специалисту в данной области техники.

В настоящей заявке термин "улучшенное отщепление инициаторного метионина" относится к увеличению степени отщепления инициаторного метионина по сравнению с контролем. Согласно одному

варианту реализации указанный термин относится к увеличению степени отщепления инициаторного метионина по меньшей мере на 5%, 10%, 25% или 50% по сравнению с контролем. Согласно одному варианту реализации контроль представляет собой белок лектин, соответствующий SEQ ID NO:2. Согласно некоторым вариантам реализации предложен рекомбинантный белок лектин (т.е. смесь полимеров белка лектина), содержащий менее 50%, 40%, 30%, 20% или 10% рекомбинантного лектина с инициаторным метионином (т.е. мет-лектином). Или, иными словами, способ согласно настоящему изобретению позволяет получать по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80% или 90% рекомбинантного белка лектина, не содержащего метионина (т.е. белка, лишённого остатка инициаторного метионина).

Следует понимать, что на время удвоения клетки-хозяина влияет ряд факторов, таких как температура культивирования, питательная среда, скорость подпитки питательными веществами и тип клетки-хозяина. Специалист в данной области техники может изменить один или более из указанных параметров для достижения требуемой скорости удвоения.

Одним из параметров, который можно использовать для контроля времени удвоения клетки-хозяина, является температура, при которой проводят экспрессию. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессию рекомбинантного лектина проводят при температуре не более 30°C, не более 25°C, не более 22°C, не более 21°C, не более 20°C, не более 19°C или не более 18°C.

Согласно некоторым вариантам реализации экспрессию рекомбинантного лектина проводят при температуре (также называемой в настоящей заявке "температурой экспрессии"), равной по меньшей мере 15°C, по меньшей мере 16°C или по меньшей мере 17°C. Согласно некоторым вариантам реализации температура экспрессии составляет 18°C.

Было обнаружено, что проведение экспрессии белка целесообразно, в частности, при температурах ниже 25°C, например, при 18°C, поскольку это помогает минимизировать количество продуцируемого белка, который включает остаток инициаторного метионина. В частности, это справедливо в тех случаях, когда клетка-хозяин является мезофилом, например, *E. coli*. Тот факт, что экспрессия при более низких температурах, таких как приблизительно 18°C, является благоприятной, особенно удивителен, поскольку указанная температура намного ниже оптимальной температуры роста клеток-хозяев, обычно используемых для экспрессии рекомбинантных белков, таких как *E. coli*.

Как известно в данной области техники, температуру культуры клеток-хозяев можно контролировать, помещая культуру, например, в колбе или биореакторе, в среду требуемой температуры, например, на водяную баню или в комнату или камеру с регулируемой температурой.

Перед экспрессией рекомбинантного белка лектина клетки-хозяева можно культивировать до требуемой плотности популяции. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает культивирование клетки-хозяина, включающее

фазу роста, во время которой клетки-хозяева культивируют до экспрессии белка; и фазу экспрессии, во время которой осуществляют экспрессию белка.

Во время фазы роста может быть желательно стимулировать быстрое размножение клеток-хозяев, чтобы максимизировать продукцию белка во время последующей фазы экспрессии. В фазе роста время удвоения клеток-хозяев может быть меньше времени удвоения в фазе экспрессии (т.е. в фазе роста клетки размножаются быстрее). Например, время удвоения клеток-хозяев в фазе роста может составлять не более 100 мин. Следует понимать, что время удвоения клеток в фазе роста варьирует в зависимости от того, находятся ли клетки в лаг-фазе роста, в течение которой время удвоения относительно велико, или в экспоненциальной фазе роста, в течение которой время удвоения относительно небольшое.

Согласно некоторым вариантам реализации фазу роста проводят при температуре, превышающей температуру, при которой проводят фазу экспрессии. Согласно некоторым вариантам реализации фазу роста или по меньшей мере ее часть проводят при температуре, равной по меньшей мере 25°C, по меньшей мере 30°C или по меньшей мере 35°C. Согласно некоторым вариантам реализации фазу роста или ее часть проводят при температуре не более 40°C или не более 38°C.

Таким образом, следует понимать, что согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает снижение температуры культивирования при переходе от фазы роста к фазе экспрессии. Снижение температуры может проводиться постепенно на протяжении периода, равного нескольким часам. Например, снижение температуры может проводиться на протяжении периода, равного по меньшей мере 2 ч, по меньшей мере 4 ч или по меньшей мере 6 ч. Согласно некоторым вариантам реализации температуру снижают на протяжении периода не более 6 или 7 ч.

Снижение температуры может проводиться во время фазы роста. Например, на первой стадии фазы роста может проводиться при первой температуре (например, 30°C), а на второй стадии фазы роста температура может быть снижена до температуры фазы экспрессии (например, снижение от 30°C до 18°C).

Экспрессия рекомбинантного белка лектина может быть инициирована добавлением индуктора к культуре. Таким образом, фаза экспрессии может быть определена как стадия, во время которой в культуре клеток-хозяев содержится индуктор. Эта фаза может также называться "фазой индукции".

Как известно в данной области техники, индуктор представляет собой молекулу, регулируемую экспрессию гена. Рекомбинантный ген лектина может находиться под контролем последовательности оператора. В отсутствие индуктора экспрессия гена может быть предотвращена за счет связывания ре-

прессора с последовательностью оператора или, согласно альтернативному варианту реализации, за счет отсутствия активации активатором. В присутствии индуктора может быть предотвращена репрессия экспрессии гена или разрешена активация экспрессии гена. Следовательно, помещая ген рекомбинантного лектина под контроль последовательности оператора, регулируемой индуктором, можно строго контролировать экспрессию рекомбинантного белка лектина, чтобы избежать "растекающейся" экспрессии. Хорошо известные примеры индуцибельных систем экспрессии включают оперон *aga* и оперон *lac*. В опероне *lac* связывание репрессора с оператором *lac* предотвращает транскрипцию нижестоящих генов. Экспрессия белка может быть инициирована путем применения аллолактозы или ее имитатора IPTG (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид), который связывается с репрессором *lac* и высвобождает его из оператора *lac*, обеспечивая тем самым транскрипцию генов внутри оперона. Специалистам в данной области техники известны другие индуцируемые опероны.

Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации ген рекомбинантного лектина находится под контролем оператора *lac*. Согласно таким вариантам реализации индуктор содержит IPTG.

IPTG может быть добавлен в культуру в концентрации, составляющей по меньшей мере 0,1 мМ, по меньшей мере 0,2 мМ или по меньшей мере 0,25 мМ.

Согласно некоторым вариантам реализации концентрация IPTG составляет менее 1 мМ. Концентрация IPTG может составлять не более 0,7 мМ или не более 0,5 мМ. Использование более низкой концентрации IPTG может быть благоприятным для поддержания низких уровней экспрессии, что, как считается, способствует эффективному отщеплению инициаторного метионина.

Индуктор может быть добавлен после того как популяция клеток-хозяев увеличится до требуемой плотности во время фазы роста. Численность популяции клеток-хозяев может быть определена путем измерения оптической плотности (OD) культуры. Согласно некоторым вариантам реализации индуктор добавляют (т.е. инициируют фазу экспрессии), когда OD₆₀₀ (оптическая плотность культуры, измеренная при 600 нм) составляет по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 38 или по меньшей мере 40. Согласно некоторым вариантам реализации индуктор добавляют, когда OD₆₀₀ составляет по меньшей мере 25 и не более 40.

Как хорошо известно в данной области техники, в периодической культуре клетки сначала культивируют для получения требуемой клеточной массы. На указанном этапе основное внимание уделяют усилению роста клеток, а не синтезу рекомбинантного белка. В общем случае выбор времени индукции определяется периодом активного роста требуемой клеточной массы, в течение которого клетки содержат максимальное количество рибосом для синтеза белка. После получения требуемой клеточной массы после добавления индуктора будет продуцироваться рекомбинантный белок. Следовательно, выбор времени индукции важен для производительности при продуцировании рекомбинантного белка. Выбранное время индукции будет варьировать в зависимости от таких факторов, как тип клетки-хозяина, тип культуральной среды, условия культивирования и тип рекомбинантного белка.

Согласно некоторым вариантам реализации фазу роста проводят в течение по меньшей мере 4 ч, по меньшей мере 6 ч, по меньшей мере 8 ч или по меньшей мере девяти часов до добавления индуктора, который инициирует фазу экспрессии.

Фаза экспрессии (то есть время культивирования после добавления индуктора) может продолжаться по меньшей мере 10 ч, по меньшей мере 12 ч, по меньшей мере 16 ч, по меньшей мере 20 ч, по меньшей мере 24 ч, по меньшей мере 30 ч или по меньшей мере 35 ч. Согласно некоторым вариантам реализации фаза экспрессии продолжается до 40 ч.

Более длительная фаза экспрессии, в частности, благоприятна в тех случаях, когда экспрессию осуществляют при более низких температурах, поскольку скорость роста клеток является медленной и, соответственно, время удвоения больше. Соответственно, время, отведенное для фазы экспрессии, увеличивают, чтобы обеспечить больший рост клеток и компенсацию более низкой скорости роста из-за более низкой температуры.

Без ограничения какой-либо теорией считается, что более длительная фаза экспрессии (индукции) и продленное время удвоения позволяет устойчиво увеличивать количество экспрессируемого белка. Из-за метаболических условий в клетке-хозяине достаточно времени для отщепления инициаторного метионина метионинаминопептидазой (MAP), что помогает максимизировать выход рекомбинантного белка, не содержащего метионина.

