(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202392735 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.27

(22) Дата подачи заявки
2022.03.31

(51) Int. Cl. ***C07K 14/60*** (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)
C07K 14/635 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(54) КОНСТРУКЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ПОЛИПЕПТИДОВ

(31) **202141014741**
(32) **2021.03.31**
(33) **IN**
(86) **PCT/IN2022/050327**
(87) **WO 2022/208554 2022.10.06**
(88) **2022.11.03**

(71) Заявитель:
БАЙОЛОДЖИКАЛ И ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:
Регатти Паван Редди, Матур Рамеш Венкат, Мантена Нарендер Дев, Датла Махима (IN)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к области экспрессии белков. Оно относится к экспрессирующим конструкциям и способам для повышенной экспрессии рекомбинантных белков. Более конкретно, оно относится к конструкциям и способам для повышенной экспрессии лирапептида в рекомбинантной клетке-хозяине.

202392735 A1

202392735 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579387EA/55

КОНСТРУКЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ПОЛИПЕПТИДОВ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент Индии № 202141014741, поданной 31 марта 2021, полное содержание которой включено, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к области экспрессии белков. Более конкретно, оно относится к конструкциям и способам для повышенной экспрессии рекомбинантных полипептидов и белков.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Пептидные терапевтические средства играют важную роль в медицинской практике с внедрения терапии инсулинов в 1920-х гг. В настоящее время на рынке существует более 60 одобренных пептидных лекарственных средств, и ожидают, что их количество будет значительно расти.

Коммерчески пригодные белки и пептиды можно получать синтетически или выделять из природных источников. Однако, эти способы зачастую дорогостоящи, занимают много времени и отличаются ограниченной производственной мощностью. Предпочтительным способом получения белков и пептидов является ферментация рекомбинантно сконструированных организмов, сконструированных для гиперэкспрессии интересующего белка или пептида.

Однако рекомбинантная экспрессия пептидов имеет ряд недостатков, которые необходимо преодолеть, чтобы она стала экономически эффективным средством производства. Недостатки, как правило, относятся к низким уровням экспрессии рекомбинантного белка или деструкции экспрессируемого полипептида протеолитическими ферментами, содержащимися в клетках.

Короткие пептиды трудно получать рекомбинантно из-за их склонности к деградации в клеточном окружении под действием протеаз клетки-хозяина. Таким образом, выделенный продукт может представлять собой гетерогенную смесь видов желаемого полипептида, имеющих разные длины аминокислотных цепей.

Кроме того, очистка может быть затруднена, что приводит к плохим выходам в зависимости от природы интересующего белка или пептида. Небольшие пептиды экспрессируют посредством слияния с крупными слитыми метками для преодоления указанной выше проблемы. Кроме того, в существующих способах используют крупные слитые метки для экспрессии слитых белков, что снижает потенциальный выход интересующего пептида. Это осложняет ситуации, когда интересующий белок или пептид имеет небольшой размер.

Предпочтительно использовать слитые метки небольшого размера для

максимизации выхода интересующего пептида в таких ситуациях. Но небольшие метки редко действуют так же хорошо, как крупные метки.

В прошлом эти проблемы решали получением слитых белков, содержащих желаемый полипептид, слитый с полипептидом-носителем. Экспрессия желаемого полипептида в виде слитого белка в клетке зачастую будет приводить к защите желаемого полипептида от деструктивных ферментов и позволять слитому белку быть очищенным с высоким выходом. Затем слитый белок обрабатывают для отщепления желаемого полипептида от полипептида-носителя и выделяют желаемый полипептид.

В патенте США № 7572884 описан способ получения рекомбинантного лирапептида, предшественника лираглутида, в *Saccharomyces cerevisiae*.

В патенте США № 7662913 описано применение пептидных меток на основе цистатина, используемых для получения нерастворимых слитые пептиды.

В патенте США № 8796431 описаны способы эффективного получения пептидов, включающих GLP1, с использованием кетостероид-изомеразы (KSI) в качестве партнера по тельцам включения.

В WO 2003/100021 A1 описана экспрессирующая кассета для повышенной продукции гетерологичных пептидов/белков, состоящая из промотора, последовательности инициации трансляции, партнера по слиянию телец включения и расщепляемого линкера, функционально связанного с гетерологичным белком.

В WO 2017/021819 A1 описан способ получения пептидов или белков или их производных посредством экспрессии синтетического олигонуклеотида, кодирующего желаемый белок или пептид в прокариотической клетке в виде слитой конструкции убиквитина.

В IN 201741024763 A описан способ получения лираглутида посредством экспрессии синтетического олигонуклеотида, кодирующего лирапептид, функционально связанный с олигонуклеотидной последовательностью сигнального пептида в дрожжевой клетке.

Yang Liu et al. (Biotechnol Lett 36, 1675-1680 (2014)) описали стратегия экспрессии и очистки функционального пептида GLP-1 с использованием слитой метки глутатион-S-трансферазы (GST) 23 кДа с участком расщепления энтерокиназой в месте слияния в *E. coli*.

Zhao et al. (Microb Cell Fact 15, 136 (2016)) исследовали рекомбинантную экспрессию расщепляемой самособирающейся метки и интеин-опосредованное расщепление пептидов размером от среднего до крупного, включая GLP1, в *Escherichia coli*.

Zhao et al. (Microb Cell Fact 18, 91 (2019)) исследовали использованием самособирающихся амфипатических пептидов (SAP) в качестве экспрессионной метки для повышения продукции рекомбинантного фермента.

Ki et al. (Appl MicrobiolBiotechnol. 2020 Mar;104(6):2411-2425) представили подробный обзор слитых меток, повышающих экспрессию гетерологичных белков в *E. coli*.

Глюкагон-подобный пептид-1 (GLP-1) является пептидным гормоном длиной 31 аминокислота, являющимся результатом тканеспецифического посттрансляционного

процессинга пептида проглюкагона. он продуцируется и секретируется кишечными энтероэндокринными L-клетками и некоторыми нейронами в ядре одиночного пути в стволе головного мозга после потребления пищи. Лираглутид является производным инкретина человека (метаболического гормона), глюкагон-подобного пептида-1 (GLP-1), используемого в качестве агониста рецептора глюкагон-подобного пептида-1 длительного действия, связывающегося с теми же рецепторами, что и эндогенный метаболический гормон GLP-1, стимулирующий секрецию инсулина. Таким образом, существует потребность в новых стратегиях экспрессии для повышения экспрессии рекомбинантных белков в организме-хозяине. Авторы настоящего изобретения в своем стремлении повысить экспрессию рекомбинантных терапевтических пептидов в несколько раз разработали экспрессирующие конструкции, делающие возможной продукцию рекомбинантных белков с высоким выходом.

ЦЕЛЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Главной целью изобретения является экспрессирующая кассета для продукции интересующего белка с высоким выходом.

Другой целью изобретения является способ повышенной экспрессии интересующего белка.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к экспрессирующим конструкциям, векторам и рекомбинантным клеткам-хозяевам для повышенной экспрессии и эффективной продукции биологически активных пептидов, таких как лирапептид.

В варианте осуществления настоящее изобретение относится к экспрессирующей кассете для экспрессии интересующего белка, содержащей:

a) полинуклеотид, кодирующий полипептид лидерной последовательности T7, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

b) полинуклеотид, кодирующий полипептид экспрессионной метки, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-10;

c) полинуклеотид, кодирующий расщепляемый пептидный линкер; и

d) полинуклеотид, кодирующий интересующий белок,

где указанные полинуклеотидные последовательности экспрессирующей кассеты функционально связаны с промотором.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к слитому полипептиду, состоящему из:

a) полипептида лидерной последовательности T7, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

b) полипептида экспрессионной метки, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-10; и

c) расщепляемого пептидного линкера;

слитого с амино-концом интересующего белка для получения слитого полипептида.

Настоящее изобретение относится к экспрессирующей кассете для экспрессии лирапептида, содержащей:

a) полинуклеотид, кодирующий полипептид лидерной последовательности T7, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

b) полинуклеотид, кодирующий полипептид экспрессионной метки, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-10;

c) полинуклеотид, кодирующий расщепляемый линкер; и

d) полинуклеотид, кодирующий лирапептид, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, или ее функциональный вариант,

где указанные полинуклеотидные последовательности экспрессирующей кассеты функционально связаны с промотором.

В варианте осуществления изобретение относится к слитому полипептиду, состоящему из:

a) полипептида лидерной последовательности T7, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

b) полипептида экспрессионной метки, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящий из SEQ ID NO: 2-10; и

c) расщепляемого линкерного пептида;

слитого с амино-концом лирапептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или ее функциональный вариант, для получения слитого полипептида.

В варианте осуществления настоящего изобретения уровень экспрессии интересующего белка повышают по меньшей мере на 85%.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1A: Схема экспрессирующей кассеты без слияния с N-концевой экспрессионной меткой

Фигура 1B: Схема экспрессирующих кассет с N-концевыми экспрессионными метками (LP2-LP10) вместе с лидерной последовательностью T7.

Фигура 1C: Схема экспрессирующей кассеты с N-концевой экспрессионной меткой (LP2) без лидерной последовательности T7.

Фигура 1D: Схема экспрессирующей кассеты с N-концевой экспрессионной меткой (LP8) без лидерной последовательности T7.

Фигура 2A: Схема экспрессирующего вектора LP1 (без какой-либо N-концевой экспрессионной метки)

Фигура 2B: Схема экспрессирующего вектора с лидерной последовательностью T7 и N-концевой экспрессионой меткой (LP-2).

Фигура 2C: Схема экспрессирующего вектора без лидерной последовательности T7 и с N-концевой экспрессионной меткой (LP-2).

Фигура 2D: Схема экспрессирующего вектора с лидерной последовательностью T7

и N-концевой экспрессионной меткой (LP-8).

Фигура 2E: Схема экспрессирующего вектора без лидерной последовательности T7 и с N-концевой экспрессионной меткой (LP-8).

Фигура 3A: Клоны с разной последовательностью экспрессионной метки, тестируемые на экспрессию лирапептида.

Фигура 3B: Таблица, в которой приведена молекулярная масса каждой кассеты и процент меченого лирапептида на дорожку, на основе денситометрического анализа.

Фигура 4A: Сравнительная экспрессия лирапептида в присутствии и отсутствие лидерной последовательности T7 с экспрессионной меткой LP-2 в экспрессирующей кассете.

Фигура 4B: Денситометрический анализ экспрессии лирапептида в присутствии и отсутствие лидерной последовательности T7 с экспрессионной меткой LP-2 в экспрессирующей кассете.

Фигура 4C: Процент повышения экспрессии лирапептида (LP2) с лидерной последовательностью T7 по сравнению с отсутствием лидерной последовательности T7.

Фигура 5A: Сравнительная экспрессия лирапептида в присутствии и отсутствие лидерной последовательности T7 с экспрессионной меткой LP-8 в экспрессирующей кассете.

Фигура 5B: Денситометрический анализ экспрессии лирапептида в присутствии и отсутствие лидерной последовательности T7 с экспрессионной меткой LP-8 в экспрессирующей кассете.

Фигура 5C: Процент повышения экспрессии лирапептида (LP8) с лидерной последовательностью T7 по сравнению с отсутствием лидерной последовательности T7.

Фигура 6A: Очистка лирапептида, содержащего N-концевое слияние, с использованием хроматографии Ni-NTA.

Фигура 6B: Очистка лирапептида с использованием обращенно-фазовой хроматографии

Фигура 7: Экспрессия лирапептида в растворимых и нерастворимых фракциях.

Фигура 8: Клоны с разной последовательностью экспрессионной метки, тестируемые на экспрессию терипаратида.

ОПИСАНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 (лидерная последовательность T7)

MASMTGGQQMGR

SEQ ID NO: 2 (аминокислотная последовательность экспрессионной метки LP-2)

GSGQGQAQYLAASLVVFTNYSGD

SEQ ID NO: 3 (аминокислотная последовательность экспрессионной метки LP-3)

MNNNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTPRRASA

SEQ ID NO: 4 (аминокислотная последовательность экспрессионной метки LP-4)

MVLTKKKLQDLVREVAPNEQLDEDVEEMLLQIADDFIESVVTAACQLARHRKSS TLEVKDVQLHLERQWNMWI

SEQ ID NO: 5 (аминокислотная последовательность экспрессионной метки LP-5)

SRRPRQLQQRQ

SEQ ID NO: 6 (аминокислотная последовательность экспрессионной метки LP-6)

SEEPEQLQQEQSRRPRQLQQRQ

SEQ ID NO: 7 (аминокислотная последовательность экспрессионной метки LP-7)

AEEEEILLEVSLVFKVKEFAPDAPLFTGPAY

SEQ ID NO: 8 (аминокислотная последовательность экспрессионной метки LP-8)

SAGDLKFVKVVA

SEQ ID NO: 9 (аминокислотная последовательность экспрессионной метки LP-9)

KTKQLMSFAPSHN

SEQ ID NO: 10 (аминокислотная последовательность экспрессионной метки LP-10)

MHTPEHITAVVQRFVAALNAGDLDGIVALFADDATVEDPVGSEPRSGTAAIREF YANSLKLPLAVELTQEVRAVANEAAFAFTVSFEYQGRKTVVAPIDHFRFNGAGKVVSIR ALFGEKNIHACQ

SEQ ID NO: 11 (аминокислотная последовательность участка расщепления TEV)

ENLYFQ

SEQ ID NO: 12 (аминокислотная последовательность лирапептида)

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRG

SEQ ID NO: 13 (экспрессирующая кассета LP1) состоит из лидерной последовательности T7+6XHis+участка распознавания TEV+лирапептида)

MASMTGGQQMGRHHHHHHENLYFQHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVR GRG

SEQ ID NO: 14 (экспрессирующая кассета LP2) состоит из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP2+участка распознавания TEV+лирапептида)

MASMTGGQQMGRHHHHHHGSGQGQAQYLAASLVVFTNYSGDENLYFQHAEG TFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRG

SEQ ID NO: 15 (экспрессирующая кассета LP3) состоит из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP3+участка распознавания TEV+лирапептида)

MASMTGGQQMGRHHHHHHMNNNDLFQASRRRFLAQLGGLTVAGMLGPSLLTP RRASAENLYFQHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRG

SEQ ID NO: 16 (экспрессирующая кассета LP4) состоит из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP4+участка распознавания TEV+лирапептида)

MASMTGGQQMGRHHHHHHMVLTKKKLQDLVREVAPNEQLDEDVEEMLLQIA DDFIESVVTAACQLARHRKSSTLEVKDVQLHLERQWNMWIENLYFQHAEGTFTSDVSS YLEGQAAKEFIAWLVRGRG

SEQ ID NO: 17 (экспрессирующая кассета LP5) состоит из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP5+участка распознавания

TEV+лирапептида)

MASMTGGQQMGRHHHHHHSRRPRQLQQRQENLYFQHAEGTFTSDVSSYLEGQ AAKEFIAWLVRGRG

SEQ ID NO: 18 (экспрессирующая кассета LP6) состоит из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP6+участка распознавания TEV+лирапептида)

MASMTGGQQMGRHHHHHHSEEPEQLQQEQSRRPRQLQQRQENLYFQHAEGTF TSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRG

SEQ ID NO: 19 (экспрессирующая кассета LP7) состоит из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP7+участка распознавания TEV+лирапептида)

MASMTGGQQMGRHHHHHHAEEEEILLEVSLVFKVKEFAPDAPLFTGPAYENLY FQHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRGRG

SEQ ID NO: 20 (экспрессирующая кассета LP8) состоит из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP8+участка распознавания TEV+лирапептида)

MASMTGGQQMGRHHHHHHSAGDLKFVKVVAENLYFQHAEGTFTSDVSSYLEG QAAKEFIAWLVRGRG

SEQ ID NO: 21 (экспрессирующая кассета LP9) состоит из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP9+участка распознавания TEV+лирапептида)

MASMTGGQQMGRHHHHHHKTKQLMSFAPSHNENLYFQHAEGTFTSDVSSYLE GQAAKEFIAWLVRGRG

SEQ ID NO: 22 (экспрессирующая кассета LP10) состоит из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP10+участка распознавания TEV+лирапептида)

MASMTGGQQMGRHHHHHHMHTPEHITAVVQRFVAALNAGDLDGIVALFADDA TVEDPVGSEPRSGTAAIREFYANSLKLPLAVELTQEVRAVANEAAFAFTVSFEYQGRKT VVAPIDHFRFNGAGKVVSIRALFGEKNIHACQENLYFQHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKE FIAWLVRGRG

SEQ ID NO: 23 (экспрессирующая кассета LP11) состоит из лидерной последовательности T7+6XArg+участка распознавания TEV+лирапептида)

MASMTGGQQMGRRRRRRRENLYFQHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVRG RG

SEQ ID NO: 24 (экспрессирующая кассета LP2 без лидерной последовательности T7) состоит из 6XHis+экспрессионной метки LP2+участка распознавания TEV+лирапептида)

MHHHHHHGSGQGQAQYLAASLVVFTNYSGDENLYFQHAEGTFTSDVSSYLEGQ AAKEFIAWLVRGRG

SEQ ID NO: 25 (экспрессирующая кассета LP8 без лидерной последовательности T7) состоит из 6XHis+экспрессионной метки LP8+участка распознавания TEV+лирапептида)

MHHHHHHSAGDLKFVKVVAENLYFQHAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVR GRG

SEQ ID NO:26 (последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SEQ ID NO: 2 - экспрессионную метку LP-2)

GGTAGCGGTCAGGGTCAAGCACAGTATCTGGCAGCAAGCCTGGTTGTTTTTA CCAATTATAGCGGTGAT

SEQ ID NO: 27 (последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SEQ ID NO: 3 - экспрессионную метку LP-3)

ATGAATAACAACGACCTGTTTCAGGCAAGCCGTCGTCGTTTTCTGGCACAGTT AGGTGGTCTGACCGTTGCAGGTATGCTGGGTCCGAGCCTGCTGACACCGCGTCGTGC AAGCGCA

SEQ ID NO: 28 (последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SEQ ID NO: 4 - экспрессионную метку LP-4)

ATGGTTCTGACCAAAAAAAAGCTGCAGGATCTGGTTCGTGAAGTTGCACCGA ATGAACAGCTGGATGAAGATGTTGAAGAAATGCTGCTGCAGATTGCCGATGATTTT ATTGAAAGCGTTGTTACCGCAGCATGTCAGCTGGCACGTCATCGTAAAAGCAGCAC CCTGGAAGTTAAAGATGTTCAGCTGCATCTGGAACGTCAGTGGAATATGTGGATT

SEQ ID NO: 29 (последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SEQ ID NO: 5 - экспрессионную метку LP-5)

AGCCGTCGTCCGCGTCAGCTGCAGCAGCGTCAA

SEQ ID NO: 30 (последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SEQ ID NO: 6 - экспрессионную метку LP-6)

AGCGAAGAACCGGAACAGCTGCAGCAAGAACAGAGCCGTCGTCCGCGTCAG CTGCAACAGCGTCAA

SEQ ID NO: 31 (последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SEQ ID NO: 7 - экспрессионную метку LP-7)

GCCGAAGAAGAAGAAATTCTGCTGGAAGTTAGCCTGGTGTTTAAGGTGAAAGAATT TGCACCGGATGCACCGCTGTTTACCGGTCCGGCATAT

SEQ ID NO: 32 (последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SEQ ID NO: 8 - экспрессионную метку LP-8)

TCAGCCGGTGATCTGAAATTTGTTAAAGTTGTTGCC

SEQ ID NO: 33 (последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SEQ ID NO: 9 - экспрессионную метку LP-9)

AAAACCAAACAGCTGATGAGCTTTGCACCGAGCCATAAT

SEQ ID NO: 34 (последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SEQ ID NO: 10 - экспрессионную метку LP-10)

ATGCATACACCGGAACATATTACCGCAGTTGTTCAGCGTTTTGTTGCAGCACT GAATGCCGGTGATCTGGATGGTATTGTTGCACTGTTTGCAGATGATGCAACCGTTGA AGATCCGGTTGGTAGCGAACCGCGTAGCGGCACCGCAGCAATTCGTGAATTTTATGC AAATAGCCTGAAACTGCCGCTGGCCGTTGAACTGACCCAAGAAGTTCGCGCAGTTG

CAAATGAAGCAGCATTTGCATTTACCGTGAGCTTTGAATATCAGGGTCGTAAAACCG
TTGTTGCACCGATTGATCATTTTCGTTTTAATGGTGCCGGTAAAGTTGTTAGCATTCG
TGCCCTGTTTGGCGAAAAAAACATTCATGCATGTCAA

SEQ ID NO: 35 (экспрессирующая кассета, кодирующая SEQ ID NO: 13 - последовательность нуклеиновой кислоты LP1, состоящая из лидерной последовательности T7+6XHis+участка распознавания TEV+лирапептида)

ATGGCAAGCATGACCGGTGGTCAGCAGATGGGTCGTCATCATCATCATCACC
ATGAAAACCTGTATTTTCAGCATGCAGAAGGCACCTTTACCTCAGATGTTAGCAGCT
ATCTGGAAGGTCAGGCAGCAAAAGAATTTATTGCATGGCTGGTTCGTGGTCGTGGTT
AA

SEQ ID NO: 36 (экспрессирующая кассета, кодирующая SEQ ID NO: 14 - последовательность нуклеиновой кислоты LP2, состоящая из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP2+участка распознавания TEV+лирапептида)

ATGGCAAGCATGACCGGTGGTCAGCAGATGGGTCGTCATCATCACCATCATC
ATGGTAGCGGTCAGGGTCAAGCACAGTATCTGGCAGCAAGCCTGGTTGTTTTTACCA
ATTATAGCGGTGATGAGAACCTGTATTTTCAGCATGCAGAAGGCACCTTTACCTCAG
ATGTTAGCAGCTATCTGGAAGGTCAGGCAGCAAAAGAATTTATTGCATGGCTGGTTC
GTGGTCGTGGTTAA

SEQ ID NO: 37 (экспрессирующая кассета, кодирующая SEQ ID NO: 15 - последовательность нуклеиновой кислоты LP3, состоящая из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP3+участка распознавания TEV+лирапептида)

ATGGCAAGCATGACCGGTGGTCAGCAGATGGGTCGTCATCATCACCATCATC
ATATGAATAACAACGACCTGTTTCAGGCAAGCCGTCGTCGTTTTCTGGCACAGTTAG
GTGGTCTGACCGTTGCAGGTATGCTGGGTCCGAGCCTGCTGACACCGCGTCGTGCAA
GCGCAGAAAATCTGTATTTTCAGCATGCAGAAGGCACCTTTACCTCAGATGTTAGCA
GCTATCTGGAAGGTCAGGCAGCAAAAGAATTTATTGCATGGCTGGTTCGTGGTCGTG
GTTAA

SEQ ID NO: 38 (экспрессирующая кассета, кодирующая SEQ ID NO: 16 - последовательность нуклеиновой кислоты LP4, состоящая из лидерная последовательность T7+6XHis+экспрессионной метки LP4+участка распознавания TEV+лирапептида)

ATGGCAAGCATGACCGGTGGTCAGCAGATGGGTCGTCATCATCACCATCATC
ATATGGTTCTGACCAAAAAAAAGCTGCAGGATCTGGTTCGTGAAGTTGCACCGAAT
GAACAGCTGGATGAAGATGTTGAAGAAATGCTGCTGCAGATTGCCGATGATTTTATT
GAAAGCGTTGTTACCGCAGCATGTCAGCTGGCACGTCATCGTAAAAGCAGCACCCT
GGAAGTTAAAGATGTTCAGCTGCATCTGGAACGTCAGTGGAATATGTGGATTGAAA
ACCTGTATTTTCAGCATGCAGAAGGCACCTTTACCTCAGATGTTAGCAGTTATCTGG
AAGGCCAGGCAGCAAAAGAATTTATTGCATGGCTGGTGCGTGGTCGTGGTTAA

SEQ ID NO: 39 (экспрессирующая кассета, кодирующая SEQ ID NO: 17 - последовательность нуклеиновой кислоты LP5, состоящая из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP5+участка распознавания TEV+лирапептида)

ATGGCAAGCATGACCGGTGGTCAGCAGATGGGTCGTCATCATCACCATCATC
ATAGCCGTCGTCCGCGTCAGCTGCAGCAGCGTCAAGAAAATCTGTATTTTCAGCATG
CAGAAGGCACCTTTACCTCAGATGTTAGCAGCTATCTGGAAGGTCAGGCAGCAAAA
GAATTTATTGCATGGCTGGTTCGTGGTCGTGGTTAA

SEQ ID NO: 40 (экспрессирующая кассета, кодирующая SEQ ID NO: 18 - последовательность нуклеиновой кислоты LP6, состоящая из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP6+участка распознавания TEV+лирапептида)

ATGGCAAGCATGACCGGTGGTCAGCAGATGGGTCGTCATCATCACCATCATC
ATAGCGAAGAACCGGAACAGCTGCAGCAAGAACAGAGCCGTCGTCCGCGTCAGCTG
CAACAGCGTCAAGAAAATCTGTATTTTCAGCATGCAGAAGGCACCTTTACCTCAGAT
GTTAGCAGCTATCTGGAAGGTCAGGCAGCAAAAGAATTTATTGCATGGCTGGTTCGT
GGTCGTGGTTAA

SEQ ID NO: 41 (экспрессирующая кассета, кодирующая SEQ ID NO: 19 - последовательность нуклеиновой кислоты LP7, состоящая из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP7+участка распознавания TEV+лирапептида)

ATGGCAAGCATGACCGGTGGTCAGCAGATGGGTCGTCATCATCACCATCATC
ATGCCGAAGAAGAAGAAATTCTGCTGGAAGTTAGCCTGGTGTTTAAGGTGAAAGAA
TTTGCACCGGATGCACCGCTGTTTACCGGTCCGGCATATGAAAATCTGTATTTTCAG
CATGCAGAAGGCACCTTTACCTCAGATGTTAGCAGCTATCTGGAAGGTCAGGCAGC
AAAAGAATTTATTGCATGGCTGGTTCGTGGTCGTGGTTAA

