

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В  
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация  
Интеллектуальной Собственности  
Международное бюро



(10) Номер международной публикации  
**WO 2019/070162 A1**

(43) Дата международной публикации  
11 апреля 2019 (11.04.2019)

WIPO | PCT

(51) Международная патентная классификация:

C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)  
C12N 15/18 (2006.01) C07K 14/61 (2006.01)  
C12N 15/63 (2006.01)

GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2018/050040

(22) Дата международной подачи:  
12 апреля 2018 (12.04.2018)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:  
201791989 08 октября 2017 (08.10.2017) EA

(72) Изобретатель; и

(71) Заявитель: ДУХОВЛИНОВ, Илья Владимирович (DUKHOVLINOV, Илья Vladimirovich) [RU/RU]; ул. Средняя Подъячская д.13 кв.7 Санкт-Петербург, 190068, Saint-Petersburg (RU).

Декларации в соответствии с правилом 4.17:

— об авторстве изобретения (правило 4.17 (iv))

Опубликована:

— с отчётом о международной поиске (статья 21.3)  
— с перечнем последовательностей в соответствии с Правилom 5.2(a)  
— в черно-белом варианте; международная заявка в поданном виде содержит цвет или оттенки серого и доступна для загрузки из PATENTSCOPE.

(74) Агент: ФЕДОРОВА, Екатерина Алексеевна (FEDOROVA, Ekaterina Alekseevna); а/я 31 Санкт-Петербург, 197136, Saint-Petersburg (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH,

(54) Title: PRODUCTION STRAIN OF SOMATOTROPIN, PRIMARILY IN MONOMERIC FORM

(54) Название изобретения: ШТАММ-ПРОДУЦЕНТ СОМАТОТРОПИНА ПРЕИМУЩЕСТВЕННО МОНОМЕРНОЙ ФОРМЫ

(57) Abstract: The invention relates to molecular biology, biotechnology and medicine, and may be used to produce human growth hormone. Proposed is a plasmid DNA for the synthesis of human growth hormone in Escherichia coli cells, which is represented by the vector pET-21a(+), wherein the sequence from T7 promoter to lac operator is modified and described by SEQ ID NO:3, with a gene insert that codes for the protein described by amino acid sequence SEQ ID NO:1 and that has an optimised codon composition for expression in Escherichia coli cells. Also proposed is a human growth hormone production strain based on Escherichia coli cells BL21 (DE3) transformed with the plasmid DNA described. Using the proposed inventions makes it possible to achieve a significant increase in the output of the monomeric form of somatotropin, up to 80%.

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



WO 2019/070162 A1

## Описание

### Название изобретения: Штамм-продуцент соматотропина преимущественно мономерной формы

[0001] Изобретение относится к молекулярной биологии, биотехнологии, медицине и может быть использовано для производства гормона роста человека Техническая область

#### Предшествующий уровень техники

[0002] Гормон роста человека (соматотропин, соматропин, соматотропный гормон) – один из гормонов передней доли гипофиза. Вызывает выраженное ускорение линейного (в длину) роста, в основном за счет роста длинных трубчатых костей конечностей. Соматотропин оказывает мощное анаболическое и анти-катаболическое действие, усиливает синтез белка и тормозит его распад, а также способствует снижению отложения подкожного жира, усилению сгорания жира и увеличению соотношения мышечной массы к жировой. Кроме того, соматотропин принимает участие в регуляции углеводного обмена – он вызывает выраженное повышение уровня глюкозы в крови и является одним из антагонистов инсулина по действию на углеводный обмен. Описано также его действие на островковые клетки поджелудочной железы, иммуностимулирующий эффект, усиление поглощения кальция костной тканью и др.

[0003] Терапевтическое применение соматотропина:

[0004] 1. Для лечения нарушений роста у детей.

[0005] 2. Для лечения нервных расстройств. В некоторых работах показано, что соматотропин улучшает память и познавательные функции, особенно у больных с недостаточностью соматотропной функции гипофиза, и что введение соматотропина может улучшать настроение и самочувствие больных с низким уровнем соматотропина в крови.

[0006] 3. Для профилактики старческих заболеваний

[0007] 4. Применение в спортивной медицине в качестве анаболического препарата.

