



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

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

Примечание: библиография отражает состояние при переиздании

(52) СПК

C12N 15/74 (2006.01); C12N 15/11 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2017103888, 06.02.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.02.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 06.02.2017

(43) Дата публикации заявки: 06.08.2018 Бюл. № 22

(45) Опубликовано: 19.11.2018

(15) Информация о коррекции:
Версия коррекции №1 (W1 C2)

(48) Коррекция опубликована:
11.01.2019 Бюл. № 02

Адрес для переписки:
197110, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7,
ФГУП "Гос.НИИ ОЧБ" ФМБА России,
Урусовой М.Е.

(72) Автор(ы):

Колобов Алексей Александрович (RU),
Кондратьева Екатерина Владимировна (RU),
Нимирицкий Петр Петрович (RU),
Кудлинг Татьяна Викторовна (RU),
Сергеева Дарья Сергеевна (RU),
Карасёв Максим Михайлович (RU),
Петров Александр Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное унитарное
предприятие "Государственный
научно-исследовательский институт особо
чистых биопрепаратов" Федерального
медико-биологического агентства (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2582569 C2, 27.04.2016. RU
2575621 C1, 20.02.2016.

П.П.НИМИРИЦКИЙ и др.
Фундаментальная наука и клиническая
медицина — Человек и его здоровье: Тезисы
XVIII Международной медико-
биологической конференции молодых
исследователей, посвященной
двадцатилетию медицинского факультета
СПбГУ. ISSN 2221-5654, 2015 г.
Издательство СПбГУ Санкт-Петербург,
(см. прод.)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗМЕТИОНИНОВОГО РЕЦЕПТОРНОГО АНТАГОНИСТА ИНТЕРЛЕЙКИНА-36, ШТАММ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* BL21[DE3] - ПРОДУЦЕНТ БЕЗМЕТИОНИНОВОГО РЕЦЕПТОРНОГО АНТАГОНИСТА ИНТЕРЛЕЙКИНА-36 (ВАРИАНТЫ), СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ, ПЛАЗМИДНЫЕ ВЕКТОРЫ pBAD15A и pET15A И ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ДНК ДЛЯ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к технологии получения рецепторного антагониста интерлейкина-36, и представляет собой плазмидный экспрессионный вектор pBAD15A для получения

безметионинового рекомбинантного рецепторного антагониста интерлейкина-36 (ИЛ-36РА) человека, карта которого приведена на Фиг. 2, плазмидный экспрессионный вектор pET15A для получения безметионинового

рекомбинантного ИЛ-36РА человека, карта которого приведена на Фиг. 3, а также штамм - продуцент безметионинового рекомбинантного ИЛ-36РА человека. Изобретения позволяют

получить более активный ИЛ-36РА с более высоким выходом. 5 н.п. ф-лы, 12 ил., 4 табл., 7 пр.

(56) (продолжение):

стр.377-378. RU 2473556 C1, 27.01.2013. WO 2009088255 A2, 16.07.2009. RU 2122864 C1, 10.12.1998. RALPH RAPLEY, DAVID WHITEHOUSE Molecular Biology and Biotechnology, 2014, Royal Society of Chemistry, p. 83. US 20170009240 A1, 12.01.2017.

RU 2 6 7 2 8 1 6 C 9

RU 2 6 7 2 8 1 6 C 9



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

Note: Bibliography reflects the latest situation

(52) CPC

C12N 15/74 (2006.01); *C12N 15/11* (2006.01)(21)(22) Application: **2017103888, 06.02.2017**(24) Effective date for property rights:
06.02.2017

Priority:

(22) Date of filing: **06.02.2017**(43) Application published: **06.08.2018** Bull. № 22(45) Date of publication: **19.11.2018**

(15) Correction information:

Corrected version no1 (W1 C2)

(48) Corrigendum issued on:

11.01.2019 Bull. № 02

Mail address:

**197110, Sankt-Peterburg, ul. Pudozhskaya, 7,
FGUP "Gos.NII OCHB" FMBA Rossii, Urusovoj
M.E.**

(72) Inventor(s):

**Kolobov Aleksej Aleksandrovich (RU),
Kondrateva Ekaterina Vladimirovna (RU),
Nimiritskij Petr Petrovich (RU),
Kudling Tatyana Viktorovna (RU),
Sergeeva Darya Sergeevna (RU),
Karasev Maksim Mikhajlovich (RU),
Petrov Aleksandr Vladimirovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe unitarnoe
predpriyatie "Gosudarstvennyj
nauchno-issledovatel'skij institut osobo chistyx
biopreparatov" Federalnogo
mediko-biologicheskogo agentstva (RU)**

(54) **THE METHOD OF PRODUCTION OF INTERLEUKIN-36 RECEPTOR ANTAGONIST WITH CLEAVED N-TERMINAL METHIONINE, ESCHERICHIA COLI BL21[DE3] STRAIN PRODUCING INTERLEUKIN-36 RECEPTOR ANTAGONIST WITH CLEAVED N-TERMINAL METHIONINE (VARIANTS), METHOD OF THEIR CONSTRUCTION, PLASMID VECTORS pBAD15A AND pET15A AND DNA SEQUENCE FOR THEIR CONSTRUCTION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, in particular to a technology of Interleukin-36 receptor antagonist production, and constitutes the plasmid expression vector pBAD15A for production of human Interleukin-36 receptor antagonist (IL-36Ra) with cleaved N-terminal methionine, the map of said vector is shown on Fig. 2, the plasmid expression vector pET15A for production

of human Interleukin-36 receptor antagonist (IL-36Ra) with cleaved N-terminal methionine, the map of said vector is shown on Fig. 3, as well as the strain producing the human Interleukin-36 receptor antagonist (IL-36Ra) with cleaved N-terminal methionine.

EFFECT: inventions allow to obtain more active IL-36Ra with a higher yield.

5 cl, 12 dwg, 7 ex, 4 tbl

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к генно-инженерным препаратам медицинского назначения и технологии их получения, точнее к технологии получения рецепторного антагониста интерлейкина-36.

Интерлейкины-36 альфа, бета и гамма (IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ), а также рецепторный антагонист интерлейкинов-36 (IL-36Ra) представляют собой отдельную группу в семействе интерлейкина-1 [Gresnigt M.S., van de Veer-donk F.L. Biology of IL-36 cytokines and their role in disease // *Semin. Immunol.* 2013. Vol. 25, №6. P. 458-465]. Интерлейкины группы IL-36 синтезируются в основном в эпителиальных тканях и в коже, не имеют сигнальных пептидов и поэтому не могут секретироваться по обычному секреторному пути [Vigne S. et al. IL-36R ligands are potent regulators of dendritic and T cells // *Blood.* 2011. Vol. 118, №22. P. 5813-5823.].