SEQ ID NO: 42 (экспрессирующая кассета, кодирующая SEQ ID NO: 20 - последовательность нуклеиновой кислоты LP8, состоящая из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP8+участка распознавания TEV+лирапептида)

ATGGCAAGCATGACCGGTGGTCAGCAGATGGGTCGTCATCATCACCATCATC
ATTCAGCCGGTGATCTGAAATTTGTTAAAGTTGTTGCCGAGAACCTGTATTTTCAGC
ATGCAGAAGGCACCTTTACCTCAGATGTTAGCAGCTATCTGGAAGGTCAGGCAGCA
AAAGAATTTATTGCATGGCTGGTTCGTGGTCGTGGTTAA

SEQ ID NO: 43 (экспрессирующая кассета, кодирующая SEQ ID NO: 21 - последовательность нуклеиновой кислоты LP9, состоящая из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP9+участка распознавания TEV+лирапептида)

ATGGCAAGCATGACCGGTGGTCAGCAGATGGGTCGTCATCATCACCATCATC
ATAAAACCAAACAGCTGATGAGCTTTGCACCGAGCCATAATGAAAATCTGTATTTTC
AGCATGCCGAAGGCACCTTTACCAGTGATGTTAGCAGCTATCTGGAAGGTCAGGCA
GCAAAAGAATTTATTGCATGGCTGGTTCGTGGTCGTGGTTAA

SEQ ID NO: 44 (экспрессирующая кассета, кодирующая SEQ ID NO: 22 - последовательность нуклеиновой кислоты LP10) состоит из лидерной последовательности T7+6XHis+экспрессионной метки LP10+участка распознавания TEV+лирапептида)

ATGGCAAGCATGACCGGTGGTCAGCAGATGGGTCGTCATCATCACCATCATC
ATATGCATACACCGGAACATATTACCGCAGTTGTTCAGCGTTTTGTTGCAGCACTGA
ATGCCGGTGATCTGGATGGTATTGTTGCACTGTTTGCAGATGATGCAACCGTTGAAG

ATCCGGTTGGTAGCGAACCGCGTAGCGGCACCGCAGCAATTCGTGAATTTTATGCAA
ATAGCCTGAAACTGCCGCTGGCCGTTGAACTGACCCAAGAAGTTCGCGCAGTTGCA
AATGAAGCAGCATTTGCATTTACCGTGAGCTTTGAATATCAGGGTCGTAAAACCGTT
GTTGCACCGATTGATCATTTTCGTTTTAATGGTGCCGGTAAAGTTGTTAGCATTCGTG
CCCTGTTTGGCGAAAAAAACATTCATGCATGTCAAGAAAACCTGTATTTTCAGCATG
CAGAAGGCACCTTTACCTCAGATGTTAGCAGCTATCTGGAAGGTCAGGCAGCAAAA
GAATTTATTGCATGGCTGGTTCGTGGTCGTGGTTAA

SEQ ID NO: 45 (экспрессирующая кассета, кодирующая SEQ ID NO: 23 - последовательность нуклеиновой кислоты LP11, состоящая из лидерной последовательности T7+6XArg+участка распознавания TEV+лирапептида)

ATGGCAAGCATGACCGGTGGTCAGCAGATGGGTCGTCGTCGCCGTCGTCGGC
GTGAAAATCTGTATTTTCAGCATGCAGAAGGCACCTTTACCTCAGATGTTAGCAGCT
ATCTGGAAGGTCAGGCAGCAAAAGAATTTATTGCATGGCTGGTTCGTGGTCGTGGTT
AA

SEQ ID NO: 46 (экспрессирующая кассета, кодирующая SEQ ID NO: 24 - LP2 без лидерной последовательности T7 последовательность нуклеиновой кислоты состоящая из 6XHis+экспрессионная метка LP2+участок распознавания TEV+Лирапептид)

ATGCATCATCACCATCATCATGGTAGCGGTCAGGGTCAAGCACAGTATCTGG
CAGCAAGCCTGGTTGTTTTTACCAATTATAGCGGTGATGAGAACCTGTATTTTCAGC
ATGCAGAAGGCACCTTTACCTCAGATGTTAGCAGCTATCTGGAAGGTCAGGCAGCA
AAAGAATTTATTGCATGGCTGGTTCGTGGTCGTGGTTAA

SEQ ID NO: 47 (экспрессирующая кассета, кодирующая SEQ ID NO: 25 - LP8 без лидерной последовательности T7, последовательность нуклеиновой кислоты, состоящая из 6XHis+экспрессионной метки LP8+участка распознавания TEV+лирапептида)

ATGCATCATCACCATCATCATTCAGCCGGTGATCTGAAATTTGTTAAAGTTGT
TGCCGAGAACCTGTATTTTCAGCATGCAGAAGGCACCTTTACCTCAGATGTTAGCAG
CTATCTGGAAGGTCAGGCAGCAAAAGAATTTATTGCATGGCTGGTTCGTGGTCGTGG
TTAA

SEQ ID NO: 48 (кодон-оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая лирапептид)

CATGCAGAAGGCACCTTTACCTCAGATGTTAGCAGCTATCTGGAAGGTCAGG
CAGCAAAAGAATTTATTGCATGGCTGGTTCGTGGTCGTGGT

SEQ ID NO: 49 (аминокислотная последовательность терипаратида)

SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF

SEQ ID NO: 50 (кодон-оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая терипаратид)

AGCGTTAGCGAAATTCAGCTGATGCATAATCTGGGCAAACATCTGAATAGCA
TGGAACGTGTTGAATGGCTGCGTAAAAAACTGCAGGATGTGCACAACTTT

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в

настоящем описании, имеют значение, понятное специалисту в области, к которой принадлежит изобретение. Хотя в практическом осуществлении или тестировании векторов, клеток-хозяев, способов и композиций также можно использовать любые векторы, клетки-хозяева, способы и композиции, схожие или эквивалентные представленным в настоящем описании, далее описаны типичные иллюстративные примеры.

Если представлен диапазон значений, следует понимать, что каждое промежуточное значение между верхним и нижним пределом этого диапазона и любое другое указанное или промежуточное значение в этом указанном диапазоне включено в способы и композиции. Верхние и нижние пределы этих меньших диапазонов можно независимо включать в меньшие диапазоны, и они также включены в способы и композиции с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие любой или оба из этих включенных пределов, также включены в способы и композиции.

Следует понимать, что некоторые признаки способов, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также можно представлять в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки способов и композиций, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также можно представлять раздельно или в любой подходящей подкомбинации. Следует отметить, что в рамках изобретения и формулы изобретения термины в единственном числе включают ссылку на множественное число, если контекст четко не указывает на иное. Также следует отметить, что формула изобретения может быть составлена так, чтобы исключить любой необязательный элемент. В связи с этим, это заявление должно служить основой для использования такой исключающей терминологии, как "исключительно", "только" и т.п. в связи с перечислением элементов пункта формулы или использованием "отрицательного" ограничения.

Как будет очевидно специалистам в этой области после прочтения описания, каждый из отдельных вариантов осуществления, представленных и проиллюстрированных в настоящем описании, имеет дискретные компоненты и признаки, которые легко можно отделять или комбинировать с признаками любого из других вариантов осуществления без отклонения от объема или сущности настоящего изобретения. Любой указанный способ можно осуществлять в перечисленном порядке событий или в любом другом логически возможном порядке.

Термин "клетка-хозяин" включает отдельную клетку или культуру клеток, которые могут являться или являются реципиентами для экспрессирующих конструкций по изобретению. Клетки-хозяева включают потомство единственной клетки-хозяина. Предпочтительная клетка-хозяин является *Escherichia coli*, также обозначаемой как *E. coli*, являющейся грамотрицательной, факультативно анаэробной, палочковидной, колиформной бактерией рода *Escherichia,* как правило, обнаруживаемой в нижних отделах кишечника теплокровных организмов, и *Corynebacterium glutamicum* и *Bacillus subtilis*.

Термины "рекомбинантный штамм" или "рекомбинантная клетка-хозяин" относятся к клетке-хозяину, трансфицированной или трансформированной с использованием экспрессирующих конструкций или векторов по настоящему изобретению.

Термин "экспрессия" относится к биологической продукции продукта, кодируемого кодирующей последовательностью. В большинстве случаев последовательность ДНК, включающая кодирующую последовательность, транскрибируется с образованием матричной РНК (мРНК). Затем матричная РНК транслируется с образованием полипептидного продукта, имеющего важную биологическую активность. Кроме того, процесс экспрессии может включать дополнительные стадии процессинга до РНК-продукта транскрипции, такие как сплайсинг для удаления интронов, и/или посттрансляционный процессинг полипептидного продукта.

Термин "экспрессирующий вектор" или "экспрессирующая конструкция" относится к любому вектору, плазмиде или носителю, сконструированному, чтобы сделать возможной экспрессию встроенной последовательности нуклеиновой кислоты после трансформации организма-хозяина.

Термин "кассета" или "экспрессирующая кассета" относится к сегменту ДНК, который можно встраивать в нуклеиновую кислоту или полинуклеотид в конкретные участки рестрикции. Сегмент ДНК содержит полинуклеотид, кодирующий интересующий белок. "Кассета" или "экспрессирующая кассета" также может содержать элементы, делающие возможной повышенную экспрессию полинуклеотида, кодирующего интересующий белок, в клетке-хозяине. Эти элементы могут включать, в качестве неограничивающих примеров: промотор, энхансер, чувствительный элемент, последовательность терминатора, последовательность полиаденилирования и т.п.

Термин "промотор" относится к последовательностям ДНК, определяющим, где начнется транскрипция гена. Промоторные последовательности, как правило, локализуются непосредственно выше или на 5'-конце участка инициации транскрипции. РНК-полимераза и необходимые факторы транскрипции связываются с промоторной последовательностью и инициируют транскрипцию. Промоторы могут являться конститутивными или индуцибельными промоторами. Конститутивные промоторы являются промоторами, делающими возможной непрерывную транскрипцию ассоциированных с ними генов, т.к. их экспрессия в норме не обусловлена факторами окружающей среды и развития. Конститутивные промоторы являются очень полезными инструментами генетической инженерии, т.к. конститутивные промоторы запускают экспрессию генов в условиях без индукторов и зачастую демонстрируют лучшие характеристики, чем общеупотребительные индуцибельные промоторы. Индуцибельные промоторы являются промоторами, индуцируемыми наличием или отсутствием биотических или абиотических и химических или физических факторов. Индуцибельные промоторы являются очень мощным инструментом генетической инженерии, т.к. экспрессию функционально связанных с ними генов можно "включать" или "выключать" на некоторых стадиях развития или роста организма или в конкретной ткани или клетках.

Термин "функционально связанный" относится к ассоциации последовательностей нуклеиновой кислоты на одном фрагменте нуклеиновой кислоты таким образом, что на функцию одного влияет другой. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью, если он может влиять на экспрессию этой кодирующей последовательности (т.е. эта кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем промотора).

В рамках изобретения термин "экспрессионная метка" относится к любому пептиду или полипептиду, который можно присоединять к интересующему белку, и он должен поддерживать растворимость, стабильность и/или экспрессию интересующего рекомбинантного белка.

Термин "расщепляемый линкерный пептид" относится к пептидной последовательности, имеющей распознаваемую последовательность расщепления. Расщепляемый пептидный линкер можно расщеплять с помощью ферментативного или химического расщепляющего средства.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используют в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения двух или более аминокислотных остатков, соединенных друг с другом пептидными связями или модифицированными пептидными связями. Термины используют в отношении полимеров аминокислот, в которых один или более аминокислотных остатков являются искусственными химическими миметиками соответствующей природной аминокислоты, а также природных полимеров аминокислот, полимеров, содержащих модифицированные остатки, и полимеров неприродных аминокислот. Термин "полипептид" относится к коротким цепям, общепринято обозначаемым как пептиды, олигопептиды или олигомеры, и более длинным цепям, как правило, обозначаемым как белки. Полипептиды могут содержать иные аминокислоты, чем 20 кодирующих гены аминокислот. Аналогично, термин "белок" относится к по меньшей мере двум ковалентно соединенным аминокислотам, включающим белки, полипептиды, олигопептиды и пептиды. Белок может состоять из природных аминокислот и пептидных связей или синтетических пептидомиметических структуры. Таким образом, в рамках изобретения термин "аминокислота" или "пептидный остаток" означает природные и синтетические аминокислоты. Термин "аминокислота" включает иминокислотные остатки, такие как пролин и гидроксипролин. Боковые цепи могут находиться в (R)- или (S)-конфигурации.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к экспрессирующим конструкциям, векторам и рекомбинантным клеткам-хозяевам для повышенной экспрессии и эффективной продукции биологически активных пептидов, таких как лирапептид.