[0008] Для получения соматотропина известно использование многих штаммов *Escherichia coli* – продуцентов на основе клеток W3110 (RU2287574C2, RU2433185C2, RU2337968C2, CN103173440 (A), AU731758 (B2), US5496713 (A), WO2005067601 (A2), US5932439 (A), EP0587427 (A1), CN104561020 (A)), K-12 (294, X1776, BE1201, RV308, MKD3207) (RU2337968C2, US4859600 (A), RU2287574C2, RU2433185C2, US4874703 (A), EP0089666 (A2), RU2031121C1),

JM (83, 101, 105, 109) (EA200601793A1, WO2005067601 (A2), JPH0771495 (B2), AU731758 (B2)), B (RU2433185C2, EP0089666 (A2)), MT (012, 10675-10853) (AU731758 (B2), US5496713 (A), JPH09216832 (A)), HB101 (JPS60234584 (A), EP0587427 (A1), US4518690 (A)), MC1061 (JPH0771495 (B2), US6010875 (A)), ATCC №39384, 39386 (EP0173215 (A2)), D1210 (EP0067540 (A2)), HM10011-HM10020 (KR20020080108 (A)), YK537 (CN103882015 (B)), chil776 (WO2005067601 (A2)), JA221 (WO2005067601 (A2)), C41 (DE3), C43 (De3) (CN103882015 (B)), K802 (RU1248280), Rosetta, Rosetta (DE3) (CN103882015 (B)), BL21, BL21 (DE3) (RU2002133932A, WO2014046484 (A1), CN103882015 (B), WO2011103325 (A1), NZ555206 (A), WO2004005335 (A2), US2010041153 (A1), US2011237509 (A1), WO2009057622 (A1).

[0009] В ряде таких штаммов получаемый целевой белок – секретируемый, либо накапливаемый в периплазматическом пространстве, однако больший выход белка возможно получить, если белок накапливается в тельцах включения. Штаммы с таким типом накопления соматотропина составляют часть приведенных выше. Однако от качества получаемых телец включения зависит выход белка, пригодного для применения, - мономеров соматотропина, - при дальнейшей очистке. Задачей, на решение которой направлено создание настоящего изобретения, является создание штамма-продуцента соматотропина, позволяющего получить больший выход мономерной формы соматотропина, по сравнению с известными штаммами.

[0010] Известен штамм-продуцент соматотропина на основе клеток *E.coli* BL21 (DE3) и вектора pET22b(+), белок синтезируется без His-тага, в тельцах включения (RU2002133932A). Данный штамм, а также содержащаяся в нем плаزمида являются прототипом.

[0011] Авторами настоящего изобретения выявлено с использованием штамма на основе клеток *E.coli* BL21 (DE3) и вектора pET-21(+), белок синтезируется без His-тага, в тельцах включения, что специфичное изменение T7 промотора и lac оператора позволяет достичь значительного увеличения выхода мономерной формы соматотропина, - на 34%, с 46% до 80%.

[0012] Технический результат от использования созданных плазмидной ДНК и штамма – в значительном увеличении выхода мономерной формы соматотропина. Данный технический эффект достигается благодаря изменению кинетики накопления целевого белка в клетке за счет внесения специфичных мутаций в T7 промотор и lac оператор плазмидной ДНК.

[0013] Технический результат от использования группы изобретений выражается также в расширении спектра плазмид и штаммов-продуцентов для получения соматотропина, что немаловажно, учитывая широкое применение данного

белка. Клинический опыт показал, что, оптимизируя лечение низкорослости, целесообразно иметь в арсенале несколько аналогичных фармацевтических препаратов, получаемых различными технологиями или даже методами. Длительное лечение (годами) одним препаратом соматотропина вызывает в организме уменьшение чувствительности к нему (<http://xn--80aqkbgchgn.xn--p1ai/poluchenie-gormona-rosta-v-biotehno>).

### **Краткое изложение изобретения**

- [0014] Предложена плазмидная ДНК pET-21a(+)*somat* для синтеза гормона роста человека в клетках *Escherichia coli*, представленная вектором pET-21a(+), последовательность с T7 промотора по lac оператор охарактеризована SEQ ID NO:3, содержащим вставку гена, кодирующего белок гормон роста человека, охарактеризованный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, оптимизированного по кодонному составу для экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Последовательность с T7 промотора по lac оператор вектора pET-21a(+), охарактеризованная SEQ ID NO:3, является модифицированной: в T7 промотор введена мутация A6G, в lac оператор – мутации T22G, T23G. Последовательность расположения элементов в плазмидной ДНК понятна среднему специалисту в данной области.
- [0015] Оптимизация по кодонному составу для организма экспрессии целевого гена может быть осуществлена вручную, либо с использованием специализированного программного обеспечения, например, на сайте [molbiol.ru](http://molbiol.ru), либо [encorbio.com/protocols/Codon.htm](http://encorbio.com/protocols/Codon.htm), на основе аминокислотной последовательности белка.
- [0016] Также предложен штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET-21a(+) - продуцент гормона роста человека, на основе клеток *Escherichia coli* BL21 (DE3), трансформированных описанной плазмидной ДНК.
- [0017] Изобретение проиллюстрировано следующими графическими материалами.