Понятно, что специалист в данной области техники сможет выбрать подходящие условия культивирования для определенной клетки-хозяина, в том числе подходящую культуральную среду, содержащую необходимые питательные вещества для поддержания роста клеток и экспрессии белка. Согласно некоторым вариантам реализации клетки культивируют в жидких средах. Подходящие жидкие среды для культивирования микробных клеток включают лизогенный бульон/бульон Луриа (LB).

Предпочтительно поддержание отношения углерода к азоту в культуральной среде на уровне от 3:1 до 6:1. Указанное отношение можно поддерживать, контролируя скорость подпитки культуры.

Потребность в питательных веществах, необходимых для роста клеток и экспрессии белка, определяют, по меньшей мере частично, такие факторы, как плотность популяции клеток, температура культивирования, количество индуктора и требуемая скорость экспрессии белка. Таким образом, скорость под-

питки питательными веществами клеток может быть использована для контроля скорости роста и, следовательно, скорости экспрессии белка.

Согласно некоторым вариантам реализации источник углерода добавляют в культуру со скоростью не более $2 \text{ г л}^{-1}\text{ч}^{-1}$ или не более $1,5 \text{ г л}^{-1}\text{ч}^{-1}$ в течение фазы экспрессии. Источник углерода можно добавлять со скоростью, составляющей по меньшей мере $0,5 \text{ г л}^{-1}\text{ч}^{-1}$ или по меньшей мере $0,8 \text{ г л}^{-1}\text{ч}^{-1}$, во время экспрессии.

Источник углерода может содержать глицерин или состоять из глицерина. Дополнительно или согласно альтернативному варианту могут быть использованы другие источники углерода, такие как глюкоза или декстроза.

Согласно некоторым вариантам реализации источник азота добавляют в культуру со скоростью не более $1,5 \text{ г л}^{-1}\text{ч}^{-1}$ или не более $1 \text{ г л}^{-1}\text{ч}^{-1}$ во время фазы экспрессии. Добавление источника азота может происходить со скоростью по меньшей мере $0,4 \text{ г л}^{-1}\text{ч}^{-1}$ или по меньшей мере $0,6 \text{ г л}^{-1}\text{ч}^{-1}$ во время экспрессии белка.

Было обнаружено, что за счет ограничения поступления углерода и/или азота в пределах показателей, указанных выше, скорость роста клеток и экспрессия белка оптимизируются таким образом, что белок в значительной степени экспрессируется в растворимой форме, и в большей части белка отсутствует инициаторный метионин. И напротив, как было обнаружено, неконтролируемая подпитка приводит к повышенной скорости экспрессии белка и неполному отщеплению метионина.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ согласно настоящему изобретению позволяет получать по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90% рекомбинантного белка лектина, не содержащего метионин (т.е. белка, лишённого остатка инициаторного метионина).

Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает одно или несколько, или все из следующих условий:

температура экспрессии составляет по меньшей мере 15°C и не более 22°C (например, 18°C);

фазу экспрессии (т.е. индукции) проводят по меньшей мере в течение 10 ч;

источник углерода добавляют в культуру со скоростью от $0,5$ до $2 \text{ г л}^{-1}\text{ч}^{-1}$;

источник азота добавляют в культуру со скоростью от $0,4$ до $1,5 \text{ г л}^{-1}\text{ч}^{-1}$;

концентрация индуктора составляет по меньшей мере $0,1 \text{ мМ}$ и не более $0,5 \text{ мМ}$.

Источник углерода и/или азота может быть добавлен в культуру во время фазы экспрессии, фазы роста или во время фазы экспрессии и роста.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный рекомбинантный белок лектин изменен по меньшей мере в одном из положений аминокислот 1, 14, 34, 113 и 123 природной последовательности аминокислот SRL (SEQ ID NO:2), как описано в WO 2010/095143, включенной в настоящую заявку посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рекомбинантный белок лектин изменен во всех указанных положениях относительно природного SRL.

Указанный рекомбинантный белок лектин может содержать последовательность аминокислот или состоять из последовательности аминокислот, выбранной из:

(i) SEQ ID NO:1;

(ii) SEQ ID NO:3;

(iii) SEQ ID NO:4 или же

(iv) последовательности аминокислот, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% гомологичной SEQ ID NO:1, 3 или 4.

SEQ ID NO:1 представляет собой вариант последовательности аминокислот лектина *S. rolfsii* (называемый Rec-2 в WO 2010/095143).

SEQ ID NO:2 представляет собой последовательность аминокислот природного лектина *S. rolfsii*.

SEQ ID NO:3 представляет собой вариант последовательности аминокислот лектина *S. rolfsii* (называемый Rec-3 в WO 2010/095143).

SEQ ID NO:4 представляет собой вариант последовательности аминокислот лектина *S. rolfsii* (описанный в WO 2014/203261).

Согласно одному варианту реализации процент "гомологии" для двух последовательностей определяют с использованием алгоритма BLASTP с параметрами, установленными по умолчанию (Altschul et al. *Nucleic Acids Res.* 1997 Sep 1; 25 (17): 3389-402). В частности, алгоритм BLAST доступен в сети Интернет по URL-адресу: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Согласно альтернативному варианту реализации для глобального выравнивания последовательностей процент идентичности гомологов для двух последовательностей определяют с использованием алгоритма EMBOSS Needle с параметрами, установленными по умолчанию. В частности, к алгоритму EMBOSS Needle доступен в сети Интернет по URL-адресу: https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/.

Если не указано иное, термин "гомология" используют в настоящей заявке взаимозаменяемо с термином "идентичность".

Рекомбинантный ген лектина может содержать нуклеотидную последовательность, соответствующую-

щую с SEQ ID NO:5, или состоять из нее. Однако следует понимать, что из-за вырожденности генетического кода существует множество альтернативных нуклеотидных последовательностей, которые могут давать одну и ту же последовательность аминокислот.

Согласно некоторым вариантам реализации рекомбинантный ген лектина содержится в экспрессионной конструкции, такой как плазмида или вектор. Указанная экспрессионная конструкция может дополнительно содержать селективный маркер, который позволяет выбрать клетки-хозяева, несущие конструкцию, кодирующую рекомбинантный ген лектина. Селективный маркер может представлять собой антибиотик, такой как канамицин. Согласно таким вариантам реализации культуральная среда может дополнительно содержать антибиотик.

Подходящие искусственные плазмиды для экспрессии генов в бактериальных клетках включают векторы pET, хотя специалисту в данной области техники известны и другие экспрессионные векторы. Согласно некоторым вариантам реализации вектор представляет собой pET27b.

Согласно некоторым вариантам реализации культура клеток-хозяев имеет объем по меньшей мере 10 л, по меньшей мере 20 л, по меньшей мере 30 л, по меньшей мере 40 л, по меньшей мере 50 или по меньшей мере 100 л. Экспрессия может быть проведена в промышленном ферментере.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ дополнительно включает этап клонирования рекомбинантного гена лектина (например, гена, содержащего последовательность SEQ ID NO:5) в экспрессионный вектор. Способы молекулярного клонирования известны специалисту в данной области техники и описаны в таких пособиях, как "Молекулярное клонирование: лабораторное руководство" Сэмбрука и Рассела (Sambrook and Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual").

Клетки-хозяева могут представлять собой микробные клетки, такие как бактерии, археи, дрожжи или грибы. Согласно некоторым вариантам реализации клетка-хозяин представляет собой бактерию, такую как *E. coli*. В частности, предпочтительным штаммом является штамм *E. coli* BL21 DE3. Gold.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ дополнительно включает этап инсерции экспрессионного вектора в клетку-хозяина. Это может быть достигнуто с использованием способов, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, таких как трансформация или электропорация.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ дополнительно включает выделение экспрессированного рекомбинантного белка лектина. Указанный этап выделения приводит к получению неочищенного рекомбинантного белка лектина (такого как белок, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1). Выделение может включать этап центрифугирования, например, когда клетку-хозяина центрифугируют с получением клеточного осадка. Выделение может дополнительно включать ресуспендирование клеточного осадка в буфере; подходящие буферы для ресуспендирования известны специалисту в данной области техники. Этап выделения может включать лизис ресуспендированного клеточного осадка, например, с использованием гомогенизатора для разрушения клеточной мембраны. Лизис клеток необязательно проводят при давлении, равном приблизительно 16 000-20 000 фунтов на квадратный дюйм.

Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ дополнительно включает очищение неочищенного рекомбинантного белка лектина. Очищение приводит к получению изолята рекомбинантного белка лектина. Очищение можно проводить любым подходящим способом, таким как центрифугирование (например, ультрацентрифугирование), эксклюзионная хроматография, ионообменная хроматография, электрофорез, аффинная хроматография, фильтрация (например, диафильтрация) и высокопроизводительная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или комбинация перечисленного.

Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает:

a) необязательно, клонирование рекомбинантного гена лектина в экспрессионный вектор и инсерцию экспрессионного вектора в клетку-хозяина;

b) культивирование клетки-хозяина в подходящей среде, включающее фазу роста, которую проводят при температуре от 25 до 40°C, и фазу экспрессии, в ходе которой экспрессируют рекомбинантный белок лектин, кодируемый рекомбинантным геном лектина, при этом указанную фазу экспрессии проводят при температуре от 15 до 30°C, а отношение углерод:азот в фазе экспрессии поддерживают на уровне от 3:1 до 6:1;

c) необязательно, выделение рекомбинантного белка лектина, экспрессированного согласно (b), с получением неочищенного рекомбинантного белка лектина; и

d) необязательно, очищение неочищенного рекомбинантного белка лектина с получением изолята рекомбинантного белка лектина.