Пептиды, получаемые по изобретению, можно получать эффективнее, чем пептиды, получаемые способами по предшествующему уровню техники, благодаря использованию коротких слитых меток. В существующих способах используют крупные слитые метки для экспрессии слитых белков, снижающие потенциальный выход желаемого интересующего

пептида. Это особенно затруднительно в ситуациях, когда желаемый пептид является небольшим, подобно лирапептиду, содержащему 31 аминокислоту. В таких ситуациях предпочтительно использовать наименьшую возможную слитую метку для максимизированного выхода.

Изобретение относится к многомерному подходу для достижения высокого выхода интересующего белка в клетке-хозяине посредством предоставления экспрессирующей конструкции, в которой нуклеиновая кислота, кодирующая интересующий белок, функционально слита с пептидом лидерной последовательности T7 и экспрессионной меткой на N-конце.

В варианте осуществления экспрессирующая кассета содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую интересующий белок.

В важном варианте осуществления экспрессирующая кассета также может кодировать слитый полипептид, состоящий из пептида лидерной последовательности T7, экспрессионной метки и расщепляемого линкера, слитого с N-концом интересующего белка.

В варианте осуществления экспрессирующая кассета также может кодировать слитый полипептид, состоящий из пептида лидерной последовательности T7, полигистидиновой метки, экспрессионной метки и расщепляемого линкера, слитого с N-концом интересующего белка.

Предпочтительно, интересующий белок является биоактивным полипептидом. Более предпочтительно, он включает терапевтические белки, которые можно использовать для лечения заболевания у человека или животных.

В варианте осуществления настоящего изобретения уровень экспрессии интересующего белка повышают по меньшей мере на 85%.

В другом варианте осуществления интересующий белок включает терапевтические пептиды, содержащие менее 100 аминокислот. В предпочтительном варианте осуществления интересующий пептид включает пептиды, в качестве неограничивающих примеров, такие как лирапептид, терипаратид, эксенатид, ликсисенатид, тедуглутид или семаглутид.

Термин "экспрессионная метка" относится к любому пептиду или полипептиду, который можно присоединять к интересующему белку, и он должен поддерживать растворимость, стабильность и/или экспрессию интересующего рекомбинантного белка.

В дополнительном варианте осуществления экспрессирующая кассета состоит из последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей экспрессионную метку, имеющей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2-10.

В предпочтительном варианте осуществления экспрессирующая кассета состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2 (LP-2) или SEQ ID NO: 8 (LP-8).

В другом варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты содержит предпочтительные кодоны для экспрессии в клетке-хозяине вместо редких

кодонов, что известно как оптимизация кодонов. В рамках изобретения термин "кодон-оптимизированный" относится к изменению кодонов в гене или кодирующих областях молекул нуклеиновой кислоты в кодоны, предпочтительные по отношению к организмам-хозяевам.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты могут демонстрировать "вырожденность кодонов". Термин "вырожденность кодонов" относится к нуклеотиду, который может выполнять ту же функцию или давать тот же результат, что и структурно иной нуклеотид.

В одном из вариантов осуществления кодон-оптимизированные экспрессионные метки содержат нуклеотидные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 26,SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34.

В одном из вариантов осуществления кодон-оптимизированные экспрессирующие кассеты содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую экспрессионные метки, метки HIS, участки распознавания TEV и нуклеиновую кислоту, кодирующую лирапептид. Кодон-оптимизированные экспрессирующие кассеты содержат нуклеотидные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 35,SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 46.

В варианте осуществления экспрессирующая кассета содержит нуклеотид, кодирующий расщепляемый линкерный пептид. Предпочтительно, экспрессирующая кассета кодирует расщепляемый линкерный пептид, расщепляемый сериновой протеазой, аспарагиновой протеазой, цистеиновой протеазой или металлопротеазой.

В предпочтительном варианте осуществления экспрессирующая кассета кодирует модифицированный участок расщепления протеазой TEV, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11.

В варианте осуществления настоящее изобретение относится к экспрессирующей кассете для высокого уровня экспрессии интересующего белка, состоящего из следующей функционально связанной последовательности нуклеиновой кислоты:

a) полинуклеотид, кодирующий полипептид лидерной последовательности T7, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

b) полинуклеотид, кодирующий полипептид экспрессионной метки, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-10;

c) полинуклеотид, кодирующий расщепляемый пептидный линкер; и

d) полинуклеотид, кодирующий интересующий белок,

где указанные полинуклеотидные последовательности экспрессирующей кассеты функционально связаны с промотором.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к экспрессирующей кассете для экспрессии лирапептида, состоящей из следующей

функционально связанной последовательности нуклеиновой кислоты:

a) полинуклеотид, кодирующий полипептид лидерной последовательности T7, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

b) полинуклеотид, кодирующий полипептид экспрессионной метки состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-10;

c) полинуклеотид, кодирующий расщепляемый линкер; и

d) полинуклеотид, кодирующий лирапептид, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, или ее функциональный вариант.

Экспрессирующая кассета по изобретению включает промотор. Промотор может являться конститутивным промотором или индуцибельным промотором. В экспрессирующих кассетах в одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения можно использовать конститутивные или индуцибельные промоторы, известные специалисту в этой области.

В варианте осуществления изобретение относится к экспрессирующему вектору для экспрессии интересующего белка, где экспрессирующий вектор содержит по меньшей мере одну копию описанной выше экспрессирующей кассеты.

Экспрессирующий вектор может дополнительно включать регуляторные последовательности для регуляции экспрессии экспрессирующей кассеты, последовательность терминации транскрипции, селективные маркеры и участки множественного клонирования. Вектор также может дополнительно включать сигнальную последовательность для направленного транспорта кодируемого полипептида.

В варианте осуществления векторы, подходящие для настоящего изобретения, включают, в качестве неограничивающих примеров, pD451.SR, pD431.SR, pET28, pET36, pGEX, pBAD, pQE9, pRSET и т.п.

В варианте осуществления изобретение относится к рекомбинантному хозяину, содержащему описанный выше экспрессирующий вектор. Подходящие клетки-хозяева включают, в качестве неограничивающих примеров, *E. coli, Corynebacterium glutamicum* и *Bacillus subtilis*. В предпочтительном варианте осуществления в качестве рекомбинантного хозяина используют *E. coli*.

В варианте осуществления рекомбинантная клетка-хозяин является *E. coli*, включая штаммы, выбранные из BL21 (DE3), BL21 AI, HMS174 (DE3), DH5ct, W31 10, B834, origami, Rosetta, NovaBlue (DE3), Lemo21 (DE3), T7, ER2566 и C43 (DE3).

В варианте осуществления экспрессирующий вектор по изобретению экспрессируют в рекомбинантном хозяине для продукции слитого пептида.

В варианте осуществления изобретение относится к слитому полипептиду, состоящему из:

a) полипептида лидерной последовательности T7, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

b) полипептида экспрессионной метки, имеющего аминокислотную

последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-10; и

c) расщепляемого пептидного линкера;

слитого с амино-концом интересующего белка для получения слитого полипептида.

В варианте осуществления изобретение относится к слитому полипептиду, состоящему из:

a) полипептида лидерной последовательности T7, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

b) полипептида экспрессионной метки, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-10; и

c) расщепляемого линкерного пептида;

слитого с амино-концом лирапептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или ее функциональный вариант, для получения слитого полипептида.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к слитым полипептидам, приведенным в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22.

Настоящее изобретение также относится к способу повышенной продукции интересующего белка, где указанный интересующий белок получают посредством расщепления слитого белка по расщепляемому линкеру.

В варианте осуществления настоящее изобретение также относится к способу получения интересующего белка, включающему стадии:

a) конструирования экспрессирующей конструкции, где экспрессирующая конструкция состоит из:

i. полинуклеотида, кодирующего полипептид лидерной последовательности T7, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

ii. полинуклеотида, кодирующего полипептид экспрессионной метки, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-10;

iii. полинуклеотида, кодирующего расщепляемый пептидный линкер; и

iv. полинуклеотида, кодирующего интересующий белок;

b) встраивания экспрессирующей конструкции в экспрессирующий вектор;

c) трансформации рекомбинантного хозяина с использованием экспрессирующего вектора;

d) выращивания рекомбинантного хозяина в оптимальных условиях для экспрессии слитого белка, где слитый белок состоит из полипептида лидерной последовательности T7, экспрессионной метки и расщепляемого пептидного линкера, слитого с N-концом о интересующего белка;

e) выделения слитого белка из клетки; и

f) расщепления слитого белка по расщепляемому линкерному пептиду для получения интересующему белку.

В варианте осуществления настоящее изобретение также относится к способу получения лирапептида, включающему стадии:

a) конструирования экспрессирующей конструкции, где экспрессирующая конструкция состоит из:

i. полинуклеотида, кодирующего полипептид лидерной последовательности T7, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

ii. полинуклеотида, кодирующего полипептид экспрессионной метки, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-10;

iii. полинуклеотида, кодирующего расщепляемый пептидный линкер; и

iv. полинуклеотида, кодирующего лирапептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12 или ее функциональный вариант;

b) встраивания экспрессирующей конструкции в экспрессирующий вектор;

c) трансформации рекомбинантного хозяина с использованием экспрессирующего вектора;

d) выращивания рекомбинантного хозяина в оптимальных условиях для экспрессии слитого белка, где слитый белок состоит из полипептида лидерной последовательности T7, экспрессионной метки и расщепляемого пептидного линкера, слитого с N-концом лирапептида;

e) выделения слитого белка из клетки; и

f) расщепления слитого белка по расщепляемому линкерному пептиду для получения лирапептида.

Лираглутид является аналогом GLP-1 человека и действует как агонист рецептора GLP-1. Лираглутид получают посредством присоединения C-16-жирной кислоты (пальмитиновой кислоты) со спейсером глутаминовой кислоты на оставшийся остаток лизина в положении 26 пептида-предшественника (лирапептида, приведенного в SEQ ID NO: 12).

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу получения лирапептида, включающему стадии:

a) конструирования рекомбинантного вектора (экспрессирующей конструкции),

b) трансформации *Escherichia coli* с помощью экспрессирующей конструкции,

c) оценки клонов на экспрессию пептида,

d) очистки меченого лирапептида,

e) отщепления N-концевой слитой метки и очистки лирапептида.

Стандартные способы рекомбинантной ДНК и молеулярного клонирования, используемые в настоящем описании, хорошо известны в этой области и описаны в Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001).

В приведенном выше описании в целом представлено настоящее изобретение. Более полного понимания можно достичь с помощью следующих конкретных примеров. Этот

пример описан исключительно в иллюстративных целях и не предназначен для ограничения объема изобретения. Хотя в настоящем описании использованы конкретные термины, такие термины приведены в описательном смысле, а не для ограничения.

Различные варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно определены с помощью следующих примеров. Следующие примеры приведены для иллюстрирования изобретения, а не для какого-либо ограничения объема изобретения.

ПРИМЕРЫ:

Пример 1: Конструирование плазмиды для экспрессии лирапептида

ДНК, кодирующую лирапептид с комбинацией N-концевых слияний (фигура 1A, 1B, 1C, 1D) и (SEQ ID NO: 13-23) подвергали оптимизации кодонов для *E. coli* и синтезировали.

Экспрессирующую плазмиду *E. coli* pD451.SR приобретали в ATUM в линеаризованной форме (расщепленной SapI). Синтезированную ДНК лирапептида, скомбинированную с разными N-концевыми слияниями, расщепляли ферментом рестрикции SapI. Рестрикционно расщепленные фрагменты лигировали в линейную плазмиду pD451.SR и трансформировали штамм *Escherichia coli*. Полученные плазмиды, содержащие экспрессирующие кассеты лирапептида (фигура 2A, 2B, 2C, 2D и 2E) подтверждали посредством секвенирования нуклеотидов.

Кодон-оптимизированные экспрессионные метки содержат нуклеотидные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 26,SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 34.

Кодон-оптимизированные экспрессирующие кассеты содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую экспрессионные метки, метки HIS, участки распознавания TEV и нуклеиновую кислоту, кодирующую лирапептид. Кодон-оптимизированные экспрессирующие кассеты содержат нуклеотидные последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 35,SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 47.

Пример 2: Трансформация *E. coli* и экспрессия пептидов

С помощью плазмидной ДНК с подтвержденной последовательностью, содержащей кассеты LP1-LP11, трансформировали *E. coli* BL21(DE3) способом трансформации с тепловым шоком и хлоридом кальция, а затем высевали на LB-агар, содержащий 50 мкг/мл антибиотика канамицина. Трансформированные клетки *E. coli* культивировали в 5 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина, в течение ночи при 37°C в шейкере-инкубаторе, затем разводили культуры новой средой в соотношении 1:100 и позволяли им расти до достижения OD ~0,6.

Затем добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали на шейкере-инкубаторе в течение 4 ч. при 37°C. OD культивируемых клеток нормализовали перед нанесением на гель ПААГ с SDS для анализа экспрессии пептидов (фигура 3A). Экспрессию лирапептида наблюдали на геле для всех кассет, за исключением LP1 (SEQ ID NO: 35), LP3 (SEQ ID NO: 37) и LP11 (SEQ ID NO: 45).