### **Краткое описание чертежей**

- [0018] Фиг.1. Графики, демонстрирующие кинетику накопления соматотропина при индукции экспрессии кодирующего его гена в клетках штамма-продуцента с вариантами строения T7 промотора и lac оператора: ось абсцисс – время, часы, ось ординат – процент целевого белка от общего; график, построенный по «точкам», - кинетика накопления соматотропина при строении T7 промотора и lac оператора как охарактеризовано SEQ ID NO:4, построенный по «треугольникам», - как охарактеризовано SEQ ID NO:2, построенный по «квадратам», - как охарактеризовано SEQ ID NO:3.
- [0019] Фиг.2. Электрофореграмма плазмидной ДНК pET-21a(+)*somat*, 0,8%

агарозный гель: 1 – маркер молекулярного веса DNA ladder GeneRuler 1 kb; 2 – отрицательный контроль – данная плазмидная ДНК без обработки рестриктазами; 3-6 - данная плазмидная ДНК, обработанная рестриктазой: 3 - HindIII; 4 – BglIII; 5 – NdeI; 6 – XhoI;

- [0020] Фиг.3. Электрофореграмма плазмидной ДНК pET-21a(+)*somat*, 0,8% агарозный гель: 1 – маркер молекулярного веса DNA ladder GenRuler 1 kb; 2 – отрицательный контроль – данная плазмидная ДНК без обработки рестриктазами; 3 – 8 - данная плазмидная ДНК, обработанная рестриктазами: 3 - HindIII+BglIII; 4 – HindIII+NdeI; 5 – HindIII+XhoI; 6 –BglIII+NdeI; 7 – BglIII+XhoI; 8 – NdeI+XhoI.

### Примеры

- [0021] Авторами настоящего изобретения проведены лабораторные исследования, подтверждающие возможность реализации охарактеризованных изобретений. Полученные результаты исследований проиллюстрированы следующими примерами.
- [0022] Пример 1. Создание плазмидной ДНК pET-21a(+)*somat* – вариантов с различиями в T7 промоторе и lac операторе
- [0023] 1.1. Создание нуклеотидной последовательности, кодирующей гормон роста человека, и вариантов фрагмента плазмидной ДНК pET-21a(+) с T7 промотора по lac оператор
- [0024] Аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, характеризующую гормон роста человека, без сигнальной последовательности, переводили в нуклеотидную с одновременной кодонной оптимизацией для экспрессии в клетках *E.coli* с использованием программы на сайте molbiol.ru и добавлением старт- и стоп-кодона, в одном из вариантов двух стоп-кодонов, а также сайтов рестрикции, фланкирующих получаемый ген. Рассчитанную нуклеотидную последовательность синтезировали химическим методом с помощью синтезатора ДНК ASM-800 (БИОССЕТ, Россия).
- [0025] Был синтезирован также фрагмент плазмидной ДНК pET-21a(+), ограниченный сайтами рестрикции Bgl II и Xba I, содержащий T7 промотор и lac оператор, а именно три его варианта, содержащие, соответственно, нуклеотидные последовательности SEQ ID NO:2 - SEQ ID NO:4, характеризующие варианты фрагмента плазмидной ДНК pET-21a(+) с T7 промотора по lac оператор, - (1) без мутаций, (2) с мутацией A6G в T7 промоторе и с мутациями T22G, T23G в lac операторе, (3) с мутацией C7G в T7 промоторе и с мутацией T16C в lac операторе.
- [0026] 1.2. Создание вариантов плазмидной ДНК pET-21a(+)*somat*
- [0027] Полученные фрагменты ДНК, а также вектор pET-21a(+) (Novagen, США)

обрабатывали соответствующими рестриктазами по инструкции к данным ферментам. Далее полученные фрагменты очищались с использованием препаративного электрофореза и использовались в реакции лигирования.

[0028] Осуществлялась реакция лигирования очищенных рестрицированных фрагментов ДНК в очищенный рестрицированный вектор последовательно. Реакционная смесь содержала 2 мкл очищенного рестрицированного фрагмента ДНК, 3,5 мкл 10X буфера для лигазы (1X буфер содержит 10 mM Tris-HCl (pH 7,5 при 37°C), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 0,1 мг/мл бычий сывороточный альбумин (BCA)) (Thermo Fisher Scientific Inc.), 3,5 мкл 50% полиэтиленгликоля 4000, 1 мкл рестрицированного вектора, 5 мкл T4 лигазы (Thermo Fisher Scientific Inc.). Реакционная смесь доводилась до 35 мкл безнуклеазной водой и инкубировалась при 22°C в течение 4 часов. Ферментативная реакция останавливалась инкубацией реакционной смеси при 65°C в течение 15 минут.