Согласно некоторым вариантам реализации очищение неочищенного рекомбинантного белка лектина включает по меньшей мере один этап хроматографии. Согласно некоторым вариантам реализации указанный по меньшей мере один этап хроматографии включает ионообменную хроматографию и/или хроматографию гидрофобного взаимодействия.

Согласно некоторым вариантам реализации изобретения очищение неочищенного рекомбинантного белка лектина включает:

i) начальное очищение неочищенного рекомбинантного белка лектина путем анионообменной хроматографии с получением первого очищенного элюата;

- ii) необязательное очищение первого очищенного элюата хроматографией с гидрофобным взаимодействием с получением второго очищенного элюата;
- iii) необязательное очищение второго очищенного элюата путем катионообменной хроматографии с получением третьего очищенного элюата;
- iv) дополнительное очищение второго или третьего очищенного элюата путем анионообменной хроматографии с получением четвертого очищенного элюата; и
- v) замену буфера четвертого очищенного элюата путем диафильтрации с получением очищенного изолята рекомбинантного белка лектина.

Предпочтительно описанные выше этапы очищения позволяют получить рекомбинантный белок лектин высокой чистоты (чистота 97-99%) без необходимости химической или ферментативной обработки.

Согласно второму аспекту настоящего изобретения предложена экспрессионная конструкция, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:5.

Согласно третьему аспекту настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, содержащая экспрессионную конструкцию согласно второму аспекту изобретения.

Следует понимать, что любой из описанных в настоящей заявке вариантов реализации может быть скомбинирован любым способом и с любым аспектом изобретения, если не указано иное.

Согласно некоторым конкретным вариантам реализации настоящее изобретение относится к способу получения рекомбинантного белка лектина, такого как белок, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, включающему:

a. клонирование нуклеотидной последовательности (например, последовательности SEQ ID NO:5), кодирующей рекомбинантный белок лектин, в рекомбинантную клетку-хозяина, встроенную в вектор, с получением клона;

b. периодическую ферментацию с подпиткой клона, полученного на этапе "a", для экспрессии рекомбинантного белка лектина (например, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1), в подходящей среде при начальной температуре приблизительно 25-40°C и температуре фазы индукции приблизительно 15-30°C, с такой скоростью подпитки, при которой отношение углерода к источнику азота составляет от 3:1 до 6:1, с получением продукта ферментации;

c. выделение и осветление продукта ферментации, полученного на этапе "b", с получением неочищенного рекомбинантного белка лектина (например, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1); и

d. очищение неочищенного рекомбинантного белка лектина (например, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1), полученного на этапе "c". Очищение необязательно включает этапы:

i. начального очищения неочищенного рекомбинантного белка лектина (например, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1) путем анионообменной хроматографии с получением первого очищенного элюата;

ii. необязательного очищения первого очищенного элюата, полученного на этапе i, с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия с получением второго очищенного элюата;

iii. очищения второго очищенного элюата, полученного на этапе ii, или первого очищенного элюата, полученного на этапе i, путем катионообменной хроматографии с получением третьего очищенного элюата;

iv. дополнительного очищения третьего очищенного элюата, полученного на этапе iii, или второго очищенного элюата, полученного на этапе ii, путем анионообменной хроматографии с получением очищенного элюата;

v. замены буфера очищенного элюата, полученного на этапе iv, путем диафильтрации, с получением рекомбинантного белка лектина (например, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1) в виде чистого продукта.

Настоящее изобретение также относится к периодической ферментации с подпиткой рекомбинантной бактериальной клетки в подходящей среде, при этом скорость подпитки источником углерода в процессе ферментации составляет от 0,5 до 2 г л⁻¹ч⁻¹, а источником азота - от 0,4 до 1,5 г л⁻¹ч⁻¹, с получением продукта ферментации.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ очищения неочищенного рекомбинантного лектина, такого как белок, имеющий последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, при этом указанный способ включает:

a. начальное очищение неочищенного рекомбинантного белка лектина (например, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1) путем анионообменной хроматографии с получением первого очищенного элюата;

b. необязательное очищение первого очищенного элюата, полученного на этапе "a", с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия с получением второго очищенного элюата;

c. очищение второго очищенного элюата, полученного на этапе "b", или первого очищенного элюата, полученного на этапе "a", путем катионообменной хроматографии с получением третьего очищенного элюата;

d. дополнительное очищение третьего очищенного элюата, полученного на этапе "с", или второго очищенного элюата, полученного на этапе "b", путем анионообменной хроматографии с получением очищенного элюата;

e. замена буфера очищенного элюата, полученного на этапе "d", путем диафильтрации, с получением рекомбинантного белка лектина (например, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1), в виде чистого продукта.

Настоящее изобретение также относится к клону, применяемому для получения рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, содержащему нуклеотидную последовательность SEQ ID NO:5, кодирующую последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, в рекомбинантной клетке-хозяине, встроенному в вектор.

Настоящее изобретение дополнительно относится к рекомбинантному лектину, имеющему последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, полученному описанным в настоящей заявке способом.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложенный способ обеспечивает преимущество, заключающееся в получении выхода требуемого продукта более 90%, более 95% или более 97%.

Чистота продукта рекомбинантного белка лектина может составлять по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% при измерении с использованием стандартных способов, таких как анионообменная хроматография.

Настоящее изобретение относится к способу получения рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, включающему:

a. клонирование нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5, кодирующей последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, в рекомбинантную клетку-хозяин, встроенную в вектор, с получением клона;

b. периодическую ферментацию с подпиткой клона, полученного на этапе "a", для экспрессии рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, в подходящей среде при начальной температуре приблизительно 25-40°C и температуре индукционной фазы приблизительно 15-30°C, с такой скоростью подпитки, при которой отношение углерода к источнику азота составляет от 3:1 до 6:1, с получением продукта ферментации;

c. выделение и осветление продукта ферментации, полученного на этапе "b", с получением неочищенного рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1; и

d. очищение неочищенного рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, полученного на этапе "с", включающее этапы:

i. начального очищения неочищенного рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, путем анионообменной хроматографии с получением первого очищенного элюата;

ii. необязательного очищения первого очищенного элюата, полученного на этапе i, с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия с получением второго очищенного элюата;

iii. очищения второго очищенного элюата, полученного на этапе ii, или первого очищенного элюата, полученного на этапе i, путем катионообменной хроматографии с получением третьего очищенного элюата;

iv. дополнительного очищения третьего очищенного элюата, полученного на этапе iii, или второго очищенного элюата, полученного на этапе ii, путем анионообменной хроматографии с получением очищенного элюата;

v. замены буфера очищенного элюата, полученного на этапе iv, путем диафильтрации с получением рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, в виде чистого продукта.

Клонирование и экспрессия рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1.

Согласно аспекту настоящего изобретения клетка-хозяин, используемая для получения рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, может представлять собой бактериальную клетку или дрожжевую клетку. Предпочтительной бактериальной клеткой является *E. coli*, в частности, штамм *E. coli* BL21 DE3.Gold. Нуклеотидная последовательность SEQ ID NO:5, кодирующая рекомбинантный лектин с последовательностью аминокислот SEQ ID NO:5, может быть клонирована в вектор, предпочтительно, pET27b. Затем плаزمида может быть трансформирована и экспрессирована в клетках-хозяевах *E. coli* BL21 DE3 Gold.

Способ ферментации.

В примере варианта реализации штаммы *E. coli* BL21 DE3 Gold, содержащие плазмиду pET27b, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую рекомбинантный белок лектин, культивируют в среде для инокуляции, содержащей бульон Луриа HiVeg (20 г/л), Na₂HPO₄ (7,5 г/л), декстрозу (5 г/л), MgSO₄·7H₂O (1 г/л), канамицин в конечной концентрации 20 мкг/мл и 0,1% (об./об.) раствор следовых металлов FeSO₄, ZnSO₄, CoCl₂, NaMoO₄, CaCl₂, MnCl₂, CuSO₄ или H₃BO₃ в соляной кислоте. Инокулят получают, культивируя клетки при 30-40°C в течение 12-16 ч. Периодическая ферментация с подпиткой рекомбинантных штаммов *E. coli* BL21 DE3 Gold может быть проведена в среде для продуциро-

вания, содержащей дрожжевой экстракт (10 г/л), декстрозу (12 г/л), $\text{KН}_2\text{PО}_4$ (3 г/л), K_2HPO_4 (12,5 г/л), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 г/л), NaCl (0,5 г/л), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 г/л) и 0,1% (об./об.) раствор следов металлов FeSO_4 , ZnSO_4 , CoCl_2 , NaMoO_4 , CaCl_2 , MnCl_2 , CuSO_4 или H_3BO_3 в соляной кислоте. Может быть добавлен канамицин до конечной концентрации 20 мкг/мл. Подпитка может быть начата с подходящего источника углерода, такого как глюкоза или глицерин, предпочтительно с 50% (мас./об.) глицерина, и источника азота, такого как триптон, пептон или дрожжевой экстракт, предпочтительно с 40% (мас./об.) дрожжевого экстракта. Подпитка может быть начата через 5 ч с заданной скоростью подпитки. Скорость подпитки источником углерода во время ферментации может составлять от 0,5 до 2 г $\text{л}^{-1}\text{ч}^{-1}$, а скорость подпитки источником азота может составлять от 0,4 до 1,5 г $\text{мл}^{-1}\text{ч}^{-1}$, с сохранением отношения С:Н в диапазоне от 3:1 до 6:1, предпочтительно - с сохранением отношения С:Н = 4:1. Специалисты в данной области техники могут изменять скорости и количества в зависимости от целесообразности, так как они специфичны для параметров, показанных для конкретных размеров партий.