IL-36 (α, β, γ) играют важную роль в активации воспалительного процесса в коже и в легких. В частности, ряд экспериментальных данных свидетельствует о возможном участии IL-36 в развитии псориаза и воспалительных заболеваний дыхательных путей и суставов [Ramadas R.A. et al. IL-36 α exerts pro-inflammatory effects in the lungs of mice // *PloS One.* 2012. Vol. 7, №9. P. e45784.; Vigne S. et al. IL-36R ligands are potent regulators of dendritic and T cells // *Blood.* 2011. Vol. 118, №22. P. 5813-5823.; Foster A.M. et al. IL-36 promotes myeloid cell infiltration, activation, and inflammatory activity in skin // *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. 2014. Vol. 192, №12. P. 6053-6061]. В ряде исследований было показано, что некоторые мутации в гене рецепторного антагониста интерлейкина-36 (ИЛ-36РА) способны вызывать генерализованный пустулезный псориаз (ГПП) - смертельно опасную форму псориаза, которая поражает большие участки кожи и характеризуется периодическими обострениями, гиперлейкоцитозом и повышением уровня С-реактивного белка в крови [Sugiura K. et al. The Majority of Generalized Pustular Psoriasis without Psoriasis Vulgaris Is Caused by Deficiency of Interleukin-36 Receptor Antagonist // *J. Invest. Dermatol.* 2013. Vol. 133, №11. P. 2514-2521.; Farooq M. et al. Mutation analysis of the IL36RN gene in 14 Japanese patients with generalized pustular psoriasis // *Hum. Mutat.* 2013. Vol. 34, №1. P. 176-183; Griffiths C.E.M., Barker J.N.W.N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis // *Lancet Lond. Engl.* 2007. Vol. 370, №9583. P. 263-271.; Zelicson B.D., Muller S.A. Generalized pustular psoriasis. A review of 63 cases // *Arch. Dermatol.* 1991. Vol. 127, №9. P. 1339-1345.].

Учитывая, что ГПП вызывается, как правило, недостатком активности ИЛ-36РА [Sugiura K. et al. The Majority of Generalized Pustular Psoriasis without Psoriasis Vulgaris Is Caused by Deficiency of Interleukin-36 Receptor Antagonist // *J. Invest. Dermatol.* 2013. Vol. 133, №11. P. 2514-2521.; Farooq M. et al. Mutation analysis of the IL36RN gene in 14 Japanese patients with generalized pustular psoriasis // *Hum. Mutat.* 2013. Vol. 34, №1. P. 176-183; Hussain S. et al. IL36RN mutations define a severe autoinflammatory phenotype of generalized pustular psoriasis // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015. Vol. 135, №4. P. 1067-1070.e9], перспективным подходом к терапии этого заболевания представляется введение в организм экзогенного ИЛ-36РА. Кроме того, терапия, направленная на подавление воспаления, опосредованного ИЛ-36, могла бы применяться и для лечения других форм псориаза, а также прочих воспалительных заболеваний кожи в связи с тем, что IL-36Ra способен активировать противовоспалительный каскад, взаимодействуя с рецептором SIGIRR [Costelloe C. et al. IL-1F5 mediates anti-inflammatory activity in the brain through induction of IL-4 following interaction with SIGIRR/TIR8 // *J. Neurochem.* 2008. Vol. 105, №5. P. 1960-1969.].

Наиболее близким к настоящей группе изобретений являлась ранее разработанная авторами технология получения рецепторного антагониста ИЛ-36 (IL-36Ra),

включающая в себя последовательности ДНК, кодирующие полноразмерный IL-36Ra; экспрессионный вектор pET-IL36Raf, а также штамм бактерий *Escherichia coli* BL21Star [DE3](pET-IL36Raf), содержащий вектор pET-IL36Raf - продуцент полноразмерного IL-36Ra человека (RU 2582569, 2016).

5 Недостатком использования данной группы изобретений является получение препарата с недостаточно высокой антагонистической активностью.

Технической задачей, решаемой авторами являлось разработка технологии получения рекомбинантного биологически активного IL-36Ra человека с более высокой активностью.

10 В основу заявляемого решения было положено предположение, что активность IL-36Ra может быть повышена за счет удаления из его молекулы N-концевого остатка метионина в результате ее обработки метионинаминопептидазой.

Технический результат достигался созданием группы изобретений, включающей в себя:

15 - технологию получения безметионинового IL-36Ra человека на основе штаммов, трансформированных плазмидным вектором, содержащим ген метионинаминопептидазы, с последующим выделением и концентрированием целевого продукта;

- варианты штаммов, трансформированных плазмидным вектором, содержащим 20 ген метионинаминопептидазы штамм бактерий *Escherichia coli* BL21Star[DE3] (pET-IL36Raf, pBAD15A) и штамм бактерий *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf, pET15A);

- способы их конструирования, заключающаяся в трансформации штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3] плазмидными векторами с индукцией экспрессии генов рецепторного антагониста интерлейкина-36 человека (ИЛ-36РА) и метионинаминопептидазы (МАП).

25 - плазмидный экспрессионный вектор pBAD15A для трансформации штамма бактерий *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf, pBAD15A)

- плазмидный экспрессионный вектор pET15A штамм бактерий *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf, pET15A)

30 - последовательность ДНК, кодирующая метионинаминопептидазу, для получения плазмидных векторов.

Последовательность ДНК, кодирующая метионинаминопептидазу, была амплифицирована с использованием в качестве матрицы ДНК из культуры бактерий штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3]. По концам к гену были добавлены олигонуклеотиды, формирующие сайты рестрикции NdeI и XhoI. (Полученная 35 последовательность ДНК приведена на SEQ ID No 1.)

Ген был обработан вышеуказанными рестриктазами и клонирован в подготовленный аналогичным образом вектор pBAD22, полученный из вектора pET22b+, с получением промежуточного плазмидного вектора pBAD22/MAP.

40 Затем ген метионинаминопептидазы с регуляторными последовательностями был клонирован из плазмиды pBAD22/MAP в плазмиду pACYC184 по сайтам рестрикции HindIII и SalI с получением экспрессионного плазмидного вектора pBAD15A, карта которого приведена на фиг. 2.

Плазмидный экспрессионный вектор pBAD15A содержит ген метионинаминопептидазы *E. coli* (MAP), промотор pBADara, терминаторы транскрипции 45 гена *rrnB* (*rrnB* T1T2), регуляторную последовательность *araBAD* оперона, ориджин репликации плазмид p15A, ген хлорамфеникол ацетил-трансферазы (CamR), рестрикционные сайты, необходимые для объединения отдельных фрагментов в векторе (SalI, HindIII, XhoI, NdeI).

Плазмидный экспрессионный вектор pET15A был получен аналогичным образом. Ген метионинаминопептидазы *E. coli* был клонирован в вектор pET302/NT-His по рестрикционным сайтам EcoRI и BamHI с получением промежуточной плазмиды pET302/MAR. Затем ген метионинаминопептидазы с регуляторными последовательностями
 5 был клонирован из плазмиды pET302/MAR в плазмиду pACYC184 по сайтам рестрикции HindIII и SalI с получением экспрессионного плазмидного вектора pET15A, карта которого приведена на фиг. 3.

Плазмидный экспрессионный вектор pET15A (фиг. 3), содержит ген метионинаминопептидазы *E. coli* (MAR) под контролем регулируемого промотора T7, терминатор транс-крипции T7, ориджин репликации p15A, ген хлорамфеникол ацетил-
 10 трансферазы (CamR), рестрикционные сайты, необходимые для объединения отдельных фрагментов в векторе (EcoRI, BamHI, HindIII, SalI).