[0029] Смесь очищали от солей диализом на нитроцеллюлозных фильтрах с диаметром пор 0,025 мкм (Millipore, США). Диализ проводили против раствора, содержащего 0,5 mM ЭДТА в 10% глицерине, в течение 10 мин..

[0030] 1.3. Создание штамма (вариантов) на основе клеток *Escherichia coli* DH10B/R для амплификации полученной плазмидной ДНК (вариантов)

[0031] Подготавливали компетентные клетки *Escherichia coli* штамма DH10B/R (Gibco BRL, США) с генотипом F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM 15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara,leu)769 galU galKλ- rpsL nupG, и далее осуществляли их трансформацию полученной лигазной смесью.

[0032] Подготавливали клетки *E. coli* для трансформации полученной плазмидной ДНК – получали компетентные клетки - следующим образом. Инкубировали клетки при +37°C в течение 16ч в 5 мл L-бульона, содержащего 1% триптон, 1% дрожжевой экстракт и 1% натрий хлористый. Разводили культуру свежим L-бульоном в 50-100 раз и выращивали на качалке при +37°C до оптической плотности 0,2-0,3 при длине волны 590 нм. При достижении оптической плотности более 0,3 культуру разводили свежим L-бульоном до оптической плотности 0,1 и растили 30 мин. Переносили 100 мл культуры в стерильную центрифужную пробирку и осаждали клетки при +4°C на 5000g в течение 10 мин. Супернатант сливали, клетки ресуспендировали в 50 мл 0,1 M CaCl<sub>2</sub>, охлажденного на льду. Инкубировали клетки 20 мин на льду. Осаждали клетки в течение 10 мин. при 5000 об./мин, +4°C. Супернатант сливали, клетки ресуспендировали в 3 мл 0,1 M CaCl<sub>2</sub>, охлажденного на льду.

[0033] Трансформацию полученных компетентных клеток осуществляли методом электропорации. Использовали электропоратор Eporator (Eppendorf,

Германия) и стерильные кюветы для электропорации (Eppendorf, Германия), объемом 100 мкл, щель 1 мм.

[0034] К 12 мкл компетентных клеток добавляли 1 мкл десятикратно разведенной лигазной смеси, осуществляли перемешивание и перенос в кювету, которую помещали в электропоратор. Трансформацию проводили при электрическом импульсе напряженностью 1,7 кВ длительностью 5 мсек. После трансформации клетки помещали в 1 мл SOC-среды (2% бактотриптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM глюкоза) и инкубировали в течение 40 минут при 37°C, после чего вмазывали в LB-агар с антибиотиком на чашке Петри и инкубировали 16 ч при 37°C.

[0035] Выросшие на чашке Петри с ампициллином клоны E.coli анализировали на наличие используемой в настоящем эксперименте плазмидной ДНК, с одновременным переносом анализируемых клонов клеток E.coli на отдельные чашки Петри с селективной средой. Из таких клонов выделяли плазмидную ДНК и анализировали секвенированием с использованием специфичных праймеров. Это позволило отобрать клоны-продуценты разработанных плазмидных ДНК (вариантов). Данные штаммы использовали для получения вариантов плазмидной ДНК pET-21a(+)-somat.

[0036] 1.4. Получение вариантов плазмидной ДНК pET-21a(+)-somat

[0037] Нарботку и выделение плазмидной ДНК осуществляли следующим образом. Единичную колонию клеток продуцента плазмид E.coli, выращенную на LB-агаре в чашке Петри с добавлением ампициллина, инокулировали в стандартную жидкую среду LB (Gibco BRL, США), 2–10 мл, содержащую ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, и осуществляли ферментацию при 37°C в термостатированном шейкере роторного типа в течение 16 ч при 250 об./мин. Полученную культуру бактериальных клеток осаждали центрифугированием при 4000g в течение 10 мин. при +4°C. Удаляли супернатант и из осадка клеток выделяли плазмидную ДНК с помощью набора для выделения плазмидной ДНК (Цитокин, Россия), по инструкции к набору. Выделенную плазмидную ДНК анализировали электрофорезом в 0,8%-ном агарозном геле.