Начальная фаза роста может проводиться при температуре от 25°C до 40°C и при температуре от 15 до 30°C во время фазы индукции с последующим очищением с помощью последовательной колоночной хроматографии. Во время первоначального роста температура может поддерживаться на уровне приблизительно 25-40°C, предпочтительно приблизительно 37°C. Для фазы индукции температура может быть снижена и поддерживаться на уровне приблизительно 15-30°C, предпочтительно приблизительно 22°C.

Начальный рост культуры может быть проведен при скорости аэрации 1-2 об./об./мин, поддержании уровня растворенного кислорода на уровне 50-60% и рН на уровне 6,6-7,2 с применением щелочи, такой как гидроксид натрия. Общее время культивирования может составлять от 20 до 50 ч или от 30 до 40 ч, предпочтительно - приблизительно 36 ч. Подпитка источниками углерода и азота может продолжаться до конца цикла культивирования.

Экспрессия рекомбинантного белка лектина (например, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1) может быть осуществлена путем индукции культурального бульона с клетками-хозяевами (например, *E. coli*) индуктором, таким как лактоза или изопропилтиогалактопиранозид (IPTG), предпочтительно IPTG в концентрации, составляющей приблизительно от 50 мкМ до 1500 мкМ, предпочтительно приблизительно 1000 мкМ. Культура может быть индуцирована при измеренной плотности клеток, равной по меньшей мере приблизительно 20-50, предпочтительно приблизительно 30-50 при приблизительно 600 нм.

Экспрессия рекомбинантного белка лектина может быть продемонстрирована с помощью ДСН-ПААГ-анализа общего клеточного лизата и супернатанта лизата. Экспрессия рекомбинантного белка может составлять от 50% до 60% от общей экспрессии белка, и он может быть экспрессирован в растворимой форме в цитоплазму. Выход рекомбинантного белка лектина может составлять по меньшей мере приблизительно 5-9 г/л ферментативного бульона, по результатам анализа способом ДСН-ПААГ-электрофореза.

Выделение растворимого рекомбинантного белка лектина может осуществляться путем сбора клеток с использованием центрифугирования для получения клеточного осадка и повторного суспендирования клеток в подходящем буфере, который может быть предварительно охлажден до температуры, составляющей приблизительно 6-10°C. Разрушение клеток можно проводить в гомогенизаторе (MiniDebee), необязательно под высоким давлением, равным приблизительно 16000-20000 фунтов на кв. дюйм. Полученный таким образом клеточный лизат может быть дополнительно обработан для очищения растворимого рекомбинантного белка лектина, например, с применением различных хроматографических этапов.

Очищение рекомбинантного белка лектина.

Способ очищения рекомбинантного белка лектина, полученного из клеточного лизата, полученного в процессе ферментации, может включать следующие этапы:

- a) колонка 1: анионообменная хроматография,
- b) колонка 2: хроматография гидрофобного взаимодействия,
- c) колонка 3: катионообменная хроматография,
- d) колонка 4: анионообменная хроматография.

Согласно некоторым вариантам реализации тотальный клеточный лизат, полученный после лизиса клеток, осветляют с использованием системы тангенциальной поточной фильтрации с размером пор приблизительно 0,1 мкм с получением прозрачного раствора.

Согласно некоторым вариантам реализации осветленный клеточный лизат подвергают анионообменной колоночной хроматографии с использованием таких смол, как Cellufine Max Q-r, Source 30Q, Source 15Q и ДЭАЭ-сефароза. Колонка может быть уравновешена подходящим буфером, например, буфером, содержащим приблизительно 10-30 мМ Tris, приблизительно 0,5-2 мМ EDTA, со значением рН, составляющим приблизительно 7,5-9,0. После загрузки колонка может быть промыта буфером, имеющим проводимость в диапазоне приблизительно от 4 до 8 мСм/см. Элюирование может быть проведено с использованием буфера, содержащего приблизительно 10-30 мМ Tris, приблизительно 0,5-2 мМ EDTA и хлорид натрия, с проводимостью приблизительно 15-20 мСм/см.

Согласно некоторым вариантам реализации белок, полученный на анионообменной колонке, необя-

зательно подвергают колоночной хроматографии с гидрофобным взаимодействием. Могут быть использованы смолы Cellufine Max Butyl, бутилсефароза, фенилсефароза и т.д. Колонка может быть уравновешена приблизительно 20-30 мМ натрий-ацетатным буфером, содержащим приблизительно 0,5-2 М сульфат аммония, приблизительно 0,5-2 мМ EDTA, со значением pH, равным приблизительно 4-5. Элюирование может быть проведено с использованием приблизительно 20-30 мМ натрий-ацетатного буфера, содержащего приблизительно 0,5-2 мМ EDTA, приблизительно 10-20 г/л сульфата аммония, со значением pH в диапазоне приблизительно от 4 до 5 и проводимостью в диапазоне приблизительно от 2 до 100 мСм/см.

Элюат, полученный после колоночной хроматографии с гидрофобным взаимодействием или на анионообменной колонке, может быть затем подвергнут катионообменной колоночной хроматографии с использованием таких смол, как SP Sepharose, CM Sepharose, Cellufine Max S-h и т.д. Колонка может быть уравновешена приблизительно 20-30 мМ натрий-ацетатного буфера, содержащего приблизительно 0,5-2,0 мМ EDTA, со значением pH в диапазоне приблизительно от 4 до 5. Буфер для элюирования может содержать приблизительно 20-30 мМ ацетат натрия, приблизительно 0,5-2 мМ EDTA, приблизительно 0,3-1 М хлорид натрия и иметь значение pH в диапазоне приблизительно от 4 до 5. Перед элюированием может быть задан ступенчатый градиент в диапазоне приблизительно 15-25%. Элюирование может быть проведено с использованием ступенчатого градиента в диапазоне приблизительно 50-80%.

Согласно некоторым вариантам реализации элюат, полученный при катионообменной хроматографии, разбавляют водой для инъекций (WFI) или очищенной водой (PW) в соотношении приблизительно от 1:2 до 1:5. Затем значение pH раствора белка может быть доведено приблизительно до 7,5-8,5 с использованием гидроксида натрия, Tris-буфера или глицинового буфера, pH 11,0, после чего проводят замену буфера на Tris-буфер, pH 7,5-8,5, в системе тангенциальной поточной фильтрации до тех пор, пока проводимость не снизится до диапазона приблизительно 1-5 мСм/см. Затем раствор белка может быть подвергнут колоночной анионообменной хроматографии. Могут быть использованы такие смолы, как Cellufine Max Q-г, Source Q15, Source Q30 или DEAE-сефароза. Колонка может быть уравновешена приблизительно 20-30 мМ Tris-буфером со значением pH в диапазоне приблизительно от 7,5 до 8,5. Элюирование может быть проведено с использованием буфера, содержащего приблизительно 20-30 мМ Tris, приблизительно 0,3-1 М хлорид натрия, со значением pH в диапазоне приблизительно от 7,5 до 8,5. Для элюирования может быть задан линейный градиент приблизительно до 15% для 3-20 объемов колонки. В полученном таким образом элюате может быть проведена замена буфера на подходящий буфер, такой как забуференный Tris солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор, ацетатный буфер, путем диафильтрации с использованием мембраны с отсечением по 3, 5 или 10 кДа.

Белок после замены буфера можно хранить при температуре приблизительно 2-8°C для поддержания биологической активности. Согласно альтернативному варианту реализации буфер в элюате, полученном после второй анионообменной хроматографии, может быть заменен на воду для инъекций и затем элюат может быть лиофилизирован с получением порошковой формы белка.

Чистота рекомбинантного белка лектина может быть проверена с помощью анионообменной высокопроизводительной жидкостной хроматографии. Было установлено, что полученный таким образом рекомбинантный белок лектин, имеющий последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, после серии хроматографических разделений имеет чистоту 97-99%. Процент рекомбинантного белка лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, с непроцессированным инициаторным метионином составляет приблизительно 10-15% (распространенность относительно лектина без Met).

Таким образом, согласно настоящему изобретению предложен способ экспрессии рекомбинантного белка лектина, такого как белок, соответствующий SEQ ID NO:1, в векторе, характеризующемся жесткой регуляцией экспрессии белка, и его экспрессия в растворимой форме в клетках-хозяевах. Способ согласно настоящему изобретению является контролируемым и масштабируемым, и преодолевает недостатки, свойственные известным ранее способам. Таким образом, согласно настоящему изобретению предложен промышленно масштабируемый способ получения рекомбинантного лектина в масштабах граммов.

Таким образом, основной целью настоящего изобретения является преодоление недостатков предыдущего уровня техники и создание высокоэффективного способа получения последовательности аминокислот SEQ ID NO:1.

Выход рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, может составлять 1,5-3,0 г/л ферментативного бульона. Таким образом, также достигается другая цель изобретения, заключающаяся в обеспечении способа, дающего высокие выходы и экономически целесообразного, который может быть реализован с использованием легкодоступного сырья. Предложенный способ является экономически целесообразным, поскольку стоимость сырья, необходимого для получения больших количеств рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, относительно невелика. Кроме того, для реализации указанного способа не требуются очень высокие или низкие температуры или дорогостоящие инструменты. Соответственно, указанный способ является экономически целесообразным и легко масштабируемым.

Настоящее изобретение также относится к периодической ферментации рекомбинантных бактериальных клеток с подпиткой в подходящей среде, при этом скорость подпитки источником углерода во

время ферментации составляет приблизительно от 0,5 до 2 г л⁻¹ч⁻¹, и скорость подпитки источником азота составляет приблизительно от 0,4 до 1,5 г л⁻¹ч⁻¹, для получения продукта ферментации.

Начальная фаза ферментации/роста может проводиться при температуре приблизительно 25°C до 40°C, после чего температуру снижают приблизительно до 15-30°C во время фазы индукции с последующим очищением с помощью последовательной колоночной хроматографии.