Полученные штаммы *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf, pBAD15A) и *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf, pET15A) характеризуются одинаковыми
 15 культурально-морфологическими и физико-биохимическими свойствами:

Культурально-морфологические особенности штаммов. Грам-отрицательные прямые палочки, размером 1,1-1,5×2,0-3,0 мкм, одиночные, спор и капсул не образуют. Каталазоположительные. Оксидазоотрицательные. Факультативные анаэробы. Клетки хорошо растут на простых питательных средах, содержащих и не содержащих
 20 ампициллин и хлорамфеникол, например, на среде LB. На агаризованной среде - колонии гладкие, круглые, слабо выпуклые, с ровным краем. В жидких средах образуют равномерную светорассеивающую суспензию, при хранении без перемешивания оседают на дно. Клетки растут в интервале температур от 8°C до 43°C, интервал для культивирования - 28-38°C, оптимум роста при 37°C. Интервал pH 5-8. Катализируют
 25 D-глюкозу и некоторые другие углеводы с образованием кислоты и газа, не сбраживают галактозу. Реакция Фогес-Проскауэра отрицательная, не образуют H₂S, гидролизуют мочевины.

Характеристики полезного вещества, синтезируемого штаммами.

Рекомбинантный белок - рецепторный антагонист интерлейкинов-36 человека с
 30 отщепленным N-концевым остатком метионина (безметиониновый рецепторный антагонист интерлейкинов - 36 человека).

Активность штаммов. Продуктивность штаммов - рекомбинантный IL-36Ra составляет не менее 3% массы белков клеточного лизата при культивировании в условиях
 35 индукции.

Криоконсервация. В запаянных ампулах, штаммы лиофильно-высушенные в среде, содержащей 0,8-1,2% сахарозы и 0,8-1,2% маннитола, хранится при комнатной
 40 температуре в течение 20 лет.

Культивирование штаммов. Культивирование при температуре 28-38°C в термостате или качалке, в агаризованной (2% агара) или жидкой LB-среде, соответственно.
 40 Селективные условия - добавление 50-125 мкг/мл ампициллина и 20-40 мкг/мл хлорамфеникола.

Ферментация. Для ферментации полученных штаммов используют 1-2 кратную среду LB в 0,8-1,2 кратной среде M9 с добавлением 50-125 мкг/мл ампициллина и 20-40 мкг/мл хлорамфеникола. Культуры растят в колбах объемом 0,5-2,5 л (предпочтительно 2
 45 л) при температуре 35-38°C (предпочтительно +37°C) до плотности 2-5 ОЕ/мл (предпочтительно 3 ОЕ/мл). При этой оптической плотности вносят индуктор - IPTG 0,1-1 мМ (предпочтительно 0,5 мМ). В случае штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3] (pET-IL36Raf, pBAD15A) вносят также арабинозу 0,1-1% (предпочтительно 0,2%).

Индукцию продолжают в течение 2-4 ч (предпочтительно 3 ч) при температуре 27-37°C (предпочтительно +30°C).

Метод очистки рекомбинантного ИЛ-36РА из биомассы штаммов-продуцентов включает в себя лизис клеток путем добавления Tris-буферного раствора, после чего полученный лизат осветляют, а затем очищают от примесных белков хроматографией последовательно на сорбенте Q FF (GE) и сорбенте Butyl-650 (Tosoh) и концентрирование ультрафильтрацией с помощью ячейки с перемешиванием Millipore Amicon Stirred Cell при использовании мембраны Sartorius Ultracel PLC10 с последующим диализом.

Лизис, как правило, проводят с использованием буферного раствора, содержащего от 30 до 70 мМ Tris-HCl (оптимально 50 мМ), pH от 6,8 до 7,2 (оптимально 7,0).

Лизат осветляют центрифугированием при 5-12 тыс. об./мин, после чего к полученному супернатанту добавляют раствор кальция хлорида до конечной концентрации от 20 до 40 мМ (оптимально 30) и раствор тринатрия фосфата до конечной концентрации от 10 до 30 мМ (оптимально 20), перемешивают, а затем снова осветляют центрифугированием при 5-12 тыс. об./мин.

Хроматографию на Q FF (GE) проводят на сорбенте уравновешенным буферным раствором, содержащим 30-70 мМ Tris-HCl (оптимально 50 мМ), pH 6,8-7,2 (оптимально 7,0), с последующей отмывкой буферным раствором, содержащим 30-70 мМ Tris-HCl (оптимально 50 мМ), 0-0,3М NaCl (оптимально 0,15), pH 6,8-7,2 (оптимально 7,0).

Колонку регенерируют буферным раствором, содержащего 30-70 мМ Tris-HCl (оптимально 50 мМ), 1,5-2М NaCl (оптимально 2М), pH 6,8-7,2 (оптимально 7,0).

Очистка целевого белка от примесных белков на сорбенте Butyl-650 (Tosoh) проводится следующим образом. Добавляют аммония сульфат до 0,15-0,5 М (оптимально 0,3). К несвязавшейся фракции после хроматографии на Q FF (GE), содержащую ИЛ-36РА, добавляют аммония сульфат до 0,15-0,5 М (оптимально 0,3), затем наносят на сорбента Butyl-650 (Tosoh), уравновешенный 0,3 ± 0,05 л буферным раствором, содержащим 30-70 мМ Na₂HPO₄ (оптимально 50 мМ), 0,15-0,5 М (NH₄)₂SO₄ (оптимально 0,3), pH 5,8-6,2 (оптимально 6,0). Затем ИЛ-36РА элюируют буферным раствором, содержащим 30-70 мМ Na₂HPO₄ (оптимально 50 мМ), pH 5,8-6,2 (оптимально 6,0). Колонку регенерируют 0,5 ± 0,1 л дистиллированной воды.

Концентрирование ИЛ-36РА проводят методом ультрафильтрации с помощью ячейки с перемешиванием Millipore Amicon Stirred Cell с установленной мембраной Sartorius Ultracel PLC 10 с пределом отсечения 10 кДа, а затем проводят смену раствора диализом белка против раствора, содержащего 30-70 мМ натрия цитрата (оптимально 50 мМ), pH 5,8-6,2 (оптимально 6,0).

После этого раствор белка может быть при необходимости стерилизован с использованием шприцевых фильтров Millipore Millex с диаметром пор 0,22 мкм.

После всех стадий очистки получаемый ИЛ-36РА имеет чистоту >95% по ОФ-ВЭЖХ, имеет <5% примеси непротессированной формы с неотщепленный инициаторным остатком метионина и <5% дезамидированной формы.

При необходимости для лучшего хранения технология получения ИЛ-36РА может быть дополнена введением в целевой продукт 20-100 мМ нитратного буферного раствора (оптимально 50 мМ) с pH 5,5-6,5 (оптимально 6,0), твин-80 в количестве 0,01-1% и ЭДТА в количестве 0,1-10 мМ.