[0038] Пример 2. Создание штамма-продуцента соматотропина преимущественно мономерной формы

[0039] 2.1. Создание штамма-продуцента гормона роста человека на основе клеток Escherichia coli BL21 (DE3) (вариантов)

[0040] Выделенными согласно описанной в Примере 1 методике вариантами плазмидной ДНК pET-21a(+)-somat, с различиями в строении T7 промотора и

лас оператора трансформировали клетки E.coli штамма BL21 (DE3) (Invitrogen, USA), с генотипом F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3), содержащие в геноме  $\lambda$ De3 лизоген и мутацию rne131. Мутированный ген rne (rne131) кодирует усеченную форму РНКазы E, что уменьшает внутриклеточное разрушение мРНК, приводя к увеличению ее ферментативной стабильности. lon- и ompT-мутации по генам протеаз позволяют получать не-протеолизированные рекомбинантные белки в больших количествах.

[0041] Получали компетентные клетки E.coli BL21(DE3) и трансформировали их полученной плазмидной ДНК (вариантами) как описано в Примере 1, вместо десятикратно разведенной лигазной смеси использовали раствор плазмиды в воде. Выросшие клоны проверяли на наличие целевой плазмидной ДНК с использованием секвенирования выделенной плазмидной ДНК. В итоге выбрали клон клеток E.coli, который далее использовали для получения гормона роста человека (штамм-продуцент), варианты.

[0042] 2.2. Выявление штамма-продуцента соматотропина преимущественно мономерной формы из созданных вариантов

[0043] 2.2.1. Индукция синтеза соматотропина в штамме-продуценте (вариантах)

[0044] Индукцию экспрессии получали и с использованием ИПТГ, и 0,2% лактозы.

[0045] 2.2.1.1. при индукции синтеза соматотропина 0.2% лактозой по методу Штудиера

[0046] Для культивирования полученных штаммов-продуцентов использовали стандартную агаризованную LB-среду, содержащую ампициллин в концентрации 50 мкг/мл и глюкозу в концентрации 1% для блокирования неспецифической экспрессии.

[0047] Индукцию экспрессии проводили при достижении культурой клеток оптической плотности 0.6-0.8 оптических единиц при длине волны 600 нм.

[0048] Для автоиндукции экспрессии по методу Штудиера использовали среду RYP-5052, состоящую из 1% пептона (Gibco, США), 0.5% дрожжевого экстракта (Gibco, США), 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0.5% глицерола, 0.05% глюкозы и 0.2% лактозы, в качестве индуктора использовали 0.2% лактозу (Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. Protein Expr Purif. 2005 May;41(1):207-34).

[0049] В среду RYP-5052, содержащую ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, инокулировали единичную колонию штамма-продуцента (варианта). Ферментацию проводили при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об. мин. в течение 14 часов до отсутствия существенного изменения ОП600 за 1 час. Отбирали аликвоту на анализ экспрессии гена, ко-



- дирующего соматотропин, методом электрофореза в ПААГ, каждый час, по окончании индукции биомассу осаждали центрифугированием при 9000g.
- [0050] 2.2.1.2. при индукции синтеза соматотропина ИПТГ
- [0051] Индукцию экспрессии гена с использованием ИПТГ осуществляли следующим образом. Инкубировали клетки единичной колонии штамма-продуцента (вариантов) при +37°C в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин. в течение 16ч в LB среде (1% триптон, 1% дрожжевой экстракт и 1% натрий хлористый), содержащей ампициллин в концентрации 50 мкг/мл. Разводили культуру свежей LB средой в 50 раз и выращивали в термостатированном шейкере роторного типа при 250 об./мин. +37°C до достижения культурой клеток оптической плотности 0.6-0.8 оптических единиц при длине волны 600 нм. После этого осуществляли индукцию экспрессии рекомбинантного гена добавлением ИПТГ к культуре до конечной концентрации от 1 мМ до 2 мМ. Индукцию проводили в течение 14 часов, отбирали пробу для анализа с использованием SDS-PAGE каждый час, по окончании индукции биомассу осаждали центрифугированием.
- [0052] 2.2.2. Анализ отобранных проб
- [0053] Клетки ресуспендировали в лизирующем буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl pH 7,5, 5 мМ ЭДТА и 1 мМ феноксиметилсульфонилфторид, из расчета на 1 г клеток 5-7 мл буфера. Суспензию клеток обрабатывали ультразвуком 7 раз по 30 сек с интервалом в 30 сек (частота ультразвука составляет 22 кГц), отбирали пробу на анализ SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis with Sodium dodecyl sulfate). Процент содержания целевого белка от общего белка при использовании анализируемых трех штаммов-продуцентов соматотропина приведен на графиках Фиг.1.
- [0054] Лизат центрифугировали 10 мин. при +4°C, 5000 g. Отбирали пробу надосадочной жидкости (супернатанта) и осадка для анализа локализации белка и оценки его растворимости, с использованием SDS-PAGE. Анализ продемонстрировал нерастворимость полученного соматотропина.
- [0055] 2.2.1.3. Описание кинетики накопления соматотропина
- [0056] Кинетика накопления соматотропина в клетках штамма-продуцента (вариантов) была выявлена с использованием денситометрического сканирования электрофореграмм спектра белков, полученного из лизатов клеток E.coli штамма-продуцента (вариантов) после индукции экспрессии, с помощью программы ImageJ, и оказалась сходной при индукции экспрессии 0,2% лактозой и ИПТГ (от 1 мМ до 2 мМ) и приведена на Фиг.1.
- [0057] 2.2.2. Рефолдинг
- [0058] После окончания индукции осажденную биомассу лизировали с помощью 3