Гели подвергали денситометрическому анализу для количественного анализа плотности полосы лирапептид относительно общего белка в каждой дорожке с использованием системы для документирования гелей Image-Quant 800 и ее программного обеспечения от GE.

Выбор клонов был основан на наименьшем размере экспрессионной метки и более высоких плотностях полос лирапептида на геле таким образом, что ожидают, что выходы лирапептида будут выше.

Определяли, что лирапептид без экспрессионной метки не демонстрировал какую-либо экспрессию на геле, что свидетельствует о том, что экспрессионная метка необходима для экспрессии. Клоны LP2 и LP8 выбирали для дальнейшего анализа, т.к. размеры их экспрессионных меток являлись сравнительно небольшими, а плотности полос лирапептида были выше (фигура 3B).

Для определения того, имеет ли место синергический эффект между лидерной последовательностью T7 и экспрессионной меткой в отношении экспрессии лирапептида в клонах LP2 и LP8, авторы настоящего изобретения конструировали и оценивали кассеты LP2 и LP8 без лидерной последовательности T7 (SEQ ID NO 24 и 25) и (фигуры 2C и 2E).

Определяли, что экспрессия пептида LP2 и LP8 с лидерной последовательностью T7 была по меньшей мере на 85% выше, чем у LP2 и LP8 без лидерной последовательности T7 (фигура 4 A, B, C и 5A, B, C).

Пример 3: Очистка лирапептида, содержащего N-концевое слияние

Клетки лизировали с помощью обработки ультразвуком, затем центрифугировали лизат, а затем нерастворимый осадок растворяли в 8 M мочевине.

Образец наносили на матрицы Ni-NTA; меченые His белки связаны, а другие белки проходили через матрицу. После промывки меченый HIS пептид элюировали с использованием имидазола со ступенчатым градиентом для отделения пептида от примесей (фигура 6A).

Пример 4: Удаление N-концевой слитой метки и очистка лирапептида

Очищенный меченый лирапептид подвергали воздействию протеазы TEV для отщепления N-концевой слитой метки. Затем образец наносили обращенно-фазовую хроматографическую колонку для очистки лирапептида (фигура 6 B). Аминокислотную последовательность и интактную массу очищенного лирапептида подтверждали с использованием LC/MS.

Пример 5:Экспрессия терипаратида

ДНК, кодирующую терипаратид с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 49 с комбинацией N-концевых слияний, состоящую из пептида лидерной последовательности T7, полигистидиновой метки, экспрессионных меток (SEQ ID NO: 26-34), и модифицированного TEV-расщепляемого линкера, подвергали оптимизации кодонов для *E. coli* и синтезировали. Экспрессирующие конструкции, содержащие экспрессионные метки SEQ ID NO: 26-34, обозначали как TP2-TP10. Экспрессирующая конструкция TP1 не содержит какую-либо экспрессионную метку, и экспрессирующая конструкция TP11

состоит из лидерной последовательности T7+6XArg+участка распознавания TEV+терипаратида.

Экспрессирующую плазмиду *E. coli* pD451.SR приобретали в ATUM в линеаризованной форме (расщепленной SapI). Синтезированную ДНК терипаратида, скомбинированную с разными N-концевыми слияниями, расщепляли ферментом рестрикции SapI. Рестрикционно расщепленные фрагменты лигировали с линейной плазмидой pD451.SR и трансформировали штамм *Escherichia coli*. Полученные плазмиды, содержащие экспрессирующие кассеты терипаратида, подтверждали посредством секвенирования нуклеотидов.

С помощью плазмидной ДНК с подтвержденной последовательностью, содержащей кассеты TP1-TP11, трансформировали *E. coli* BL21(DE3) способом трансформации с тепловым шоком и хлоридом кальция, а затем высевали на LB-агар, содержащий 50 мкг/мл антибиотика канамицина. Трансформированные клетки *E. coli* культивировали в 5 мл среды LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина, в течение ночи при 37°C в шейкере-инкубаторе, затем разводили культуры новой средой в соотношении 1:100 и позволяли им расти до достижения OD ~0,6.

Затем добавляли IPTG до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали на шейкере-инкубаторе в течение 4 ч. при 37°C. OD культивируемых клеток нормализовали перед нанесением на гель ПААГ с SDS для анализа экспрессии пептидов (фигура 8). Неиндуцированный (UI) образец использовали в качестве контроля. Экспрессию терипаратида наблюдали на геле для всех кассет, за исключением TP3.

ПРЕИМУЩЕСТВА ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем исследовании достигали высоких уровней экспрессии лирапептида с использованием очень коротких слитых меток, таких как метка LP-2 (23AA) и метка LP-8(12AA), в комбинации с лидерной последовательностью T7. Слитая метка будет индуцировать агрегацию в тельца включения, повышать стабильность белка, защищать пептиды от действия деградационных ферментов клетки-хозяина, а также облегчать очистку после экспрессии. На фигуре 7, на которой показана экспрессия лирапептида в растворимых и нерастворимых фракциях, показано, что большую часть слитого пептида определяли в нерастворимой фракции. Метки по настоящему изобретению имеют очень небольшой размер по сравнению с общеупотребительными слитыми метками, такими как GST (26 кДа), тиоредоксин Trx (12 кДа), метка MBP (42 кДа), кетостероид-изомераза (KSI) (14 кДа) и SUMO 14 кДа. Использование наиболее коротких возможных пептидных меток для улучшения экспрессии интересующего пептида может помочь преодолеть ограничения использования крупных слитых меток и улучшить выходы, таким образом, снижая затраты на производство.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Экспрессирующая кассета для экспрессии интересующего белка, где указанная экспрессирующая кассета состоит из:

a) полинуклеотида, кодирующего полипептид лидерной последовательности T7, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

b) полинуклеотида, кодирующего полипептид экспрессионной метки, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-10;

c) полинуклеотида, кодирующего расщепляемый пептидный линкер; и

d) полинуклеотида, кодирующего интересующий белок,

где указанные полинуклеотидные последовательности экспрессирующей кассеты функционально связаны с промотором.

2. Экспрессирующая кассета по п.1, где указанная экспрессирующая кассета дополнительно состоит из полинуклеотида, кодирующего полигистидиновую метку.

3. Экспрессирующая кассета по п.1, где расщепляемый линкер состоит из модифицированного участка расщепления протеазы TEV, имеющего аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11.

4. Экспрессирующая кассета по п.1, где интересующий белок состоит из терапевтических пептидов размером менее 100 аминокислот.

5. Экспрессирующая кассета по п.1, где интересующий белок выбран из группы, состоящей из лирапептида, терипаратида, эксенатида, ликсисенатида, тедуглутида и семаглутида.

6. Экспрессирующая кассета по п.1, где интересующий белок является лирапептидом.

7. Экспрессирующая кассета по п.1, где уровень экспрессии интересующего белка повышен по меньшей мере на 85%.

8. Экспрессирующая кассета для экспрессии лирапептида, где указанная экспрессирующая кассета состоит из:

a) полинуклеотида, кодирующего полипептид лидерной последовательности T7, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

b) полинуклеотида, кодирующего полипептид экспрессионной метки, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-10;

c) полинуклеотида, кодирующего расщепляемый пептидный линкер; и

d) полинуклеотида, кодирующего лирапептид, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, или ее функциональный вариант,

где указанные полинуклеотидные последовательности экспрессирующей кассеты функционально связаны с промотором.

9. Экспрессирующая кассета по п.8, где расщепляемый линкер состоит из модифицированного участка расщепления протеазы TEV, имеющего аминокислотную

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11.

10. Экспрессирующая кассета по любому из пп. 1-8, где указанная экспрессирующая кассета состоит из полинуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 36-44

11. Экспрессирующий вектор для экспрессии интересующего белка, где указанный экспрессирующий вектор состоит из по меньшей мере одной копии экспрессирующей кассеты по любому из пп. 1-10.

12. Экспрессирующая кассета по п.1 или экспрессирующий вектор по п.11 для применения в экспрессии интересующего белка.

13. Клетка-хозяин для повышенной продукции интересующего белка, содержащая экспрессирующий вектор, где указанный экспрессирующий вектор состоит из любой из экспрессирующих кассет по пп. 1-10.

14. Клетка-хозяин по п.13, где указанная клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из *E. coli, Corynebacterium glutamicum* и *Bacillus subtilis.*

15. Клетка-хозяин по п.14, где штамм *E. coli* выбран из группы, состоящей из BL21 (DE3), BL21 AI, HMS174 (DE3), DH5ct, W31 10, B834, origami, Rosetta, NovaBlue (DE3), Lemo21 (DE3), T7, ER2566 и C43 (DE3).

16. Слитый полипептид, состоящий из:

a) полипептида лидерной последовательности T7, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

b) полипептида экспрессионной метки, имеющего аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-10; и

c) расщепляемого пептидного линкера;

слитый с амино-концом интересующего белка для получения слитого полипептида.

17. Слитый полипептид по п.16, где указанный слитый полипептид дополнительно состоит из полигистидиновой метки.

18. Слитый полипептид по п.16, где расщепляемый линкер состоит из модифицированного участка расщепления протеазы TEV, имеющего аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11.

19. Слитый полипептид по п.16, где интересующий белок состоит из терапевтических пептидов размером менее 100 аминокислот.

20. Слитый полипептид по п.16, где интересующий белок выбран из группы, состоящей из лирапептида, терипаратида, эксенатида, ликсисенатида, тедуглутида и семаглутида.

21. Слитый полипептид по п.16, где интересующий белок является лирапептидом, приведенным в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12 или ее функциональных эквивалентах.

22. Слитый полипептид по п.16, где указанный слитый полипептид состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 14-22.

23. Способ получения интересующего белка, где указанный способ включает

стадии:

a) культивирования клетки-хозяина по любому из пп. 13-15 в благоприятных условиях для получения слитого полипептида по любому из пп. 16-22;

b) выделения слитого полипептида, полученного на стадии a); и

c) расщепления слитого полипептида, полученного на стадии b), по расщепляемому линкеру для получения интересующего белка.

24. Способ по п.23, где интересующий белок выбран из группы, состоящей из лирапептида, терипаратида, эксенатида, ликсисенатида, тедуглутида и семаглутида.

25. Способ по п.23, где интересующий белок является лирапептидом, приведенным в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12 или ее функциональных эквивалентах.