Полученный препарат был апробирован на модели псориазоподобного дерматита, вызванного кожной аппликацией агониста Толл-подобных рецепторов 7 и 8 имихимода [van der Fits L. et al. Imiquimod-induced psoriasislike skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis // J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2009. Vol. 182, №9. P. 5836-

5845.]. Было показано, что ежедневное подкожное введение разработанного препарата рекомбинантного ИЛ-36РА человека в дозах 50 ± 1 и 10 ± 1 мкг/мышь значительно снижает тяжесть экспериментального дерматита, вызванного имихимодом. При этом эффект появляется в пределах 3-4 дней после первого введения препарата и превосходит эффект контрольного препарата - метотрексата.

Сущность изобретения иллюстрируется последовательностями и рисунками.

Фиг. 1. Нуклеотидная последовательность гена метионинаминопептидазы *E. coli*.

Фиг. 2. Карта плазмидного вектора pBAD15A, несущего последовательность гена метионинаминопептидазы, где:

МАР - ген метионинаминопептидазы *E. coli*

pBADara promoter - прокариотический промотор, необходимый для инициации транскрипции генов

rrnB T1T2 terminators - терминаторы транскрипции гена rrnB *E. coli*

araBAD operon - регуляторная последовательность araBAD оперона, необходимая

для регуляции экспрессии генов, находящихся под контролем промотора pBADara

p15A origin - сайт начала репликации плазмид

CamR - последовательность гена хлорамфеникол ацетилтрансферазы, обеспечивающей устойчивость бактерий к хлорамфениколу

Sall, HindIII, XhoI, NdeI - рестрикционные сайты, необходимые для объединения

отдельных фрагментов в векторе

Фиг. 3. Карта плазмидного вектора pET15A, несущего последовательность гена метионинаминопептидазы, где

МАР - последовательность гена метионинаминопептидазы

T7 promoter - промотор фага T7, необходимый для инициации транскрипции генов

T7 terminator - терминатор транскрипции генов фага T7

lacI - последовательность гена lacI, регулирующего экспрессию генов, находящихся под контролем промотора T7.

p15A origin - сайт начала репликации плазмид

CamR - последовательность гена хлорамфеникол ацетилтрансферазы, обеспечивающей устойчивость бактерий к хлорамфениколу EcoRI, BamHI, HindIII, Sall - рестрикционные сайты, необходимые для объединения отдельных фрагментов в векторе

Фиг. 4. Электрофореграмма лизатов биомассы различных штаммов-продуцентов ИЛ-36РА после культивирования в условиях добавления индукторов и без их добавления. Толстой синей стрелкой отмечена полоса, соответствующая ИЛ-36РА;

тонкой белой стрелкой отмечена полоса, соответствующая МАП.

1 - Лизат биомассы штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3]

2 - Лизат биомассы штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf) без индукции

3 - Лизат биомассы штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf) после индукции

4 - Лизат биомассы штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf) без индукции,

иной метод лизиса

5 - Лизат биомассы штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf) после индукции, иной метод лизиса

6 - Лизат биомассы штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf, pET15A) без индукции

7 - Лизат биомассы штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf, pET15A) после индукции

8 - Лизат биомассы штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf, pBAD15A) без индукции

9 - Лизат биомассы штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf, pBAD15A) после индукции

Фиг. 5. Сравнение продукции ИЛ-36РА различными штаммами-продуцентами с помощью твердофазного ИФА с использованием моноклональных антител к ИЛ-36РА.

5 Обозначения соответствуют присутствующей в штамме плазмиде с геном МАП:

«pBAD15A» - штамм *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf, pBAD15A)

«pET15A» - штамм *Escherichia coli* BL21 Star[DE3](pET-IL36Raf, pET15A) «без коэкспрессии с МАП» - штамм *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf)

10 Фиг. 6. Сравнение примеси непротессированной формы ИЛ-36РА, содержащей инициаторный остаток метионина, в образцах ИЛ-36РА, полученных от различных штаммов-продуцентов. Обозначения соответствуют присутствующей в штамме плазмиде с геном МАП:

«pBAD15A» - штамм *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf, pBAD15A)

15 «pET15A» - штамм *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf, pET15A) «без коэкспрессии с МАП» - штамм *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf)

Фиг. 7. Электрофореграмма фракций, полученных при хроматографической очистке ИЛ-36РА. Стрелкой отмечена полоса, соответствующая ИЛ-36РА.

1 - осветленный лизат биомассы штамма-продуцента ИЛ-36РА *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf, pBAD15A)

20 2 - фракция, не связавшаяся с Q

3 - фракция, не связавшаяся с Butyl-650

4 - фракция, элюировавшаяся с Butyl-650

5 - проходящая фракция после ультрафильтрационного концентрирования

6 - маркер молекулярных весов

25 Фиг. 8. Хроматограмма ОФ-ВЭЖХ разделения образца ИЛ-36РА после хроматографической очистки.

Фиг. 9. Наложение хроматограмм ОФ-ВЭЖХ разделения образцов ИЛ-36РА, полученных при коэкспрессии с МАП и без коэкспрессии с МАП.

30 Фиг.10. Электрофореграмма разделения нативной (1) и дезамидированной (2) форм ИЛ-36РА в КЗЭФ.

Фиг. 11. Изменение индекса PASI в опытных и контрольной группах (* $p < 0,01$ по сравнению с соответствующими значениями контрольной группы). По оси ординат - степень выраженности признаков псориазоподобного дерматита в баллах.

35 Фиг. 12. Изменение толщины уха в месте нанесения имихимода в опытных и контрольной группах (* $p < 0,05$ по сравнению с соответствующими значениями контрольной группы). По оси ординат - индекс изменения толщины уха в месте нанесения имихимода.

Сущность и промышленная применимость заявляемой группы изобретений иллюстрируется следующими примерами

40 Пример 1. Конструирование экспрессионных плазмидных векторов.

Конструирование промежуточной плазмиды pBAD22. Плазида pBAD22 содержит в своем составе ген бета-лактамазы, обеспечивающей устойчивость к антибиотикам бета-лактаманной группы, сайт репликации pBR322, а также регулирующие элементы и промотор оперона araBAD, позволяющие индуцировать и регулировать экспрессию

45 целевого белка посредством изменения концентрации арабинозы в среде.