циклов соникации по 30 сек с перерывом в 2 мин на льду. Затем трехкратно отмывали тельца включения 0.2 М дезоксихолятом натрия, что позволяло получить препарат без примесей бактериальных эндотоксинов.

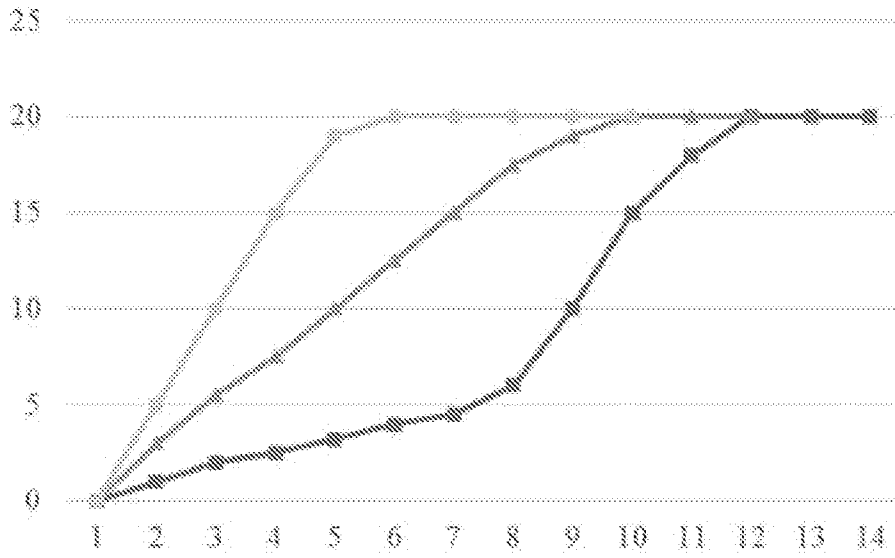
- [0059] Растворяли тельца включения в 8 М растворе мочевины, затем осуществляли рефолдинг белка в буфере для рефолдинга (0.1М Tris pH 8.0, 0.2 mM ЭДТА) с 0.5 М L-аргинином.
- [0060] Проводили хроматографическую очистку полученного раствора белка. Около 1200 мл обессоленного супернатанта помещали на 20 мл S-Sepharose колонку, уравновешенную 20 mM Tris-HCl pH 8.0. Колонку отмывали 200 мл 50 mM Tris pH 8.0, белок элюировали 160 мл линейного градиента 50 mM Tris pH 8.0 1M NaCl. Фракция очищенного на S-Sepharose гормона роста человека была помещена на S-100 колонку (2.5\*80 см), предварительно уравновешенную фосфатным буфером. Собирали фракции по 1 мл, анализировали электрофоретически в 20% ПААГ-ДДС-Na, фракции с целевым белком объединяли, концентрацию белка в них определяли по методу Бредфорд. Колонку откалибровывали с использованием 10 мг бычьего сывороточного альбумина, овальбумина и соевого трипсинового ингибитора.
- [0061] Формы соматотропина анализировали с использованием электрофореза в ПААГ при нанесении препаратов рефолдированного соматотропина, полученных с использованием трех штаммов и двух типов индукторов.
- [0062] Удалось получить наибольший процент мономерной формы соматотропина, 80%, при использовании штамма-продуцента со строением T7 промотора и lac оператора как охарактеризовано SEQ ID NO:3. 46% Мономерной формы соматотропина получили с использованием штамма-продуцента со строением T7 промотора и lac оператора как охарактеризовано SEQ ID NO:2, т.е. оригинального для вектора pET-21a(+). При внесении же мутаций в данные элементы как охарактеризовано SEQ ID NO:4 получили значительное уменьшение выхода мономерной формы соматотропина при рефолдинге, до 21%. Полученные данные подтверждают не-тривиальность предложенного решения.
- [0063] Таким образом, оптимальным для получения высокого процента мономерной формы соматотропина является использование штамма *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET-21a(+), со строением T7 промотора и lac оператора плазмидной ДНК pET-21a(+), как охарактеризовано SEQ ID NO:3.
- [0064] Пример 3. Характеристика штамма-продуцента соматотропина преимущественно мономерной формы
- [0065] 3.1. Рестрикционный анализ
- [0066] Из полученного штамма-продуцента мономерной формы соматотропина