По доверенности

ФИГ.1

A

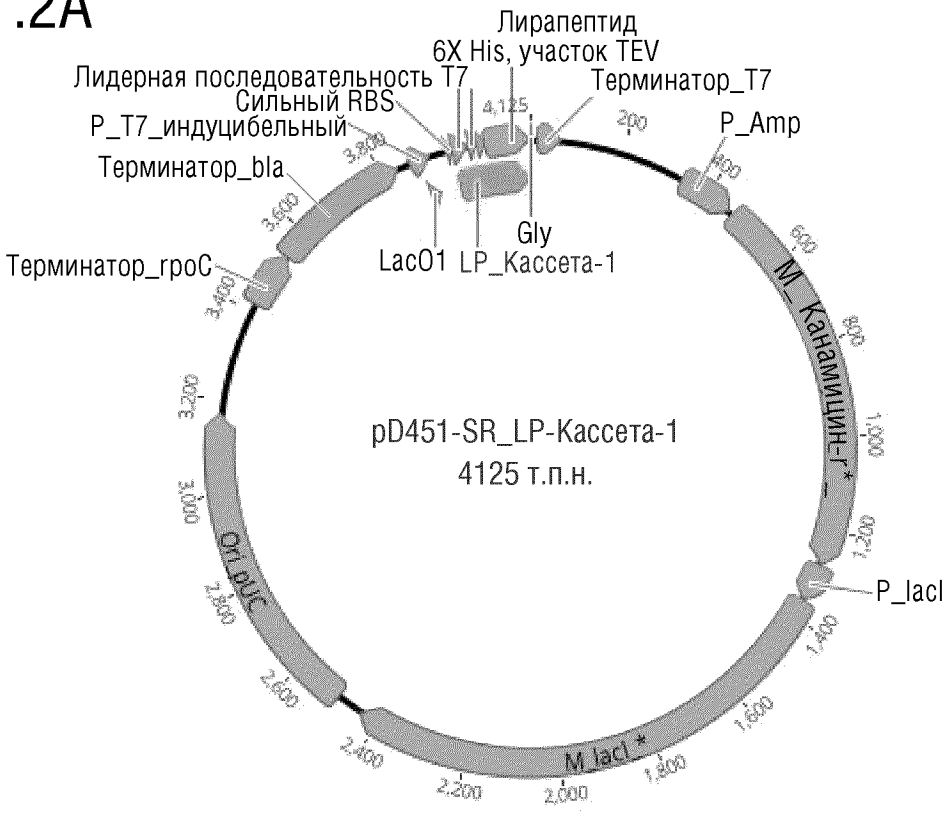
B

C

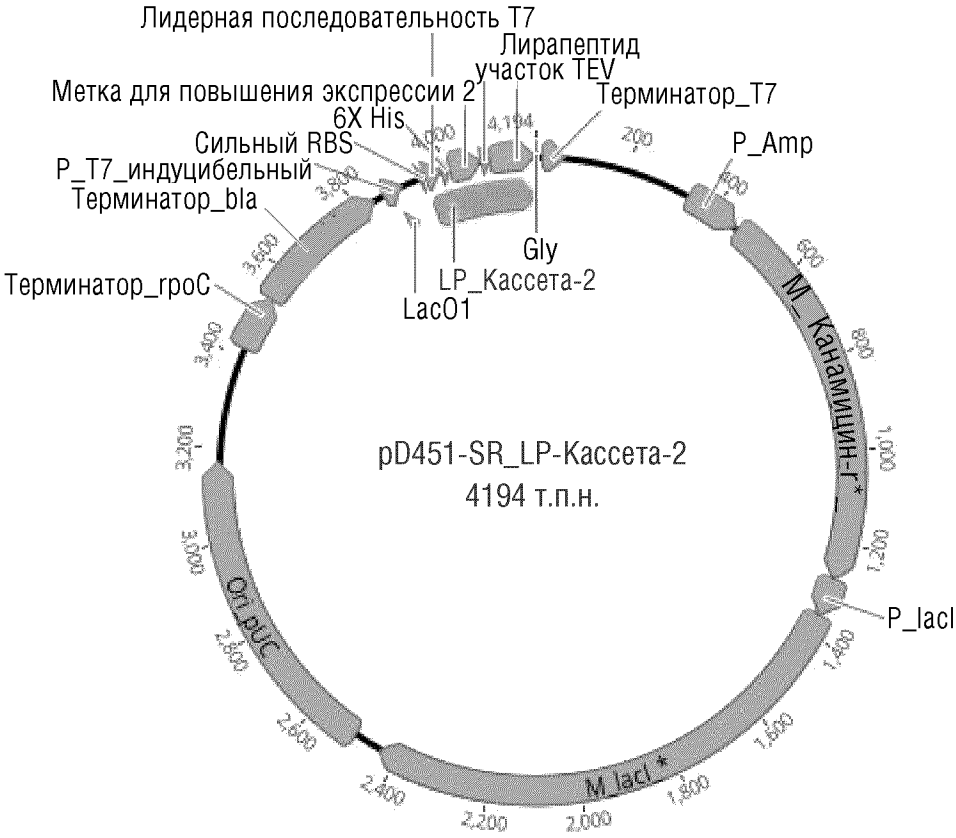
D

579387

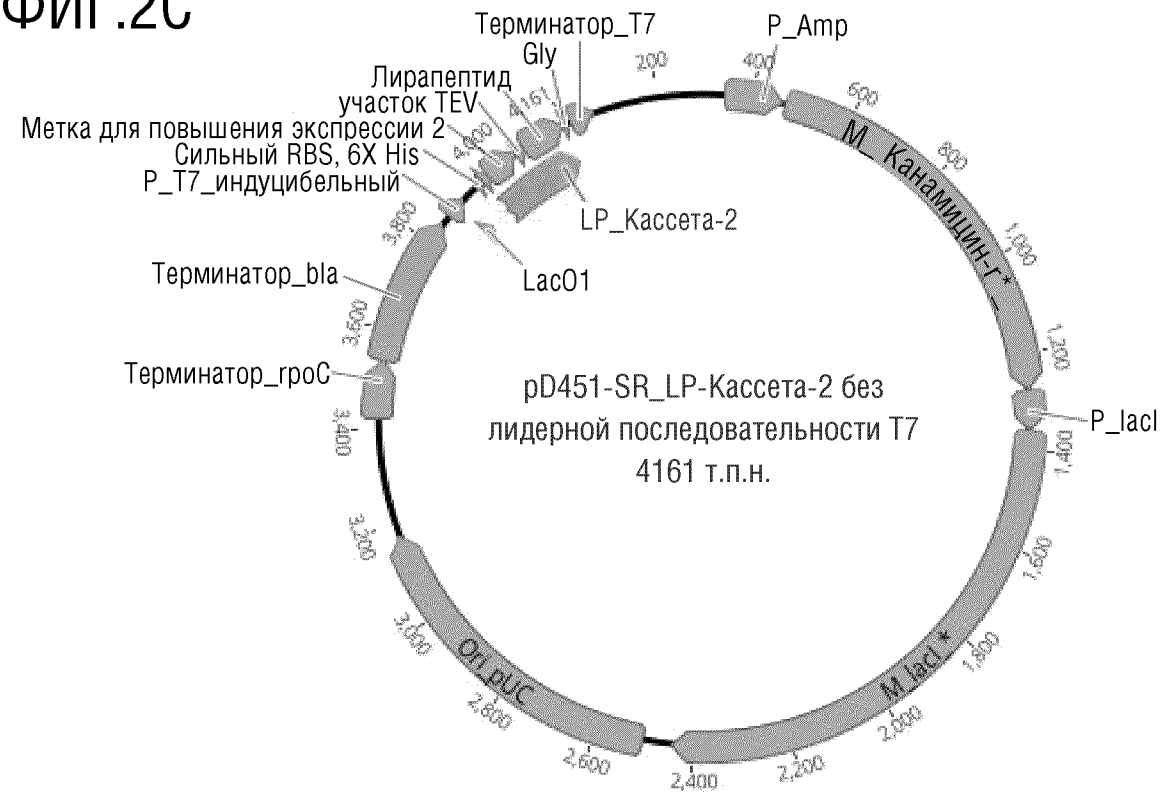
ФИГ.2А


Лирапептид
6X His, участок TEV
Лидерная последовательность T7
Терминатор_T7
Сильный RBS
P_T7_индуцибельный
P_Amp
Терминатор_bla
Gly
LacO1
LP_Кассета-1
Терминатор_rpoC
M_Канамицин-г*
pD451-SR_LP-Кассета-1
4125 т.п.н.
P_lacI
Ori_pUC
M_lacI *

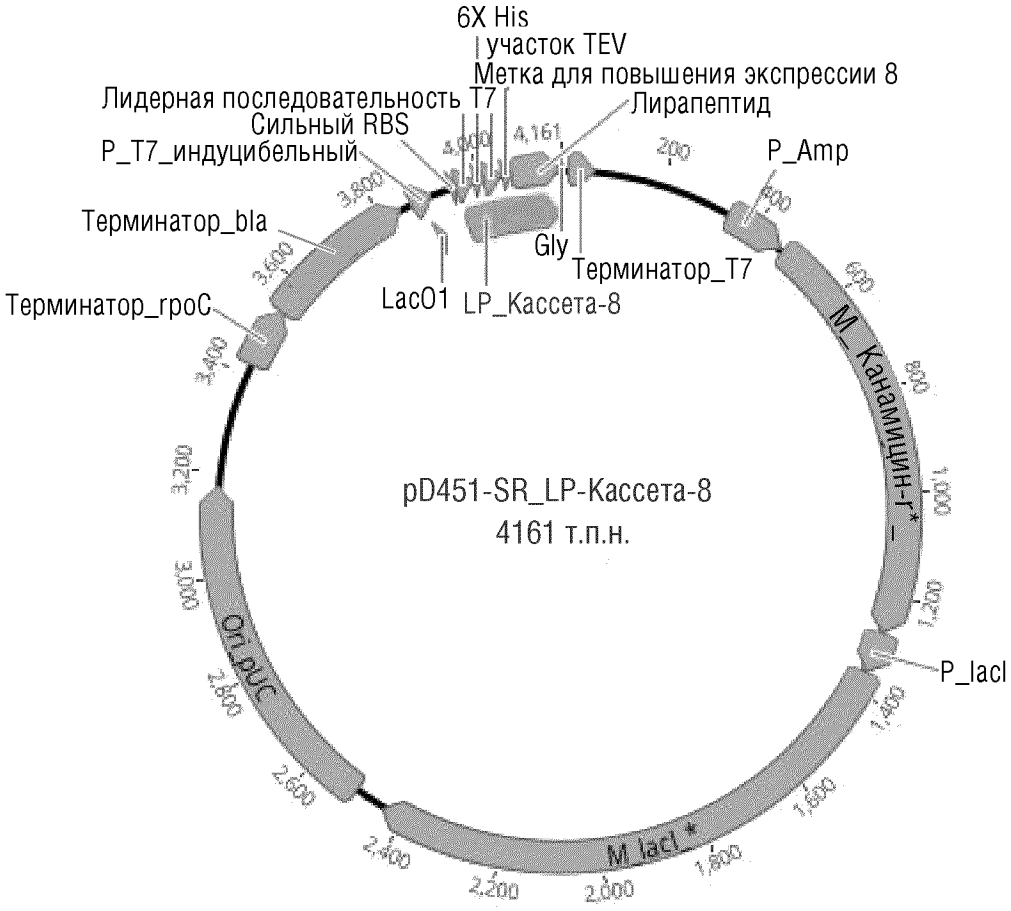
ФИГ.2В


Лидерная последовательность T7
Лирапептид
участок TEV
Метка для повышения экспрессии 2
Терминатор_T7
6X His
Сильный RBS
P_Amp
P_T7_индуцибельный
Терминатор_bla
Gly
LP_Кассета-2
Терминатор_rpoC
LacO1
M_Канамицин-г*
pD451-SR_LP-Кассета-2
4194 т.п.н.
P_lacI
Ori_pUC
M_lacI *

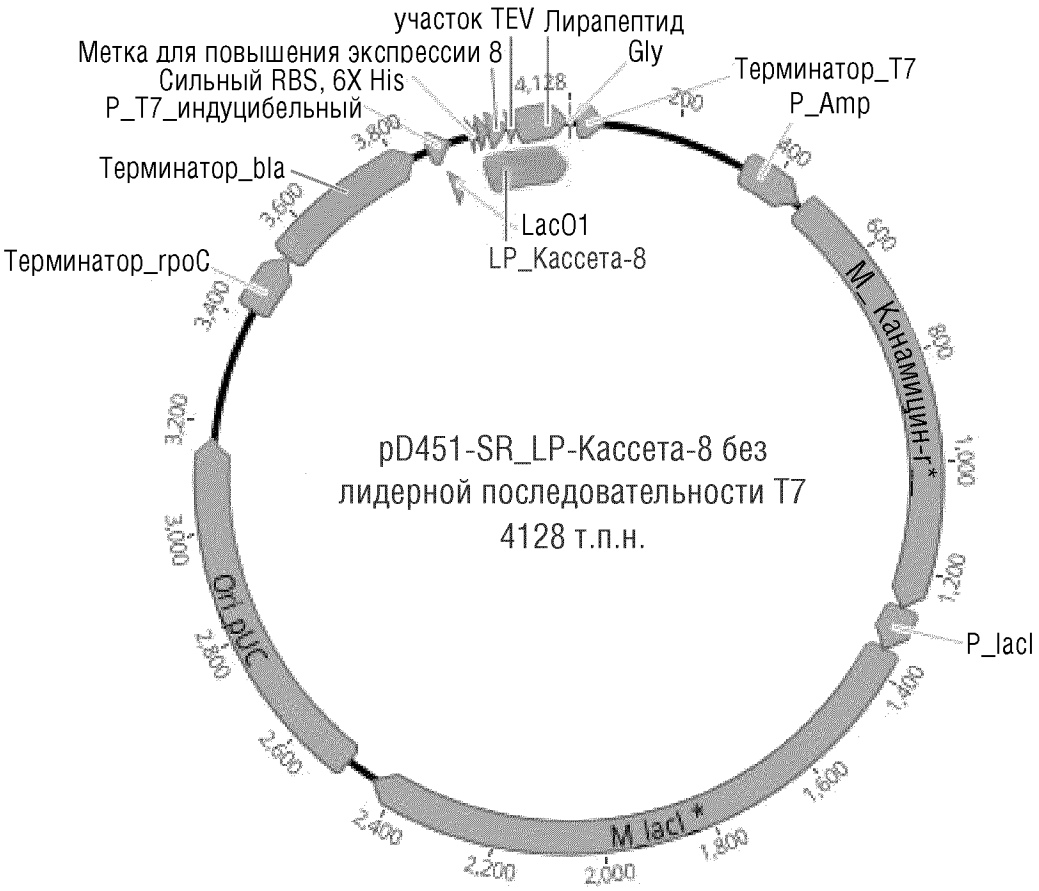
ФИГ.2C


Терминатор_T7
Gly
Лирапептид
участок TEV
Метка для повышения экспрессии 2
Сильный RBS, 6X His
P_T7_индуцибельный
P_Amp
LP_Кассета-2
LacO1
Терминатор_bla
Терминатор_rpoC
pD451-SR_LP-Кассета-2 без
лидерной последовательности T7
4161 т.п.н.
M_Канамицин-r*
P_lacI
Ori pUC
M_lacI *