На первом этапе модифицировали плазмиду pBAD (ThermoFisher Scientific, USA): удаляли участок плазмиды, содержащий сайт рестрикции NdeI, а исходный полилинкер заменяли на полилинкер плазмиды pET22b(+) (Novagen, USA). С этой целью проводили

амплификацию фрагмента плазмиды pBAD с помощью пары 5'-фосфорилированных праймеров (длина продукта 3885 п.н.):

5'-GCTGCATGTGTCAGAGGTT-3'

5'-GCACAGATGCGTAAGGAGAA-3'

5 Допустимо использование праймеров в интервале концентраций от 5 до 25 мкМ, однако лучший результат достигается при использовании праймеров в концентрации 10 мкМ. Амплифицированный фрагмент обрабатывали лигазой, что привело к его замыканию в кольцо. Количество добавляемой лигазы может варьироваться от 0.5 до 5 ед., тем не менее, оптимальное количество - 1 ед. на реакцию. Затем полученную
10 плазмиду использовали в качестве матрицы во второй ПЦР со следующей парой праймеров (длина продукта 3793 п.н.):

5'-ATGCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTT-3'

5'-TAAGACGTCTCCAGCTTGGCTGT-3'

15 Допустимо использование праймеров в интервале концентраций от 5 до 25 мкМ, однако лучший результат достигается при использовании праймеров в концентрации 10 мкМ. Параллельно проводили ПЦР участка полилинкера на матрице pET22b(+) с помощью следующей пары праймеров (длина продукта 256 п.н.):

5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

5'-AGCGACGTCTTATCAGTGGTGGTGGTGGT-3'

20 Допустимо использование праймеров в интервале концентраций от 5 до 25 мкМ, однако лучший результат достигается при использовании праймеров в концентрации 10 мкМ. Концы амплифицированных фрагментов ДНК открывали с помощью рестриктаз NdeI и AatII и направленно лигировали друг с другом. Количество добавляемых рестриктаз может варьироваться от 0.1 до 1 ед., тем не менее, оптимальное
25 количество - 0.25 ед. каждой рестриктазы на 1 реакцию.

В результате была получена плаزمида pBAD22. Правильность сборки модифицированного участка плазмиды подтверждали секвенированием.

Конструирование промежуточных плазмид pET302/MAP и pBAD22/MAP Для получения промежуточных экспрессионных векторов использовали коммерческую
30 плазмиду pET302/NT-His (Thermo Fisher Scientific, USA) и плазмиду pBAD22.

Плазмиды pET302/NT-His содержат в своем составе регулирующие элементы и промотор T7lac, позволяющие индуцировать и регулировать экспрессию целевого белка посредством изменения концентрации IPTG в среде, а также ген бета-лактамазы, обеспечивающей устойчивость к антибиотикам бета-лактамной группы, и сайт
35 репликации pBR322.

На первом этапе последовательность гена метионинаминопептидазы (Фиг. 1) амплифицировали с геномной ДНК клеток E. coli BL21[DE3] с помощью следующей пары праймеров:

5'-GAACATATGGCTATCTCAATCAAGACCCCA-3'

40 5'-GAACTCGAGTTATTATTCGTCGTGCGAGATTA-3'

Допустимо использование праймеров в интервале концентраций от 5 до 25 мкМ, однако лучший результат достигается при использовании праймеров в концентрации 10 мкМ. Амплифицированный фрагмент ДНК размером 800 п.н., концы которого открывали с помощью рестриктаз NdeI и XhoI, клонировали в плазмиду pBAD22,
45 линеаризованную с помощью этих же рестриктаз. Количество добавляемых рестриктаз может варьироваться от 0.1 до 1 ед., тем не менее, оптимальное количество - 0.25 ед. каждой рестриктазы на 1 реакцию.

Для клонирования гена метионинаминопептидазы в плазмиду pET302/NT-His

использовали следующую пару праймеров:

5'-GAATTCAGCTATCTCAATCAAGACCCCA-3'

5'-GGATCCTTATTATTCGTCGTGCGAGATTA-3'

Допустимо использование праймеров в интервале концентраций от 5 до 25 мкМ, однако лучший результат достигается при использовании праймеров в концентрации 10 мкМ. Амплифицированный фрагмент ДНК размером 800 п. н., концы которого открывали с помощью рестриктаз EcoRI и BamHI, клонировали в плазмиду pET302/NT-His, линейаризованную с помощью этих же рестриктаз. Количество добавляемых рестриктаз может варьироваться от 0.1 до 1 ед., тем не менее, оптимальное количество - 0.25 ед. каждой рестриктазы на 1 реакцию.

В результате клонирования были получены плазмиды pBAD22/MAP и pET302/MAP, соответственно. Правильность сборки плазмид подтверждали секвенированием.

На втором этапе в полученных плаزمиде сайт репликации pBR322 и ген бета-лактамазы были заменены на сайт репликации p15A и ген устойчивости к хлорамфениколу из плазмиды pACYC184 (NEB). Данная модификация необходима для эффективной коэкспрессии двух белков с различных плазмид внутри одной клетки.

Конструирование экспрессионного вектора pBAD15A

Фрагмент последовательности ДНК, содержащий ген метионинаминопептидазы и регулирующие его экспрессию последовательности, амплифицировали с плазмиды pBAD22/MAP с помощью следующей пары праймеров:

5'-GATAAGCTTCTGTGCGCTGCATGTGTCAGAG-3'

5'-GAAGTCGACGTCCTACTCAGGAGAGCGTTCAC-3'

Допустимо использование праймеров в интервале концентраций от 5 до 25 мкМ, однако лучший результат достигается при использовании праймеров в концентрации 10 мкМ. Амплифицированный фрагмент ДНК размером 2529 п.н., концы которого открывали с помощью рестриктаз HindIII и SalI, клонировали в плазмиду pACYC184, линейаризованную с помощью этих же рестриктаз. Количество добавляемых рестриктаз может варьироваться от 0.1 до 1 ед., тем не менее, оптимальное количество - 0.25 ед. каждой рестриктазы на 1 реакцию.

В результате клонирования была получена плазида pBAD15A (Фиг. 2), содержащая ген метионинаминопептидазы под контролем регулируемого арабинозного промотора, сайт репликации p15A и ген устойчивости к хлорамфениколу для проведения селекции. Правильность сборки плазмиды подтверждали секвенированием.

Праймеры:

pBAD-HindIII-F 5'-GATAAGCTTCTGTGCGCTGCATGTGTCAGAG-3' FW Расположение - 3536-3557 п.н. плазмиды pBAD22/MAP. pBAD-SalI-R 5'-GAAGTCGACGTCCTACTCAGGAGAGCGTTCAC-3' RV Расположение - 1446-1468 п.н. плазмиды pBAD22/MAP.

Конструирование экспрессионного вектора pET15A

Фрагмент последовательности ДНК, содержащий ген метионинаминопептидазы и регулирующие его экспрессию последовательности, амплифицировали с плазмиды pET302/MAP с помощью следующей пары праймеров:

5'-GTTAAGCTTTCGGGTTACTGATGATGAACATG-3'

5'-GGAGTCGACATCCGGATATAGTTCCTCCTTTC-3'

Допустимо использование праймеров в интервале концентраций от 5 до 25 мкМ, однако лучший результат достигается при использовании праймеров в концентрации 10 мкМ. Амплифицированный фрагмент ДНК размером 3755 п.н., концы которого открывали с помощью рестриктаз HindIII и SalI, клонировали в плазмиду pACYC 184,

линеаризованную с помощью этих же рестриктаз. Количество добавляемых рестриктаз может варьироваться от 0.1 до 1 ед., тем не менее, оптимальное количество - 0.25 ед. каждой рестриктазы на 1 реакцию.

В результате клонирования была получена плазмида pET15A (Фиг. 3), содержащая ген метионинаминопептидазы под контролем регулируемого T7 промотора, сайт репликации p15A и ген устойчивости к хлорамфениколу для проведения селекции. Правильность сборки плазмиды подтверждали секвенированием.