выделяли плазмидную ДНК как описано выше.

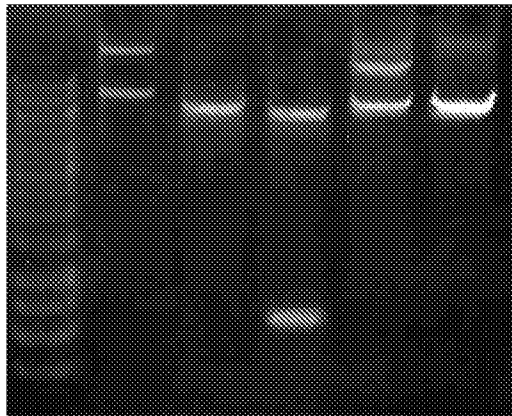
- [0067] При обработке выделенной плазмидной ДНК эндонуклеазами рестрикции наблюдали картину, приведенную на Фиг. 2 и 3, которая характеризует созданный штамм-продуцент соматотропина преимущественно мономерной формы. Соответствие полученных результатов ожидаемым было подтверждено.
- [0068] 3.2. Культуральные характеристики
- [0069] Культуральные свойства Грам-отрицательные прямые палочки, размером 1,1-1,5-2,0-3,0 мкм, одиночные, спор и капсул не образуют. Каталазоположительные. Оксидазоотрицательные. Факультативные анаэробы. Интервал рН 5-7. Катализируют D-глюкозу и некоторые другие углеводы с образованием кислоты и газа, не сбраживают лактозу, арабинозу и галактозу. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная, не образуют H<sub>2</sub>S, но гидролизуют мочевины.
- [0070] Ростовые характеристики Клетки растут в интервале температур от 8°C до 43°C, интервал для культивирования – 28-38°C, оптимум роста при 37°C.
- [0071] Описание визуальных и цитологических наблюдений при стандартных условиях культивирования Клетки хорошо растут на простых питательных средах, содержащих и не содержащих ампициллин. На агаризованной среде – колонии гладкие, круглые, слабо выпуклые, с ровным краем. В жидких средах образуют равномерную светорассеивающую суспензию, при хранении без перемешивания оседают на дно.

## Формула

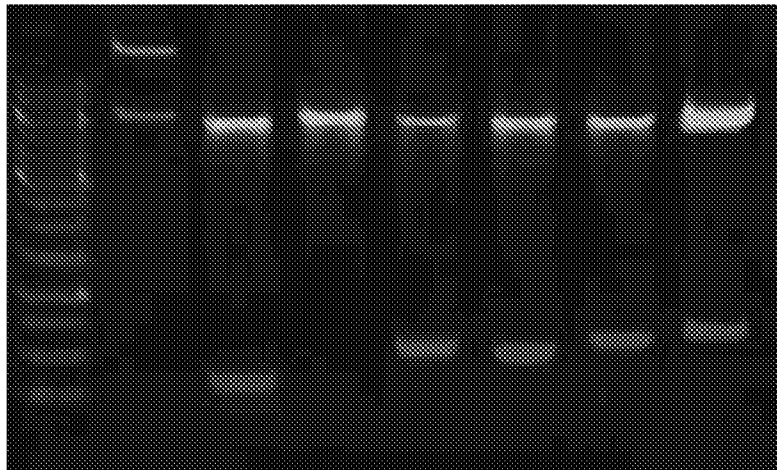
- [Пункт 1] Плазмидная ДНК pET-21a(+)*somat* для синтеза гормона роста человека в клетках *Escherichia coli*, представленная вектором pET-21a(+), последовательность с T7 промотора по *lac* оператор охарактеризована SEQ ID NO:3, содержащим вставку гена, кодирующего белок гормон роста человека, охарактеризованный аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, оптимизированного по кодонному составу для экспрессии в клетках *Escherichia coli*.
- [Пункт 2] Штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3)/pET-21a(+) - продуцент гормона роста человека на основе клеток *Escherichia coli* BL21 (DE3), трансформированных плазмидной ДНК по п.1.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/RU 2018/050040