Согласно некоторым вариантам реализации начальный рост культуры проводили при скорости аэрации приблизительно 1-2 об./об./мин, поддерживая уровень растворенного кислорода 50-60% и значения pH на уровне 6,6-7,2 с использованием щелочи, такой как гидроксид натрия. Согласно некоторым вариантам реализации температуру во время начального роста поддерживали на уровне приблизительно 25-40°C. Во время фазы индукции температура может быть снижена и поддерживаться на уровне приблизительно 15-30°C. Время ферментации может составлять по меньшей мере 20-50 ч. Подпитка источником углерода и азота может быть продолжена до конца цикла ферментации.

Согласно некоторым вариантам реализации осветленный клеточный лизат подвергают анионообменной колоночной хроматографии с использованием таких смол, как Cellufine Max Q-г, Source 30Q, Source 15Q и ДЭАЭ-сефароза. Колонка может быть уравновешена буфером, содержащим приблизительно 10-30 мМ Tris-буфера, приблизительно 0,5-2 мМ EDTA, с pH приблизительно 7,5-9,0. После загрузки колонка может промыта буфером с проводимостью в диапазоне приблизительно от 4 до 8 мСм/см. Элюирование может быть проведено с использованием буфера, содержащего 10-30 мМ Tris, 0,5-2 мМ EDTA и хлорид натрия, с проводимостью 15-20 мСм/см.

Согласно некоторым вариантам реализации белок, полученный на анионообменной колонке, необязательно подвергают хроматографии на колонке с гидрофобным взаимодействием. Могут быть использованы смолы Cellufine Max Butyl, бутилсефароза, фенилсефароза и т.д. Колонка может быть уравновешена 20-30 мМ натрий-ацетатным буфером, содержащим приблизительно 0,5-2 М сульфата аммония и приблизительно 0,5-2 мМ EDTA, с pH приблизительно от 4,0 до 5,0. Элюирование может быть проведено с использованием приблизительно 20-30 мМ натрий-ацетатного буфера, содержащего приблизительно 0,5-2 мМ EDTA, приблизительно 10-20 г/л сульфата аммония, с pH в диапазоне приблизительно от 4 до 5 и проводимостью в диапазоне приблизительно от 2 до 100 мСм/см. Элюат, полученный после хроматографии на колонке с гидрофобным взаимодействием или на анионообменной колонке, затем может быть подвергнут катионообменной колоночной хроматографии с использованием таких смол, как SP Sepharose, CM Sepharose, Cellufine Max S-h и т.д. Колонка может быть уравновешена приблизительно 20-30 мМ натрий-ацетатным буфером, содержащим приблизительно 0,5-2,0 мМ EDTA и pH в диапазоне приблизительно от 4 до 5. Буфер для элюирования может содержать приблизительно 20-30 мМ ацетат натрия, приблизительно 0,5-2 мМ EDTA, приблизительно 0,3-1 М хлорид натрия и иметь pH в диапазоне приблизительно от 4 до 5. Перед элюированием может быть задан ступенчатый градиент в диапазоне приблизительно 15-25%. Элюирование может быть проведено с использованием ступенчатого градиента в диапазоне приблизительно 50-80%.

Элюат, полученный с помощью катионообменной хроматографии, может быть разбавлен WFI или PW в соотношении приблизительно от 1:2 до 1:5. Затем значение pH раствора белка может быть доведено до приблизительно 8 с использованием NaOH, Tris-буфера или глицинового буфера, pH 11,0. Затем может быть проведена замена буфера на Tris-буфер, pH 7,5-8,5, с использованием системы тангенциальной поточной фильтрации до тех пор, пока проводимость не снизится до диапазона приблизительно 1-5 мСм/см. Затем раствор белка может быть подвергнут колоночной анионообменной хроматографии. Могут использоваться такие смолы, как Cellufine Max Q-г, Source Q15, Source Q30 или ДЭАЭ-сефароза. Колонка может быть уравновешена приблизительно 20-30 мМ Tris-буфером с pH в диапазоне приблизительно от 7,5 до 8,5. Элюирование может быть проведено буфером, содержащим приблизительно 20-30 мМ Tris, приблизительно 0,3-1 М хлорид натрия, с pH в диапазоне приблизительно от 7,5 до 8,5. Для элюирования может быть задан линейный градиент приблизительно до 15% для 3-20 объемов колонки. В полученном таким образом элюате может быть проведена замена буфера на подходящий буфер, такой как забуференный Tris солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор, ацетатный буфер, путем диафильтрации с использованием мембраны с отсечением по 3, 5 или 10 кДа. Белок после замены буфера можно хранить при 2-8°C для поддержания биологической активности. Согласно альтернативному варианту реализации буфер в элюате, полученном после второй анионообменной хроматографии, может быть заменен на воду для инъекций, и затем элюат может быть лиофилизирован с получением порошковой формы белка. Чистота рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, может быть проверена с применением анионообменной высокопроизводительной жидкостной хроматографии. Рекомбинантный лектин, имеющий последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, полученный таким образом, после указанной серии хроматографического разделения имеет чистоту 97-99%. Процент рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, с непроцессированным инициаторным метионином составлял 10-15% (распространенность относительно лектина без Met).

Настоящее изобретение относится к клону, используемому для получения рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, содержащему нуклеотидную последова-

тельность SEQ ID NO:5, кодирующую последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, в рекомбинантной клетке-хозяине, встроенному в вектор.

Примеры

Настоящие примеры приведены для демонстрации наилучшего способа реализации изобретения и не ограничивают объем изобретения каким бы то ни было образом.

Пример 1. Клонирование лектина SEQ ID NO:5 в вектор pET27b и экспрессия в *E. coli* BL21 DE3.

Нуклеотидную последовательность (SEQ ID NO:5), кодирующую рекомбинантный лектин, имеющий последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, ранее клонированную в вектор pET20b (согласно описанию в патенте № WO 2010/095143 A2), субклонировали в вектор pET27b. Клетки *E. coli* BL21 DE3, несущие SEQ ID NO:5, клонированную в pET20b, культивировали в бульоне Луриа HIVEG (Himedia, Мумбаи, Индия). Плазмиду выделяли из клеток с использованием набора для выделения плазмид GeneJET Miniprep (Thermo Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Плазмиду pET20b расщепляли рестрикционными ферментами NdeI и BamHI (New England Biolabs). Расщепленную плазмиду подвергали электрофорезу в агарозном геле, и высвобожденную вставку элюировали из геля с использованием набора для экстракции из геля GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Аналогичным образом выделяли вектор pET27b и расщепляли теми же рестрикционными ферментами (NdeI и BamHI). Вставку, высвобожденную из pET20b (SEQ ID NO:5), клонировали в вектор pET27b (pET27b-Lec) и трансформировали им *E. coli* BL21 DE3 (Gold). Клоны подвергали скринингу, проводя ПЦР колоний, и положительный клон в дальнейшем использовали для анализа экспрессии. Положительный клон культивировали в бульоне Луриа HIVEG при 37°C, индуцировали 0,25 мМ IPTG при плотности клеток 1-1,2 (OD₆₀₀ нм), а затем культивировали в течение 4 ч. Экспрессию рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, подтверждали с помощью анализа ДСН-ПААГ. Последовательность вставки в векторе pET27b подтверждали путем секвенирования ДНК выделенной плазмиды. Готовили исходные культуры положительного клона в глицерине и помещали на хранение при -80°C.

Пример 2. Процесс ферментации.

Культуру из исходной культуры в глицерине высевали в среду, содержащую 2% бульона Луриа HIVEG, 0,75% Na₂HPO₄, 0,5% декстрозы и канамицин (20 мкг/мл). Культуру культивировали при 30±2°C и 110 об/мин в течение 16 ч. Приблизительно 300 мл культуры инокулировали в 2,3 л среды для продуцирования, содержащей 1% дрожжевого экстракта (мас./об.), 1,2% декстрозы (мас./об.), 0,3% KH₂PO₄ (мас./об.), 1,25% K₂HPO₄ (мас./об.), 0,5% (NH₄)₂SO₄ (мас./об.), 0,05% NaCl (мас./об.), 0,1% MgSO₄·7H₂O (мас./об.), 0,1% (об./об.) раствор следовых металлов, канамицин (20 мкг/мл). Ферментацию проводили в 5-литровом ферментере (BIOSTAT B, Sartorius Stedim) при скорости аэрации 1-2 об./об./мин, поддерживая уровень растворенного кислорода 50-60% и значения pH на уровне 6,6-7,0 с использованием щелочи. Начальный рост проводили при температуре 37°C. Температуру постепенно снижали и поддерживали при 22°C во время фазы индукции. Подпитку углеродом (глицерин) и источником азота (дрожжевой экстракт) начинали через 5 ч в логарифмическом масштабе при заданных скоростях подпитки, поддерживая отношение C:N в диапазоне 4:1. Культуру индуцировали при плотности клеток приблизительно 45 (OD₆₀₀), используя 1 мМ IPTG. Ферментацию продолжали на протяжении 24 ч и собирали культуральный бульон путем центрифугирования при 9000 об/мин в течение 15 мин. Сырая масса клеток, полученная из ферментативного бульона, составляла 372 г.

Пример 3. Выделение из клеток рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1.

Осадок клеток суспендировали в буфере для лизиса (25 мМ Tris, 1 мМ EDTA, pH 8,5) в соотношении 1:10 (мас./об.) И перемешивали в течение по меньшей мере 2 ч на верхнеприводной мешалке с получением гомогенной суспензии. Суспензию лизировали гомогенизацией под высоким давлением при давлении приблизительно 18 000 фунтов на квадратный дюйм. Лизат клеток центрифугировали при 9000 об/мин в течение 15 мин при 15°C. Полученный супернатант сохраняли и дополнительно обрабатывали для очищения рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1.