Праймеры:

pET-HindIII-F 5'-GTTAAGCTCCGGGTTACTGATGATGAACATG-3' FW Расположение - 3788-3809 п.н. плазмиды pET302/MAP.

pRh15A-SalI-R 5'-GGAGTCGACATCCGGATATAGTTCCTCCTTTC RV

Расположение - 1048-1070 п.н. плазмиды pET302/MAP.

Пример 2. Получение штаммов культивируемых клеток - продуцентов безметионинового ИЛ-36РА человека

Для экспрессии гена ИЛ-36РА использовали созданный нами ранее плазмидный экспрессионный вектор pET-IL36Raf (RU 2582569, 2016). Электрокомпетентные клетки *E. coli* BL21 [DE3] трансформировали смесью плазмид pET-IL36Raf и pET15A в эквимолярном соотношении. Трансформацию проводили с помощью аппарата Bio-Rad MicroPulser (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя. Положительные трансформанты отбирали на агаризованной среде, содержащей смесь двух антибиотиков (ампициллин в конечной концентрации от 50 до 125 мкг/мл, предпочтительно 100 мкг/мл; и хлорамфеникол в конечной концентрации от 20 до 40 мкг/мл, предпочтительно 25 мкг/мл), что гарантировало содержание обеих плазмид в отобранных колониях. Наличие в трансформантах обеих плазмид также подтверждали путем ПЦР с использованием двух пар праймеров, специфических для гена ИЛ-36РА и гена МАП, соответственно. Полученный штамм получил название *Escherichia coli* BL21Star[DE3] (pET-IL36Raf, pET15A).

Для культивирования полученного штамма использовали 1-2х (предпочтительно 1,5х) среду LB (10-20 г/л (предпочтительно 15 г/л) триптона, 5-10 г/л (предпочтительно 7,5 г/л) дрожжевого экстракта, 4-6 (предпочтительно 5 г/л) хлорида натрия) в 0,8-1,2х (предпочтительно 1х) среде M9 (Na_2HPO_4 3,84-5,76 мМ (предпочтительно 4,8 мМ), KH_2PO_4 1,76-2,64 мМ (предпочтительно 2,2 мМ); NaCl 0,68-1,02 мМ (предпочтительно 0,85 мМ), NH_4Cl 1,5-2,24 мМ (предпочтительно 1,87 мМ), MgSO_4 0,8-1,2 мМ (предпочтительно 1 мМ), CaCl_2 0,08-0,12 мМ (предпочтительно 0,1 мМ) с добавлением антибиотиков в указанных выше концентрациях. Культуру засеивали до плотности 0,05-0,5 ОЕ (предпочтительно 0,1 ОЕ), растили 12-18 часов (предпочтительно 16 часов) при температуре 35-38°C (предпочтительно +37°C) и скорости перемешивания 150-300 об/мин (предпочтительно 250 об/мин). Затем эти культуры инокулировали в 1-2х LB (предпочтительно 1,5х LB) + 0,8-1,2х (предпочтительно 1х) M9 объемом 50-2500 мл (предпочтительно 200 мл) до плотности 0,1-1 ОЕ (предпочтительно 0,3 ОЕ) и растили в колбах объемом 0,5-2,5 л (предпочтительно 2 л) при температуре 35-38°C (предпочтительно +37°C) при скорости перемешивания 150-300 об/мин (предпочтительно 250 об/мин) до плотности 2-5 ОЕ/мл (предпочтительно 3 ОЕ/мл). При этой оптической плотности вносили индуктор - IPTG 0,1-1 мМ (предпочтительно 0,5 мМ).

Индукцию продолжали в течение 2-4 ч (предпочтительно 3 ч) при температуре 27-37°C (предпочтительно +30°C) при скорости перемешивания 150-300 об/мин (предпочтительно 250 об/мин). Затем биомассу бактерий собирали центрифугированием

со скоростью 2000-12000 g (предпочтительно 8000 g) при температуре 3-18°C (предпочтительно +4°C) в течение 15-60 мин (предпочтительно 30 мин). Вначале экспрессию белка ИЛ-36РА подтверждали путем электрофореза тотальных лизатов клеток (Фиг. 4). Затем уровень продукции ИЛ-36РА различными штаммами-
 5 продуцентами оценивали с помощью твердофазного ИФА с использованием моноклональных антител к ИЛ-36РА, полученных во ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» (Фиг. 5). Примесь непротессированной формы ИЛ-36РА, содержащей инициаторный остаток метионина, оценивали с помощью ОФ-ВЭЖХ (Фиг. 6, 9).

Пример 3. Получение штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf, pBAD15A).

10 Получение штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3](pET-IL36Raf, pBAD15A) и все работы с ним проводили по технологии, описанной в примере 2 с двумя отличиями: при его создании использовали плазмиду pBAD15A, а не pET15A, и при индукции вносили также арабинозу 0,2%).

Пример 4. Выделение рецепторного антагониста ИЛ-36.

15 После размораживания 150 ± 15 г биомассы бактерий из морозильной камеры (-70°C) до комнатной температуры к ней добавляли 1400 ± 50 мл буфера, содержащего от 30 до 70 mM Tris-HCl (оптимально 50 mM), pH от 6,0 до 7,2 (оптимально 7,0), и перемешивали на электрической мешалке в течение 45-75 минут (оптимально 60) до получения гомогенного раствора. Объем полученного лизата составлял 1500 ± 100 мл.
 20 Далее лизат переливали в пробирки для центрифугирования Beckman, помещали в ротор JA-10 и центрифугировали при скорости от 5000 до 12000 об./мин (оптимально 10000) в течение в течение 45-75 минут (оптимально 60). Осадок удаляли, а к супернатанту добавляли раствор кальция хлорида до конечной концентрации от 20 до 40 mM (оптимально 30) и раствор тринатрия фосфата до конечной концентрации от 10 до 30
 25 mM (оптимально 20). Полученный раствор перемешивали на электрической мешалке в течение ночи. Далее полученный раствор переливали в пробирки для центрифугирования Beckman, помещали в ротор JA-10 и центрифугировали при скорости от 5000 до 12000 об./мин (оптимально 10000) в течение в течение 45-75 минут (оптимально 60). Осадок удаляли, а супернатант наносили на хроматографический
 30 сорбент. Эта стадия подготовки сырья позволила удалить большую часть механических примесей, которые необратимо забивают хроматографический сорбент.

Хроматографическая очистка на сорбенте Q FF (300 ± 10 мл) позволяет очистить ИЛ-36РА от части примесных белков, а также липополисахаридов (ЛПС) и ДНК. Условия хроматографии подбирали таким образом, чтобы рецепторный антагонист
 35 ИЛ-36, в отличие от примесей, не связывался с сорбентом и оставался во фракции, не связавшейся с сорбентом. Фракцию собирали в объеме 2200 ± 200 мл, начиная с момента повышения УФ-поглощения проходящей фракции при 280 нм на 30 mAU по сравнению с уравнивающим буфером.