ФИГ.2D

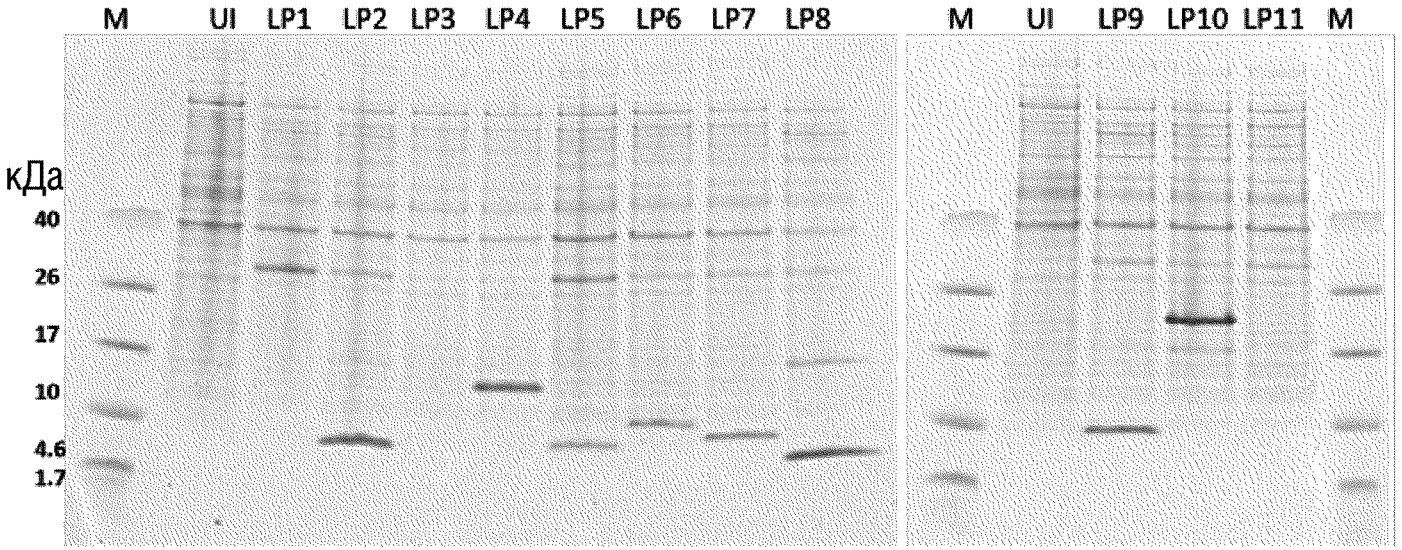

6X His
участок TEV
Метка для повышения экспрессии 8
Лирапептид
Лидерная последовательность T7
Сильный RBS
P_T7_индуцибельный
P_Amp
Терминатор_bla
Gly
Терминатор_T7
LacO1
LP_Кассета-8
Терминатор_rpoC
pD451-SR_LP-Кассета-8
4161 т.п.н.
M_Канамицин-r*
P_lacI
Ori pUC
M_lacI *

ФИГ.2Е


участок TEV
Лирапептид
Gly
Метка для повышения экспрессии 8
Сильный RBS, 6X His
P_T7_индуцибельный
Терминатор_T7
P_Amp
Терминатор_bla
LacO1
LP_Кассета-8
Терминатор_groC
pD451-SR_LP-Кассета-8 без
лидерной последовательности T7
4128 т.п.н.
M_Канамицин-r_*
P_lacI
M_lacI_*
Ori_pUC
4,128
200
400
600
800
1,000
1,200
1,400
1,600
1,800
2,000
2,200
2,400
2,600
2,800
3,000
3,200
3,400
3,600
3,800

ФИГ.3А

Анализ экспрессии кассет LP1-LP11 на геле ПААГ с SDS



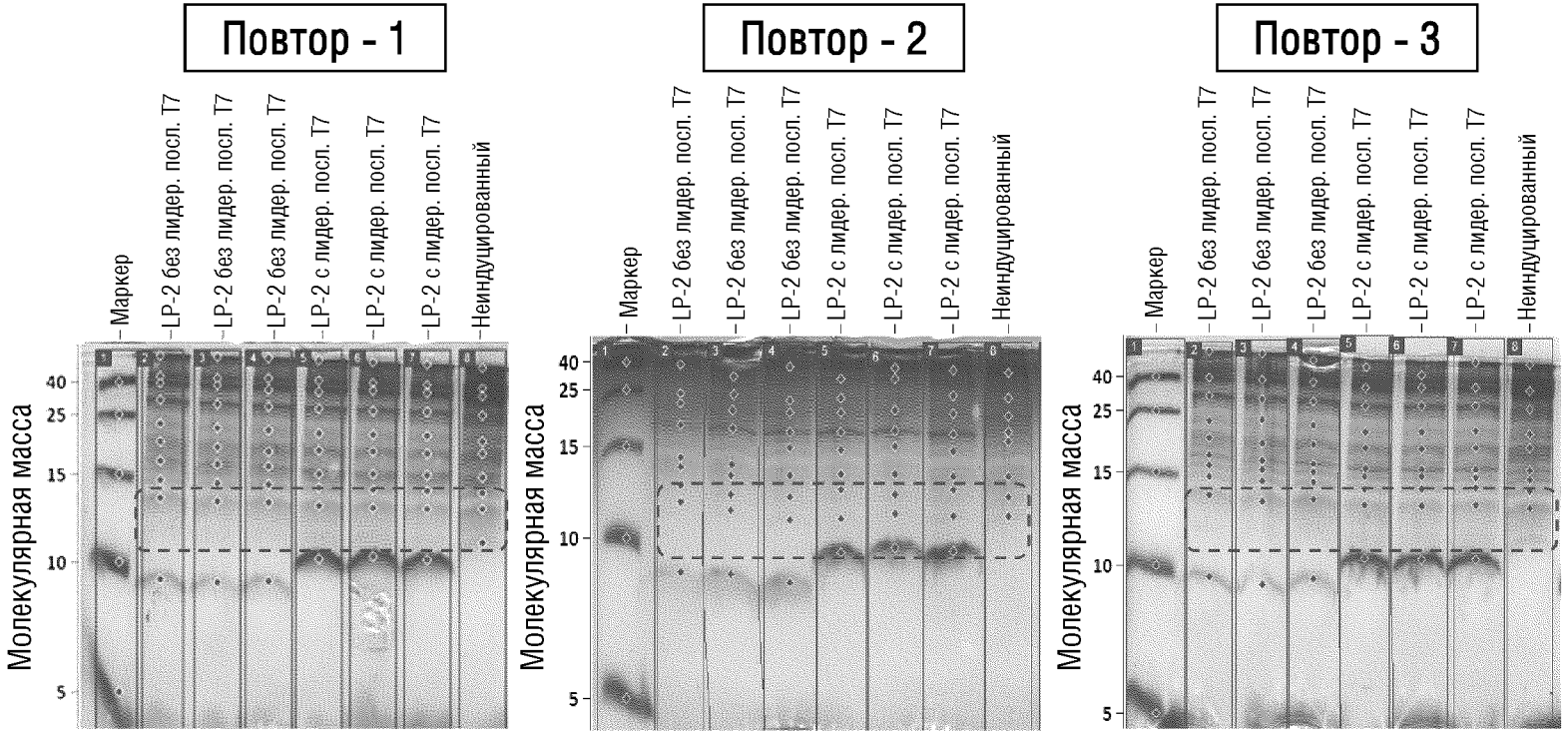
ФИГ.3В

Таблица, в которой приведена молекулярная масса каждой кассеты и процент меченого лирапептида на дорожку, на основе денситометрического анализа

Образец	UI (неиндуцир.)	LP-1	LP-2	LP-3	LP-4	LP-5	LP-6	LP-7	LP-8	LP-9	LP-10	LP-11
Молекулярная масса (кДа)		6.2	8.5	10.4	14.7	7.6	8.9	9.6	7.4	7.7	19.6	6.3
% меченого лирапептида	-	-	22.8	-	22.3	14.8	21.7	18.2	29.4	27.2	24.9	-

ФИГ.4А

Сравнительная экспрессия лирапептида в присутствии и отсутствие лидерной последовательности T7 с экспрессионной меткой LP-2 в экспрессирующей кассете



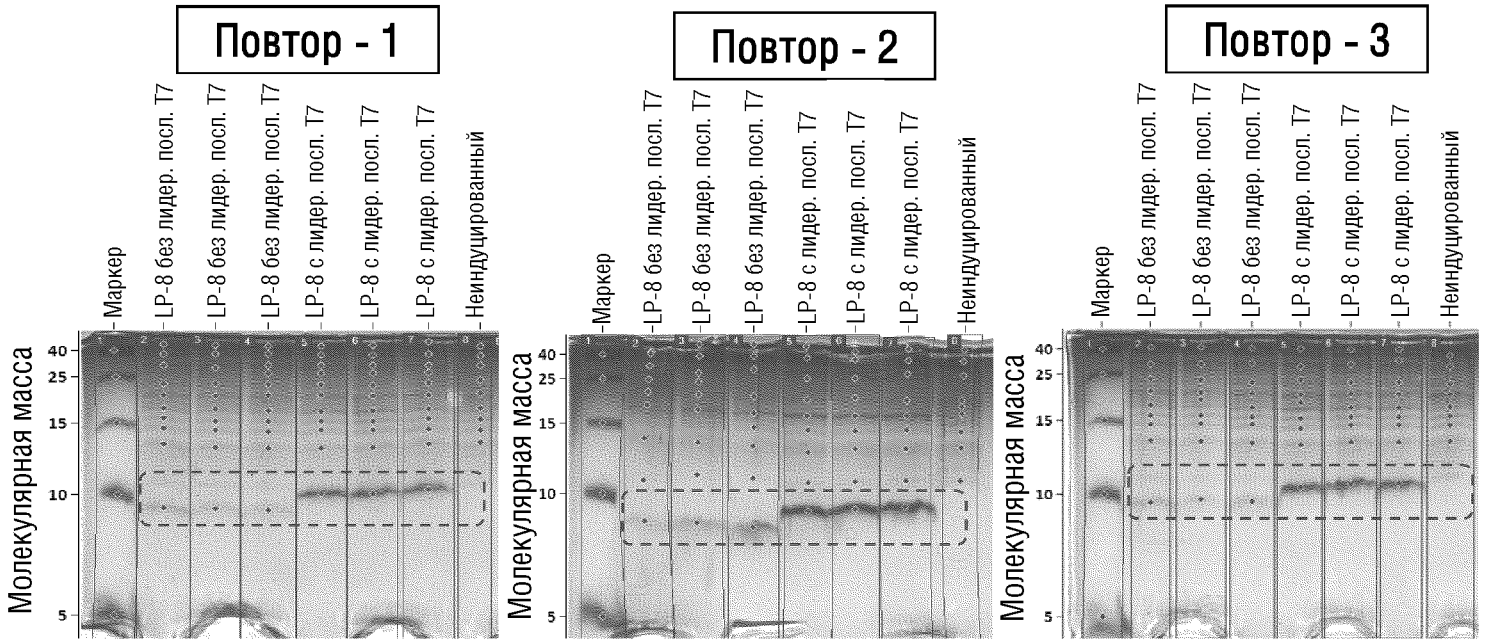
ФИГ.4В

Процент повышения LP2	
Повтор 1	136%
Повтор 2	97%
Повтор 3	94%

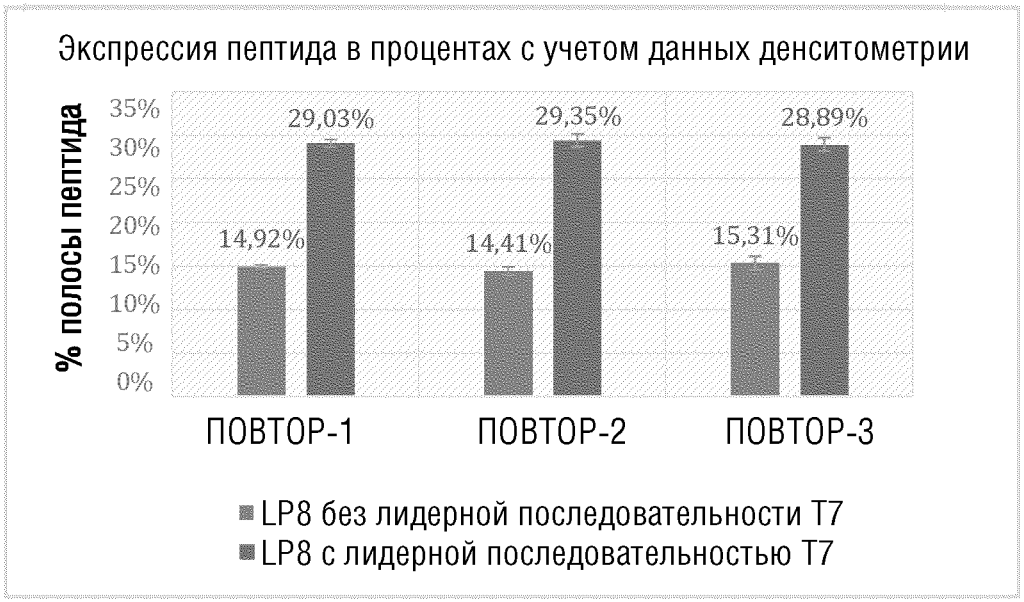
ФИГ.4С

Процент повышения экспрессии лирапептида (LP2) с лидерной последовательностью T7 по сравнению с отсутствием лидерной последовательности T7