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 1/21 (2006.01); C12N 15/18 (2006.01); C12N 15/63 (2006.01); C12N 15/70 (2006.01); C07K 14/61 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 1/21, C12N 15/18, C12N 15/63, C12N 15/70, C07K 14/61 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSearch (RUPTO internal), USPTO, PAJ, K-PION, Esp@cenet, Information Retrieval System of FIPS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RU 2233879 C1 (INSTITUT BIOORGANICHESKOI KHIMII IM.AKADEMIKOV M.M.SHEMYAKINA I JU.A.OVCHINNIKOVA RAN) 10.08.2004	1-2
A	US 2015/0210746 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF STANDARDS AND SCIENCE) 30.07.2015	1-2
A	CN 103882015 A (XI Y.) 25.06.2014	1-2
A	GHAVIM M. et al. High level expression of recombinant human growth hormone in Escherichia coli: crucial role of translation initiation region. Research in Pharmaceuticals Sciences, April 2017; 12(2): 168-175	1-2
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 29 October 2018 (29.10.2018)		Date of mailing of the international search report 08 November 2018 (08.11.2018)
Name and mailing address of the ISA/ RU		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2018/050040

<p>A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ</p> <p style="text-align: right;"><i>C12N 1/21 (2006.01)</i> <i>C12N 15/18 (2006.01)</i> <i>C12N 15/63 (2006.01)</i> <i>C12N 15/70 (2006.01)</i> <i>C07K 14/61 (2006.01)</i></p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>																	
<p>B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p style="text-align: center;">C12N 1/21, C12N 15/18, C12N 15/63, C12N 15/70, C07K 14/61</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p> <p style="text-align: center;">PatSearch (RUPTO internal), USPTO, PAJ, K-PION, Esp@cenet, Information Retrieval System of FIPS</p>																	
<p>C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Категория*</th> <th style="width: 70%;">Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th style="width: 20%;">Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>RU 2233879 C1 (ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ.АКАДЕМИКОВ М.М.ШЕМЯКИНА И Ю.А.ОВЧИННИКОВА РАН) 10.08.2004</td> <td style="text-align: center;">1-2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>US 2015/0210746 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF STANDARDS AND SCIENCE) 30.07.2015</td> <td style="text-align: center;">1-2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>CN 103882015 A (XI Y.) 25.06.2014</td> <td style="text-align: center;">1-2</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>GHAVIM M. et al. High level expression of recombinant human growth hormone in Escherichia coli: crucial role of translation initiation region. Research in Pharmaceuticals Sciences, April 2017; 12(2): 168-175</td> <td style="text-align: center;">1-2</td> </tr> </tbody> </table>			Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	A	RU 2233879 C1 (ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ.АКАДЕМИКОВ М.М.ШЕМЯКИНА И Ю.А.ОВЧИННИКОВА РАН) 10.08.2004	1-2	A	US 2015/0210746 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF STANDARDS AND SCIENCE) 30.07.2015	1-2	A	CN 103882015 A (XI Y.) 25.06.2014	1-2	A	GHAVIM M. et al. High level expression of recombinant human growth hormone in Escherichia coli: crucial role of translation initiation region. Research in Pharmaceuticals Sciences, April 2017; 12(2): 168-175	1-2
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №															
A	RU 2233879 C1 (ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ.АКАДЕМИКОВ М.М.ШЕМЯКИНА И Ю.А.ОВЧИННИКОВА РАН) 10.08.2004	1-2															
A	US 2015/0210746 A1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF STANDARDS AND SCIENCE) 30.07.2015	1-2															
A	CN 103882015 A (XI Y.) 25.06.2014	1-2															
A	GHAVIM M. et al. High level expression of recombinant human growth hormone in Escherichia coli: crucial role of translation initiation region. Research in Pharmaceuticals Sciences, April 2017; 12(2): 168-175	1-2															
<p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы C.      <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении</p>																	
<p>* Особые категории ссылочных документов:</p> <p>“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>“Е” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованно, экспонированию и т.д.</p> <p>“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p>	<p>“Т” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>“Х” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>“У” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>“&amp;” документ, являющийся патентом-аналогом</p>																
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p style="text-align: center;">29 октября 2018 (29.10.2018)</p>	<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p style="text-align: center;">08 ноября 2018 (08.11.2018)</p>																
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП-3, Россия, 125993 Факс: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37</p>	<p>Уполномоченное лицо:  Сонина Л.  Телефон № (495) 531-65-15</p>																