Объем сорбента: 300 ± 10 мл

40 Уравнивающий буфер: 30-70 mM Tris-HCl (оптимально 50 mM), pH 6,0-7,2 (оптимально 7,0) ($0,5 \pm 0,025$ л)

Отмывающий буфер: 30-70 mM Tris-HCl (оптимально 50 mM), 0-0,3M NaCl (оптимально 0,15), pH 6,0-7,2 (оптимально 7,0) ($0,7 \pm 0,035$ л) Регенерирующий буфер: 30-70 mM Tris-HCl (оптимально 50 mM), 1,5-2M NaCl (оптимально 2M), pH 6,0-7,2
 45 (оптимально 7,0) ($0,5 \pm 0,025$ л).

Таблица 1

Характеристика хроматографического процесса:

	Наименование хроматографического шага	Раствор	Объем раствора, л
1	Уравновешивание колонки	Уравновешивающий буфер	0,5±0,025
2	Нанесение лизата биомассы бактерий	Лизат	1,5±0,1
3	Отмывание от несвязавшейся фракции	Отмывающий буфер	0,7±0,035
4	Регенерация колонки	Регенерирующий буфер	0,5±0,025

Хроматографическая очистка на сорбенте Butyl-650 (100 ± 5 мл) предназначена для очистки целевого белка от примесных белков. На сорбент наносили не связавшуюся с сорбентом Q FF фракцию с добавлением аммония сульфата до 0,15-0,5 М (оптимально 0,3). Условия хроматографии подбирали таким образом, чтобы рецепторный антагонист ИЛ-36, в отличие от большинства примесей, связывался с сорбентом и затем элюировался при определенных условиях.

Объем сорбента: 100 ± 5 мл

Уравновешивающий буфер: 30-70 мМ Na₂HPO₄ (оптимально 50 мМ), 0,15-0,5 М (NH₄)₂SO₄ (оптимально 0,3), pH 5,8-6,2 (оптимально 6,0) (1,5 ± 0,2 л) Элюирующий буфер: 30-70 мМ Na₂HPO₄ (оптимально 50 мМ), pH 5,8-6,2 (оптимально 6,0) (0,4 ± 0,05 л) Регенерирующий буфер: дистиллированная вода

Характеристика хроматографического процесса:

	Наименование хроматографического шага	Раствор	Объем раствора, л
1	Уравновешивание колонки	Уравновешивающий буфер	0,3±0,05
2	Нанесение фракции, не связавшейся с Q FF	Фракция, не связавшаяся с Q FF	2,2±0,2
3	Отмывание от несвязавшейся фракции	Уравновешивающий буфер	1,2±0,15
4	Элюция	Элюирующий буфер	0,4±0,05
5	Регенерация колонки	Дистиллированная вода	0,5±0,1

Принципиально возможным представляется выделение ИЛ-36 исключительно с помощью гидрофобной хроматографии. В этом случае, однако, срок службы гидрофобного сорбента будет существенно сокращен, поэтому использование двухстадийной хроматографической очистки представляется более экономически

выгодным. Концентрирование белка проводили методом ультрафильтрации с помощью ячейки с перемешиванием Millipore Amicon Stirred Cell с установленной мембраной Sartorius Ultracel PLC 10 с пределом отсечения 10 кДа. Образец концентрировали до $10 \pm 0,3$ мг/мл. Затем проводили диализ белка против раствора, содержащего 30-70 мМ натрия цитрата (оптимально 50 мМ), pH 5,8-6,2 (оптимально 6,0), в диализном мешке MFPI CelluSep RC T2 с пределом отсечения 6-8 кДа. После этого раствор белка стерилизовали с использованием шприцевых фильтров Millipore Millex с диаметром пор 0,22 мкм. Общие потери ИЛ-36РА на всех этапах очистки составили $37,5 \pm 9,3\%$.

Таблица 3

Баланс процесса очистки

Образец	г (ИЛ-36РА)	Потери ИЛ-36РА на стадии	Общие потери ИЛ-36РА
Биомасса штамма-продуцента	1,200±0,2		
Осветлённый лизат биомассы	1,056±0,2	12±3%	12±3%
Фракция, не связавшаяся с Q	1,024±0,2	3±1%	15±4%
Фракция, элюировавшаяся с Butyl-650	0,809±0,2	21±5%	36±9%
Образец после ультрафильтрации	0,801±0,2	1±0,1%	37±9,1%
Образец после диализа	0,797±0,2	0,5±0,1%	37,5±9,2%
Образец после стерилизации	0,793±0,2	0,5±0,1%	37,5±9,3%

Электрофореграмма образцов с различных этапов очистки ИЛ-36РА представлена на Фиг. 7.

Пример 5. Анализ чистоты и гомогенности полученного ИЛ-36РА

Для определения количества белковых примесей в полученном ИЛ-36РА пробы ИЛ-36РА разделяли методом ВЭЖХ в обратной фазе на колонке Phenomenex Jupiter C18. 10 мкг (± 2 мкг) ИЛ-36РА в 20 мкл (± 4 мкл) раствора наносили на колонку в 50 мМ (±5 мМ) фосфатном буфере, pH 6,0 (допустимый интервал pH 5,8-6,2). Элюцию проводили градиентом ацетонитрила с 30% до 70% в 0,1% ТФУ, pH 2,5 (± 0,2), за 20 минут (± 5 мин) при скорости потока 1,5 мл/мин и температуре +35°C (± 2°C). Детектирование проводили на УФ-детекторе при длине волны 220 нм. Типовая хроматограмма ОФ-ВЭЖХ разделения ИЛ-36РА по этой методике представлена на Фиг. 8. Для определения примеси формы ИЛ-36РА, содержащей неотщепленный N-концевой остаток метионина, проводили ОФ-ВЭЖХ по методу, описанному выше. При этом элюцию проводили градиентом ацетонитрила с 39,6% до 40,8%), в остальных условиях были такими же. Типовая хроматограмма ОФ-ВЭЖХ разделения ИЛ-36РА по этой методике представлена на Фиг. 9. Для определения примеси дезамидированной формы ИЛ-36РА проводили капиллярный зонный электрофорез (КЗЭФ) на приборе «Капель-105М» (Люмэкс, Россия). Для анализа использовали непокрытые кварцевые капилляры с внутренним диаметром 50 мкм и полной длиной 50 см (± 5 см) (эффективная длина 40 см (± 5 см) (Люмэкс, Россия). Капилляр термостатировали при 25°C (± 2°C), детекцию осуществляли на длине волны 214 нм. В качестве фонового электролита использовали 0,12 М (± 20 мМ) раствор дигидрофосфата калия (pH 3 ((± 0,2)). Перед проведением анализа капилляр промывали 0,1 М (± 20 мМ) раствором гидроксида натрия, деионизованной водой и фоновым электролитом по 3 мин под давлением 2000 мбар ((± 100 мбар). Проба для капиллярного зонного электрофореза представляла собой

водный раствор рекомбинантного рецепторного антагониста интерлейкина-36 человека с концентрацией 0,5 мг/мл (допустимый диапазон концентраций 0,4 мг/мл - 0,6 мг/мл), содержащий 2 мкг (± 0.2 мкг) внутреннего стандарта - синтезированного пептида Trp-Glu-His-Arg. Ввод пробы осуществляли гидродинамически под давлением 40 мбар в течение 5 с. Анализ проводили при напряжении 10 кВ (± 2 кВ) в течение 35 минут (± 5 мин). Инструментальный контроль, сбор и регистрацию электрофоретических данных производили с помощью системы «Эльфран» (Люмэкс, Россия). Для идентификации пиков интактного белка и его дезамидированной формы рассчитывали относительное время миграции каждого из этих пиков (RMT), равное отношению времени миграции пика белка ко времени миграции внутреннего стандарта. Содержание дезамидированной формы белка рассчитывали по относительной площади пика (в процентах), равной отношению площади пика дезамидированной формы к сумме площадей пиков, соответствующих рекомбинантному рецепторному антагонисту интерлейкина-36 человека. На Фиг. 10 представлена электрофореграмма разделения нативной (А) и дезамидированной (Б) форм ИЛ-36РА в КЗЭФ.