Пример 4. Удаление примесей нуклеиновых кислот и осветление раствора белка с помощью микрофльтрации.

Супернатант обрабатывали по меньшей мере 0,025% полиэтиленимином, перемешивая в течение 15-30 мин. Общий лизат клеток, полученный после обработки полиэтиленимином, осветляли с использованием полуволоконной мембраны с порами 0,1 мкм и площадью 3600 см², предварительно уравновешенной в 25 мМ Tris-буфере, содержащем 1 мМ EDTA, pH 8,0±0,5. Поддерживали трансмембранное давление, равное 5-10 фунтов на квадратный дюйм, на протяжении всего процесса осветления. Ретентат подвергали диафильтрации в пошаговом режиме с уравновешивающим буфером, описанным выше, для извлечения рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, в пермеат. Уровень извлечения рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, в пермеат составлял более 90%. По результатам измерения оптической плотности при 280 нм в пермеат был извлечено общее количество белка 84,4 г. Чистота представляющего интерес белка составила 49,4% по данным ВЭЖХ.

Пример 5. Очищение белков с использованием ионообменной хроматографии (колонка 1).

Осветленный раствор белка загружали на смолу Cellufine Max Q-г, предварительно уравновешенную 25 мМ Tris-буфером, содержащим 1 мМ EDTA, pH 8,0 ± 0,5. После загрузки проводили промывание уравновешивающим буфером с последующим промыванием уравновешивающим буфером, содержащим 1-3 г/л NaCl. Белок элюировали 25 мМ Tris-буфером, содержащим 1 мМ EDTA, 11-15 г/л NaCl, pH 8±0,5. Общее количество белка, извлеченное на указанной колонке, составило 41,6 г при чистоте активного белка 77,4%.

Пример 6. Преципитация и очищение белков с использованием хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC - колонка 2).

Значение pH элюата с колонки 1 доводили до 4,5 уксусной кислотой с последующей преципитацией сульфатом аммония. Затем раствор центрифугировали, и прозрачный супернатант обрабатывали на смоле HIC (Cellufine Max Butyl) для дополнительного очищения. Колонку уравновешивали 25 мМ натрий-ацетатным буфером, содержащим 1 мМ EDTA, 0,5-2 М сульфат аммония, pH 4,5, после чего загружали раствор белка. После загрузки проводили промывку уравновешивающим буфером с последующим элюированием буфером для элюирования, содержащим 25 мМ ацетат натрия, 1 мМ EDTA, 15 г/л сульфата аммония, pH 4,5. С колонки 2 было элюировано общее количество белка 27,5 г с чистотой 90,3%.

Пример 7. Очищение белка путем катионообменной хроматографии (колонка 3).

Белок, полученный из колонки 2, разводили очищенной водой до проводимости, равной приблизительно 20 мСм/см, и загружали на смолу SP Sepharose FF, предварительно уравновешенную 25 мМ натрий-ацетатным буфером, содержащим 1 мМ EDTA, pH 4,5. После загрузки колонку промывали уравновешивающим буфером с последующим использованием ступенчатого градиента 20% буфера для элюирования, содержащего 25 мМ ацетат натрия, 1 мМ EDTA, 0,5 М NaCl, pH 4,5. Элюирование проводили, задавая ступенчатый градиент 50-70% буфера для элюирования. В общей сложности из колонки было извлечено 24,6 г белка с чистотой 93,0%. Замену буфера в элюате с колонки 3 проводили на мембране с отсечением по 3 кДа с получением белка в 25 мМ Tris-буфере, pH 8,0.

Пример 8. Очищение белка путем анионообменной хроматографии.

После замены буфера получали 20,9 г белка и переносили на смолу Source 30Q. Колонку уравновешивали 25 мМ Tris-буфером, pH 8,0, после чего загружали раствор белка. После загрузки колонку промывали уравновешивающим буфером. Затем проводили элюирование, создавая линейный градиент буфера для элюирования, содержащего 25 мМ Tris, 0,5 М NaCl, pH 8,0, в 15 объемах колонки. Был получен единственный пик, который при анализе ВЭЖХ показал чистоту > 99,0%. Всего было получено 9,0 грамма, по результатам измерения оптической плотности при 280 нм, при допущении, что IOD при 280 нм соответствует 1 мг. В последнем элюате проводили замену буфера на TBS (50 мМ Tris-буфер, 150 мМ NaCl, pH 7,8).

Пример 9. Определение физико-химических характеристик рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID 1.

Чистоту рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO:1, определяли с помощью ДСН-ПААГ и анализа ВЭЖХ. Чистота рекомбинантного лектина с последовательностью аминокислот SEQ ID NO:1 по данным анализа ВЭЖХ составляла 97-99%. При анализе рекомбинантного лектина с последовательностью аминокислот SEQ ID NO:1 с помощью ДСН-ПААГ наблюдали единственную полосу, соответствующую молекулярной массе приблизительно 16 кДа. Идентичность белка подтверждали с помощью вестерн-блоттинга, а биологическую активность подтверждали с помощью анализа гемагглютинации и клеточного анализа *in vitro* на различных линиях раковых клеток. Молекулярная масса очищенного рекомбинантного лектина, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1, составляла 16044 Да.

Пример 10. Условия процесса ферментации.

Культуру из глицерина в соответствии с предыдущими примерами инокулировали в среду, содержащую 2% бульона Луриа Нивег, 0,75% Na₂HPO₄, 0,5% декстрозы и канамицин (20 мкг/мл). Культуру культивировали при 37°C и 110 об/мин в течение 16 ч для партий 1-3.

Для партий 4 и 5 культуру из исходной культуры в глицерине в соответствии с предыдущими примерами инокулировали в среду, описанную выше, за исключением того, что культуру культивировали при 30°C и 110 об/мин в течение 19 ч.

Затем приблизительно 300 мл культуры инокулировали в 2,3 л среды для продуцирования.

Среда для продуцирования соответствовала описанной в примере 2, за исключением следующих различий в каждой партии (приведенных в табл. 1).

Таблица 1

Анализ доли лектина с метионином, полученного при различных условиях ферментации

№ серии	Внесенные изменения	ОД при индукции	Итоговая ОД	Продолжительность получения партии (ч)	Скорость подпитки Общий добавленный глицерин (г/л)	Примечание
Партия 1	Среда для продуцирования содержала декстрозу (12 г/л). Получение партии начинали при 37°C и постепенно снижали температуру до 22°C к 4-му часу в логарифмическом масштабе. Индукция 1 мМ IPTG	54	199	25	102	Мет-лектин > 50%
Партия 2	Среда для продуцирования содержала декстрозу (12 г/л). Получение партии начинали при 37°C и постепенно снижали температуру до 22°C к 4-му часу в логарифмическом масштабе. Индукция 1 мМ IPTG	44	176	25	75	Мет-лектин 26%
Партия 3	Получение партии начинали при 37°C и снижали температуру до 18°C к 5-му часу.	40	128	25	70	Мет-лектин 16%
Партия 4	Получение партии начинали при 30°C, и снижали температуру до 18°C к 6-му часу.	27	97,8	33	35 год	Мет-лектин 13%
	Инокулят культивировали при 30°C в течение 19 часов. Индукция 0,25 мМ IPTG					
Партия 5	Получение партии начинали при 30°C, и снижали температуру до 18°C на 6-й час. Инокулят культивировали при 30°C в течение 19 часов. Индукция 0,25 мМ IPTG	30	117	48	40	Мет-лектин 12%

Партии 1-3: среда для продуцирования содержала 12 г/л декстрозы в соответствии с примером 2.

Партии 4-5: среда для продуцирования содержала 10 г/л декстрозы вместо 1,2% декстрозы, как описано в примере 2.

Для каждой партии ферментацию проводили в ферментере объемом 5 л (BIOSTAT B, Sartorius Ste-dim) при скорости аэрации 1-2 об./об./мин, уровень растворенного кислорода поддерживали на уровне 50-60%, а значение pH поддерживали на уровне 6,6-7,0 с использованием щелочи.

Температуру среды для продуцирования сначала поддерживали на уровне 37°C, при соблюдении следующих условий:

Партии 1-2. Температуру постепенно снижали до 22°C к 4-му часу в логарифмическом масштабе. Указанную температуру поддерживали в фазе индукции, которую инициировали 1 мМ IPTG. Общая продолжительность получения партии составляла 25 ч.

Подпитку источниками углерода (глицерин) и азота (дрожжевой экстракт) начинали через 4 ч в логарифмическом масштабе. Общее количество глицерина, внесенного в партию 1, составляло 102 г/л, а в партию 2 - 75 г/л.

Партия 3. Температуру постепенно снижали до 18°C к 5-му часу. Указанную температуру поддерживали в фазе индукции, которую инициировали 1 мМ IPTG. Общая продолжительность получения партии составляла 25 ч.

Общее количество глицерина, внесенного в партию 3 в фазе индукции, составляло 70 г/л.

Для партий 1-3 индуктор добавляли через 4-6 ч после инокуляции в среду для продуцирования. Добавление индуктора инициировало фазу индукции (экспрессии).

Партии 4-5 - После инокуляции в среду для продуцирования температуру постепенно снижали до 18°C к 6-му часу. Указанную температуру поддерживали в фазе индукции (экспрессии), которую инициировали 0,25 мМ IPTG через девять часов после инокуляции. Общая продолжительность получения партии составляла 33 (партия 8) или 48 (партия 9) часов.