ФИГ.5А


Повтор - 1
Повтор - 2
Повтор - 3
Маркер
LP-8 без лидер. посл. T7
LP-8 без лидер. посл. T7
LP-8 без лидер. посл. T7
LP-8 с лидер. посл. T7
LP-8 с лидер. посл. T7
LP-8 с лидер. посл. T7
Неиндуцированный
Молекулярная масса
40
25
15
10
5

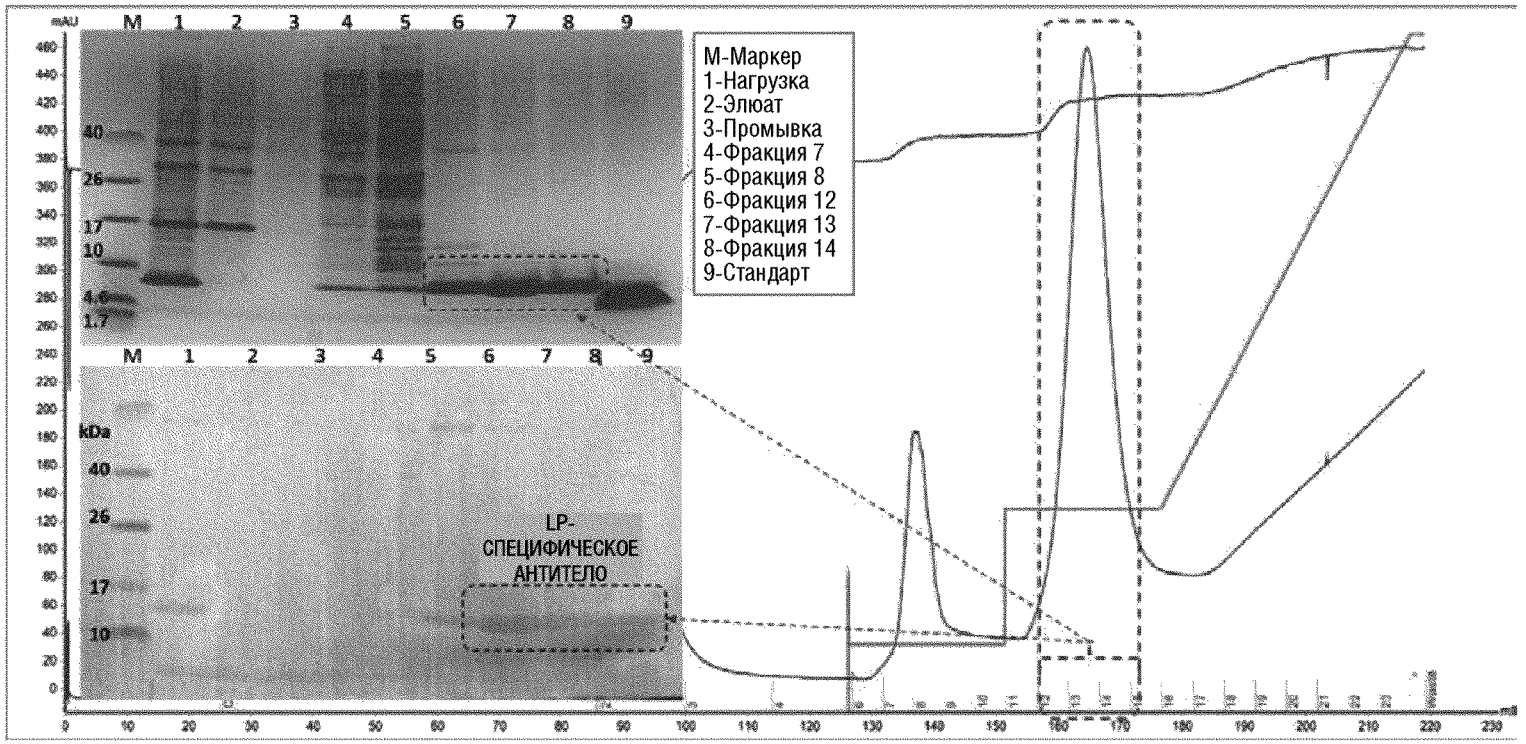
ФИГ.5В


Экспрессия пептида в процентах с учетом данных денситометрии
% полосы пептида
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
29,03%
14,92%
29,35%
14,41%
28,89%
15,31%
ПОВТОР-1
ПОВТОР-2
ПОВТОР-3
LP8 без лидерной последовательности T7
LP8 с лидерной последовательностью T7

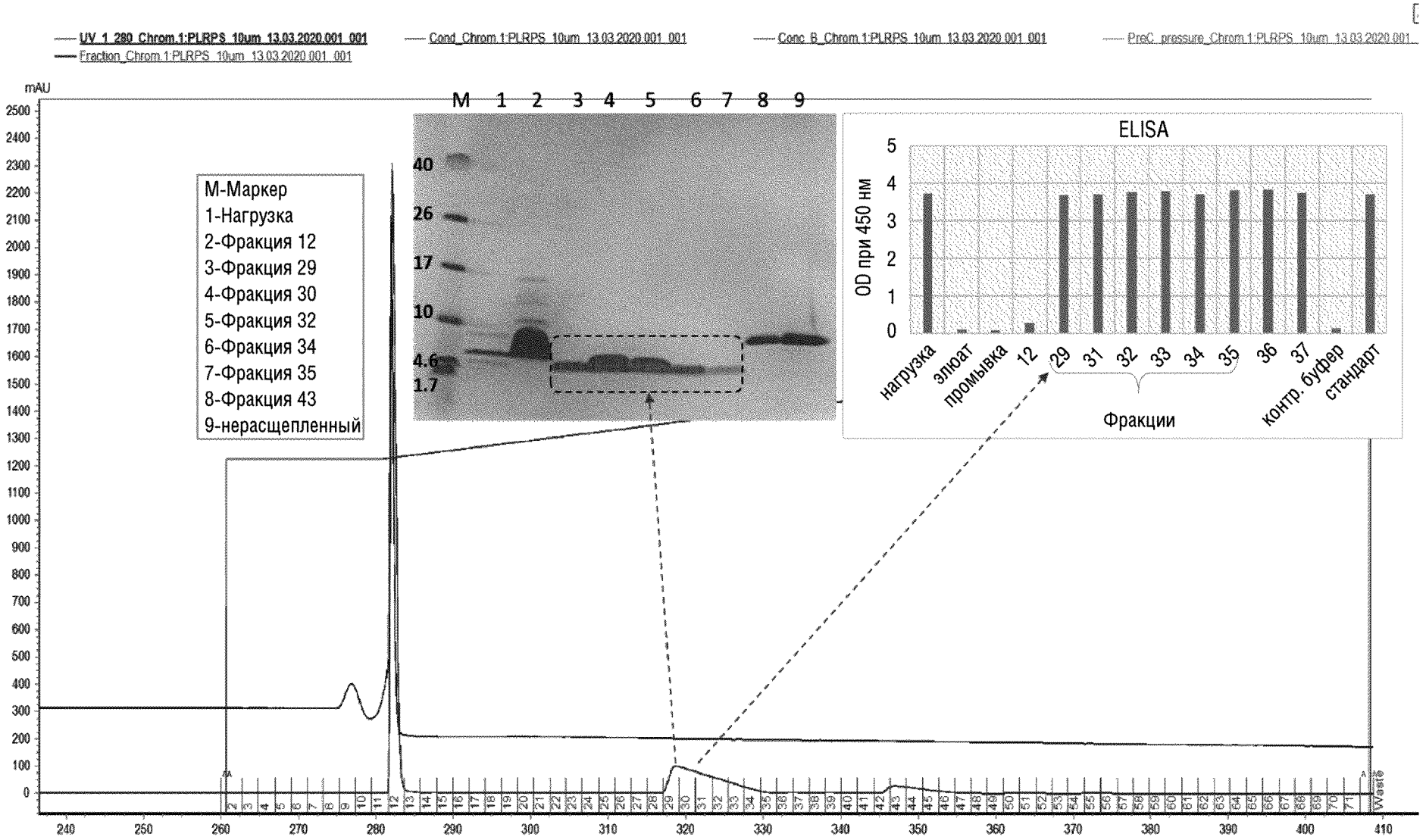
ФИГ.5С Процент повышения экспрессии лирапептида (LP8) с лидерной последовательностью T7 по сравнению с отсутствием лидерной последовательности T7

Процент повышения LP8	
Повтор 1	95%
Повтор 2	104%
Повтор 3	89%

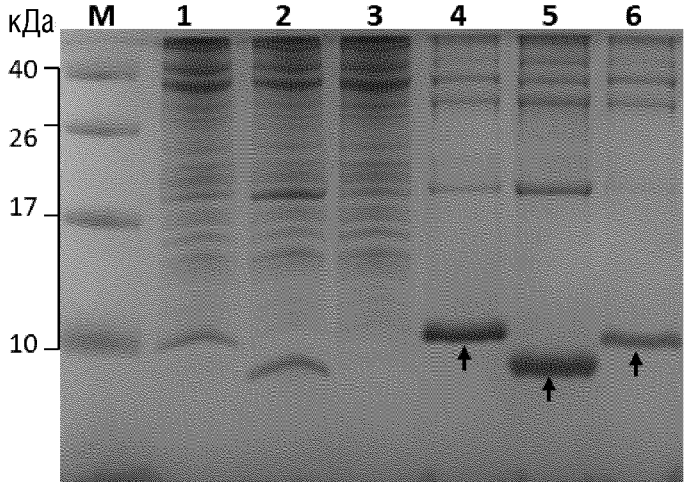
ФИГ.6А

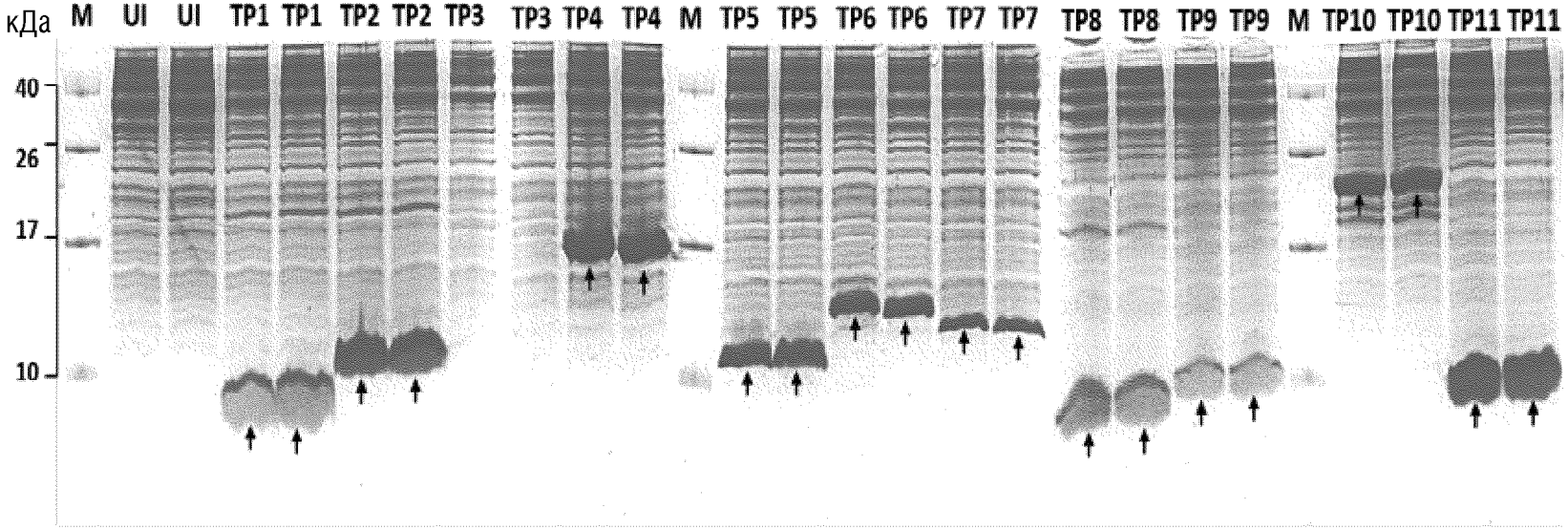


ФИГ.6В


UV_1_280_Chrom.1:PLRPS_10um_13.03.2020.001_001
Cond_Chrom.1:PLRPS_10um_13.03.2020.001_001
Conc_B_Chrom.1:PLRPS_10um_13.03.2020.001_001
PreC_pressure_Chrom.1:PLRPS_10um_13.03.2020.001_
Fraction_Chrom.1:PLRPS_10um_13.03.2020.001_001
mAU
M-Маркер
1-Нагрузка
2-Фракция 12
3-Фракция 29
4-Фракция 30
5-Фракция 32
6-Фракция 34
7-Фракция 35
8-Фракция 43
9-нерасщепленный
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
40
26
17
10
4.6
1.7
ELISA
OD при 450 нм
нагрузка
элюат
промывка
12
29
31
32
33
34
35
36
37
контр. буфер
стандарт
Фракции
Waste

ФИГ.7



M-Маркер
1. LP2 растворимый
2. LP8 растворимый
3. LP9 растворимый
4. LP2 осадок
5. LP8 осадок
6. LP9 осадок

ФИГ.8