Общее количество глицерина, внесенного в партию 4 в фазе индукции, составляло 35 г/л, а общее количество глицерина, внесенного в партию 5 в фазе индукции, составляло 40 г/л.

Культуральный бульон собирали путем центрифугирования при 9000 об/мин в течение 15 мин, и рекомбинантный лектин выделяли и очищали в соответствии с настоящим изобретением. Затем анализировали долю лектина с метионином в выделенном лектине.

Более 50% лектина, выделенного из партии 1, было представлено лектином с метионином. Указанный показатель снижался до 26% для партии 2, 16% для партии 3, 13% для партии 4 и 12% для партии 5.

Пример 11. Время удвоения.

Время удвоения *E.coli* определяли в различные моменты времени и при различных температурах в процессе ферментации образцов, то есть после инокуляции в среду для продуцирования. Результаты представлены в табл. 2. В указанном примере индуктор, согласно данному варианту реализации - IPTG, добавляли через 9 ч после инокуляции. Таким образом, в указанном примере фазу роста понимают как точки времени до истечения 9 ч, а фазу экспрессии понимают как точки времени во время и после добавления индуктора.

Таблица 2
Время удвоения *E. coli* при различных условиях ферментации

Температура и часы в логарифмическом масштабе	Время удвоения (минуты)
30°C (0–1 ч в логарифмическом масштабе) *	85
30°C (0,5–1 ч в логарифмическом масштабе) §	42
30°C –25°C (0–3 ч в логарифмическом масштабе) £	100
18°C До индукции (7–9 часов в логарифмическом масштабе)	103
18°C после индукции (от 9 часов в логарифмическом масштабе и далее)	145
18°C Среднее значение (7–11 часов в логарифмическом масштабе)	120

* Включает начальную лаг-фазу и экспоненциальную фазу;

§ экспоненциальная фаза;

£ среднее значение от 0 до 3 ч в логарифмическом масштабе.

Пример 12. Очищение рекомбинантного лектина.

В настоящем примере рекомбинантный лектин выделяют и очищают из культурального бульона, такого как полученный согласно примеру 10.

Культуральный бульон центрифугируют при 9000 об/мин в течение 15 мин при 15°C. Полученный осадок ресуспендируют в буфере для лизиса (25 мМ Tris, 1 мМ EDTA, pH 8,0). Клетки лизируют путем гомогенизации под высоким давлением 18 000 фунтов на квадратный дюйм. Лизат осветляют с использованием половолоконной мембраны с размером пор 0,1 мкм, предварительно уравновешенной буфером для лизиса. Проводят ряд хроматографических этапов для очищения рекомбинантного лектина из осветленного раствора белка.

Анионообменная хроматография: осветленный раствор белка загружают на колонку Cellufine Max Q-г, уравновешенную 25 мМ Tris, 1 мМ EDTA, pH 8,0, со связывающей способностью 60-80 мг/мл. После загрузки колонку промывают 2-3 объемами колонки уравновешивающего буфера. Далее колонку промывают уравновешивающим буфером, содержащим хлорид натрия, с проводимостью приблизительно 5 мСм/см. Элюирование связанного белка проводят с использованием 25 мМ Tris-буфера, 1 мМ EDTA, pH 8,0, содержащего хлорид натрия с проводимостью 18-20 мСм/см. Пик собирают целиком как единую фракцию, которая содержит интересующий белок вместе с некоторыми другими примесями.

Катионообменная хроматография: Элюат после анионообменной хроматографии подвергают катионообменной хроматографии с использованием колонки SP Sepharose FF. Значение pH элюата доводят до 4,5 с применением уксусной кислоты. Затем белок загружают на колонку SP Sepharose FF, уравновешенную 25 мМ натрий-ацетатным буфером, содержащим 1 мМ EDTA, pH 4,5 (буфер А), со связывающей емкостью смолы 40-50 мг/мл. После загрузки колонку промывают 2-3 объемами колонки уравновешивающего буфера. Затем колонку промывают в ступенчатом градиенте 20% буфером В (буфер В: буфер А + 0,5 М NaCl). Элюирование проводят, используя ступенчатый градиент 70% буфера В. Затем элюат немедленно разбавляют водой в соотношении 1:1 для предотвращения агрегации белка. Элюированный белок заменяют буфером 25 мМ Tris, pH 8,0, используя мембрану 3 кДа.

Анионообменная хроматография: после замены буфера и загрузки белка на смолу Source 30Q колонку уравновешивают 25 мМ Tris-буфером, pH 8,0, с последующей загрузкой раствора белка. После загрузки колонку промывают уравновешивающим буфером. Затем проводят элюирование, используя линейный градиент элюирующего буфера, содержащего 25 мМ Tris, 0,5 М NaCl, pH 8,0, в 15 объемах колонки. Затем в итоговом элюате заменяют буфер на TBS (50 мМ Tris-буфер, 150 мМ NaCl, pH 7,8). Проводят анализ чистоты и концентрации элюированного белка с помощью ВЭЖХ.

Краткое описание последовательностей**SEQ ID NO. 1:**

TYKITVRVYQTNPD AFFHPVEKTVWKYANGGTWITDDQHVLTMGGSGTSGTLRFHA
 DNGESFTATFGVHNYKRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYSQKNREEARERQLSNYQV
 KNAKGRNFQIVYTEAEGNDLHANLIIG

SEQ ID NO. 2:

TYKITVRVYQTNPD AFFHPVEKTVWKYANGGTWITDDQHVLTMGGSGTSGTLRFHA
 DNGESFTATFGVHNYKRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYSQKNREEARERQLSNYEV
 KNAKGRNFEIVYTEAEGNDLHANLIIG

SEQ ID NO. 3:

VYKITVRVYQTNPD AFFHPVEKTVWKYANGGTWSITDDQIIVLTMGGSGTSGTLRFHA
 DNGESFTATFGVHNYKRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYSQKNREEARERQLSNYQV
 KNAKGRNFQIVYTEAEGNDLHANLIIG

SEQ ID NO. 4:

VYKITVRVYQTNPD AFFHPVEKTVWKYADGGTWSITDDQHVLTMGGSGTSGTLRFHA
 DNGESFTATFGVHDYKRWCDIVTDLAADETGMVINQEYYSEKDREEARERQNSNYEVK
 DAKGRNFEIVYTEAEGNDLHADLIIG

SEQ ID NO:5:

ATGACCTATAAAAATTACCGTGCGCGTGTATCAGACCAACCCGGATGCCTTTTTCCAT
 CCGGTGGA AAAAACCCTGTGGA AATATGCGAATGGCGGTACCTGGACGATTACGGA
 TGATCAGCATGTGCTGACGATGGGTGGTAGCGGTACCAGCGGCACCCTGCGTTTTCA
 CGCAGATAATGGCGAAAGCTTCACCGCCACCTTTGGTGTGCATAATTATAAACGCTG
 GTGTGATATTGTGACCAACCTGGCAGCGGATGAAACCGGCATGGTTATTAATCAGC
 AGTATTATAGTCAGAAAACCGCGAAGAAGCGCGTGAACGCCAGCTGAGTAACTAT
 CAGGTGAAA AATGCGAAAGGCCGTA ACTTCCAGATTGTTATACCGAAGCGGAAGG
 CAATGATCTGCATGCGAACCTGATTATCGGC

Аспектами настоящего изобретения является следующее.

1. Способ получения рекомбинантного белка лектина, указанный способ включает экспрессию рекомбинантного белка лектина, кодируемого рекомбинантным геном лектина в клетке-хозяине в культуре, при этом экспрессию проводят в таких условиях для клетки, что время удвоения указанной клетки составляет не более 160 мин.
2. Способ по 1, отличающийся тем, что экспрессию проводят в таких условиях для клетки, что время удвоения указанной клетки составляет по меньшей мере 100 мин.
3. Способ по 1 или 2, отличающийся тем, что экспрессию проводят при температуре не более 22°C.
4. Способ по любому из 1-3, отличающийся тем, что экспрессию проводят при температуре по меньшей мере 15°C.
5. Способ по любому из 1-4, включающий культивирование клетки-хозяина, который включает фазу роста, во время которой клетки-хозяева культивируют до экспрессии белка; и фазу экспрессии, во время которой осуществляют экспрессию белка, причем указанную фазу роста проводят при температуре, превышающей температуру, при которой осуществляют фазу экспрессии.
6. Способ по 5, отличающийся тем, что фазу роста проводят при температуре по меньшей мере 25°C и не более 40°C.
7. Способ по 5 или 6, отличающийся тем, что температуру снижают при переходе от фазы роста к фазе экспрессии в течение периода, составляющего по меньшей мере 4 и не более 7 часов.
8. Способ по любому из 1-7, отличающийся тем, что экспрессию рекомбинантного белка лектина инициируют добавлением индуктора к культуре.
9. Способ по 8, отличающийся тем, что указанный индуктор добавляют в культуру в концентрации по меньшей мере 0,1 мМ и не более 0,5 мМ.
10. Способ по 8 или 9, отличающийся тем, что указанный индуктор содержит IPTG.
11. Способ по любому из 1-10, отличающийся тем, что экспрессию проводят в течение по меньшей мере 10 ч.
12. Способ по любому из 1-11, где источник углерода добавляют в культуру со скоростью не более 2 г л⁻¹ч⁻¹ и/или источник азота добавляют в культуру со скоростью не более 1,5 г л⁻¹ч⁻¹ во время экспрессии.

13. Способ по 12, отличающийся тем, что источник углерода добавляют в культуру со скоростью, составляющей по меньшей мере $0,5 \text{ г л}^{-1}\text{ч}^{-1}$.

14. Способ по 12 или 13, отличающийся тем, что источник азота добавляют в культуру со скоростью, составляющей по меньшей мере $0,4 \text{ г л}^{-1}\text{ч}^{-1}$.

15. Способ по любому из пп.12-14, отличающийся тем, что источник углерода включает глицерин или состоит из глицерина.

16. Способ по любому из 1-15, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный белок лектин содержит последовательность аминокислот, выбранную из:

i) SEQ ID NO:1;

ii) SEQ ID NO:3;

iii) SEQ ID NO:4; или

iv) последовательности аминокислот, по меньшей мере на 60% гомологичную i), ii) или iii).

17. Способ по 16, отличающийся тем, что последовательность аминокислот iv) представляет собой последовательность аминокислот, по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95% или 99% гомологичную i), ii) или iii).

18. Способ по любому из 1-17, отличающийся тем, что указанный способ дополнительно включает этап выделения неочищенного рекомбинантного белка лектина после этапа экспрессии рекомбинантного белка лектина.

19. Способ по 18, отличающийся тем, что указанный способ дополнительно включает очищение неочищенного рекомбинантного белка лектина.

20. Способ по 19, отличающийся тем, что очищение указанного неочищенного белка включает, по меньшей мере, один этап хроматографии.

21. Способ по 20, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один этап хроматографии включает анионообменную хроматографию и/или катионообменную хроматографию.

22. Способ по 20 или 21, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один этап хроматографии включает хроматографию гидрофобного взаимодействия.

23. Способ по любому из 19-22, отличающийся тем, что очищение неочищенного рекомбинантного белка лектина включает этап фильтрации.

24. Способ по любому из 1-23, отличающийся тем, что клеткой-хозяином является *Escherichia coli*.

25. Способ по любому из 1-24, отличающийся тем, что указанная клетка-хозяин содержит экспрессионную конструкцию, содержащую рекомбинантный ген лектина.

26. Способ по любому из 1-25, отличающийся тем, что культура клеток-хозяев имеет объем по меньшей мере 10 л.

27. Способ по 26, отличающийся тем, что экспрессию проводят в промышленном ферментере.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения рекомбинантного белка лектина, который включает экспрессию рекомбинантного белка лектина, кодируемого рекомбинантным геном лектина, в культуре клетке-хозяина, при этом:

а) указанная клетка-хозяин представляет собой рекомбинантную клетку *E.coli*, а экспрессию осуществляют в условиях, при которых время удвоения указанной клетки составляет от 100 до 160 мин;

б) экспрессию проводят при температуре по меньшей мере от 15 и до не более чем 22°C , и при этом отношение углерода к азоту во время указанной фазы экспрессии поддерживают на уровне от 3:1 до 6:1, а рекомбинантный белок лектин выбран из:

i) SEQ ID NO:1;

ii) SEQ ID NO:3;

iii) SEQ ID NO:4 или

iv) последовательности аминокислот, по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 97, 98 или 99% гомологичной i), ii) или iii);

с) фазу экспрессии (т.е. индукции) проводят в течение по меньшей мере 10 ч, а оптическая плотность культуры составляет не менее 25 и не более 40;

д) в культуру добавляют источник углерода из расчета от $0,5$ до $2 \text{ г л}^{-1}\text{ч}^{-1}$;

е) в культуру добавляют источник азота из расчета от $0,4$ до $1,5 \text{ г л}^{-1}\text{ч}^{-1}$;

ф) концентрация индуктора составляет по меньшей мере $0,1$ и не более $0,5 \text{ мМ}$, причем указанным индуктором является IPTG (изопрропил-тиогаалактопиранозид);

г) очистка неочищенного рекомбинантного белка лектина включает по меньшей мере один хроматографический этап.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что культура клеток-хозяев имеет объем по меньшей мере 10 л.

3. Способ по любому из пп.1, 2, отличающийся тем, что культивирование клеток-хозяев включает фазу роста, во время которой указанную клетку-хозяина культивируют до экспрессии белка; и фазу экспрессии, во время которой осуществляют экспрессию белка, причем указанную фазу роста проводят при

температуре, превышающей температуру, при которой проводят указанную фазу экспрессии, и причем указанную температуру снижают при переходе от указанной фазы роста к указанной фазе экспрессии в течение периода, составляющего по меньшей мере 4 и не более 7 ч.

4. Способ по любому из пп.1-3, при этом указанный способ дополнительно включает:

а) необязательно, клонирование рекомбинантного гена лектина в экспрессионный вектор и инсерцию указанного экспрессионного вектора в клетку-хозяина;

б) культивирование указанной клетки-хозяина в подходящей среде, при этом указанное культивирование включает фазу роста, которую проводят при температуре от 25 до 40°C, и фазу экспрессии, во время которой экспрессируется указанный рекомбинантный белок лектина, кодируемый указанным рекомбинантным геном лектина;

в) необязательно, выделение указанного рекомбинантного белка лектина, экспрессированного на этапе (б), с получением неочищенного рекомбинантного белка лектина путем центрифугирования с последующим разрушением клеточной поверхности; и

д) необязательно, очищение указанного неочищенного рекомбинантного белка лектина с получением изолята рекомбинантного белка лектина.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что источник углерода представляет собой глюкозу или глицерин, а источник азота представляет собой триптон, пептон или дрожжевой экстракт.

6. Способ по п.4, отличающийся тем, что очищение указанного неочищенного рекомбинантного белка лектина на этапе "д" включает по меньшей мере один хроматографический этап, выбранный из анионообменной хроматографии, катионообменной хроматографии или хроматографии гидрофобного взаимодействия.

7. Способ по п.4, отличающийся тем, что очищение указанного неочищенного рекомбинантного белка лектина на этапе "д" включает этап фильтрации.

8. Способ по любому из пп.1-4, дополнительно включающий очищение неочищенного рекомбинантного белка лектина способом, включающим:

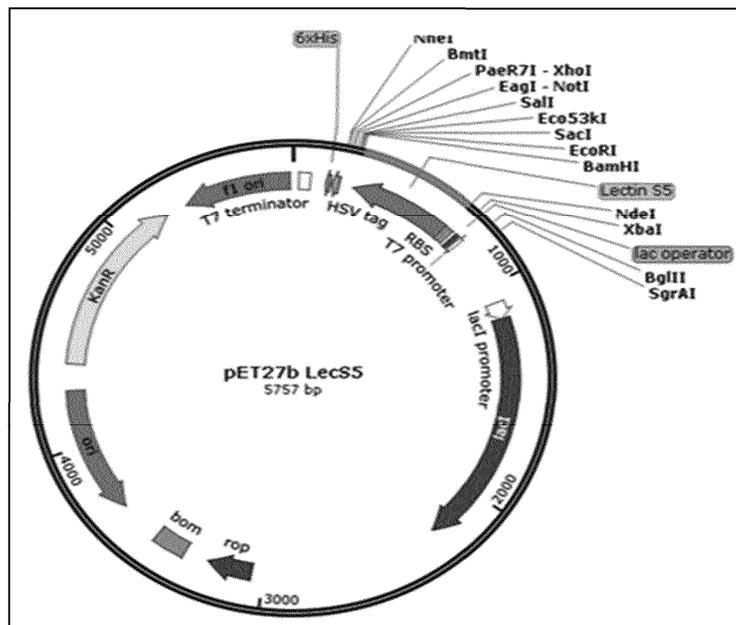
а) начальное очищение неочищенного рекомбинантного белка лектина путем анионообменной хроматографии с получением первого очищенного элюата;

б) необязательное очищение указанного первого очищенного элюата хроматографией с гидрофобным взаимодействием с получением второго очищенного элюата;

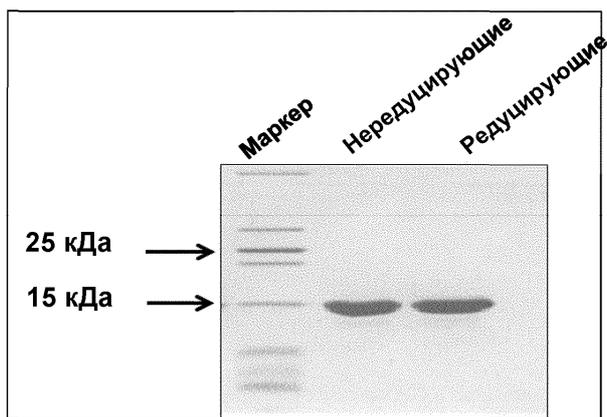
в) необязательное очищение указанного второго очищенного элюата путем катионообменной хроматографии с получением третьего очищенного элюата;

д) дополнительное очищение указанного первого, второго или третьего очищенного элюата путем анионообменной хроматографии с получением четвертого очищенного элюата и

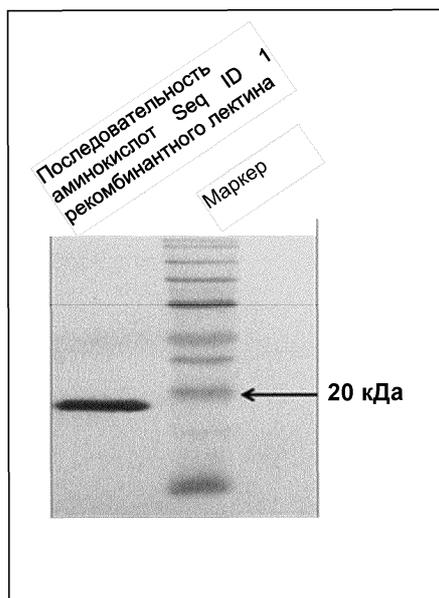
е) замену буфера указанного четвертого очищенного элюата путем диафильтрации с получением очищенного изолята рекомбинантного белка лектина.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