После всех стадий очистки по результатам анализов получаемый ИЛ-36РА имеет чистоту $>95\%$ по ВЭЖХ, имеет $<5\%$ примеси непротессированной формы с неотщепленный инициаторным остатком метионина и $<5\%$ дезамидированной формы.

Пример 6. Создание композиции рекомбинантного ИЛ-36РА человека, устойчивой при хранении. При отработке условий хроматографической очистки ИЛ-36РА было обнаружено, что при экспозиции целевого белка $pH > 7,0$ наблюдается появление значительной примеси дезамидированной формы белка (Фиг. 10). Поэтому для получения гомогенного продукта условиях очистки были модифицированы так, чтобы pH был всегда не выше 7,0. Кроме того, при хранении белка в фосфатном буфере с pH 7,4 также было зафиксировано накопление дезамидированной формы. Однако при $pH < 5,5$ наблюдалась агрегация ИЛ-36РА, т.к. эти значения слишком близки к изоэлектрической точке белка - 5,28. Для стабилизации раствора ИЛ-36РА была разработана композиция, включающая 1-100 мМ цитратный или фосфатный буфер (оптимально 5 мМ) с pH 5,5-6,5 (оптимально 6,0), в котором по данным анализа стабильности дезамидирования белка не происходит. Также выбранная концентрация цитрата натрия или фосфата натрия пригодна для инъекционного введения человеку. Кроме того, для предотвращения агрегации ИЛ-36РА в состав композиции были введены твин-80 в количестве 0,01-1%. В концентрациях $<0,01\%$ твин-80 не уменьшал способность препарата к агрегации, концентрации твин-80 $>1\%$ не показывали дальнейшего улучшения свойств препарата. Для защиты препарата от возможного протеолиза в композицию был введен ингибитор металлопротеаз ЭДТА в количестве 0,1-10 мМ. Описанные эффекты суммированы в таблице 4.

Таблица 4

Характеристика параметров и ингредиентов композиции

	Диапазон значений	Негативный эффект
pH	<5,5	Агрегация
	5,5-6,5	Нет
	>6,5	Дезамидирование
Цитрат натрия или фосфат натрия	<1 мМ	Агрегация
	1-100 мМ	нет
	>100 мМ	Гипертонический раствор
Твин-80	<0,01%	Агрегация
	0,01-1%	Нет
	>1%	Без дальнейшего улучшения
ЭДТА	<0,1 мМ	Протеолиз
	0,1-10 мМ	Нет
	>10 мМ	Без дальнейшего улучшения

Пример 7. Оценка биологической активности композиции ИЛ-36РА на модели псориазоподобного дерматита у мышей

Для определения биологической активности полученного ИЛ-36РА применяли модель псориазоподобного дерматита у мышей индуцированного обработкой имихимодом - агонистом Толл-подобных рецепторов 7 и 8 [van der Fits L. et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis // J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2009. Vol. 182, №9. P. 5836-5845.]. Имихимод применяли на кожу в виде крема Алдара (5% имихимод). Эта модель псориаза широко применяется в научной практике и многократно описана в литературе [Stjernholm T. et al. Leptin-deficiency in mice counteracts imiquimod (IMQ)-induced psoriasis-like skin inflammation while leptin stimulation induces inflammation in human keratinocytes // Exp. Dermatol. 2016.; Li R. et al. Increased β TrCP are associated with imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice via NF- κ B signaling pathway // Gene. 2016.; Huang S.-W. et al. Azithromycin impairs TLR7 signaling in dendritic cells and improves the severity of imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice // J. Dermatol. Sci. 2016.].

Для индукции псориазоподобного дерматита крем Алдара наносили на кожу правого уха мышей трех групп один раз в день в дозе 55-68 мкг (оптимально 62,5 мкг), ежедневно, в течение 7-ми дней. Животные были разделены на 4 группы. Первая группа получала инъекцию 200 ± 5 мкл физиологического раствора подкожно в область холки ежедневно 1 раз в день; вторая и третья группа получала 50 ± 1 или 10 ± 1 мкг/мышь ИЛ-36РА, соответственно, в объеме 200 ± 5 мкл подкожно в область холки ежедневно 1 раз в день, четвертая группа получала раствор метотрексата в дозе 20 ± 1 мкг/мышь ежедневно внутривенно через зонд. Каждая группа включала 10 мышей. Ежедневно

проводили морфометрическое исследование толщины уха и визуальную оценку поражения кожи в месте нанесения препарата с последующим расчетом индекса PASI [van der Fits L. et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis // J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2009. Vol. 182, №9. P. 5836-5845.].

5 Было показано, что ежедневное нанесение препарата Алдара на кожу уха мышей, получавших инъекции физиологического раствора, оказало видимый эффект уже через 24 ч после первого нанесения. Были зафиксированы выраженная эритема и шелушение, достигающие максимума на 5-й день эксперимента. Морфометрическое исследование толщины уха показало достоверное увеличение данного параметра по сравнению с
10 интактными животными, начиная с 24 часов после первого нанесения крема Алдара. Анализ изменения индексов PASI, рассчитанных для всех групп животных в течение эксперимента, показал, что степень выраженности псориазоподобного дерматита была значительно снижена в группах, получавших изучаемый препарат рекомбинантного ИЛ-36РА человека в дозах 50 ± 1 и 10 ± 1 мкг/мышь, а также метотрексат в дозе 20 ± 1
15 мкг/мышь в сутки, по сравнению с таковой в контрольной группе, начиная с 3-го дня и на протяжении всего эксперимента (Фиг. 11). На 6-й день эксперимента эффективность препарата ИЛ-36РА в дозе 50 ± 1 мкг/мышь превзошла эффективность метотрексата. Морфометрическое исследование толщины уха показало, что в группе, получавшей исследуемый препарат в дозе 50 ± 1 мкг/мышь, индекс изменения толщины уха был
20 достоверно ниже по сравнению с контрольной группой, начиная с 3-го дня и до конца эксперимента. В группе животных, получавших метотрексат, этот показатель достоверно снижался только на 6-й и 7-й дни эксперимента (Фиг. 12).

Таким образом, было показано, что ежедневное подкожное введение разработанного препарата рекомбинантного ИЛ-36РА человека в дозах 50 ± 1 и 10 ± 1 мкг/мышь
25 значительно снижает тяжесть экспериментального дерматита, вызванного имихимодом. Эффект появляется в пределах 3-4 дней после первого введения препарата и превосходит эффект метотрексата.

(57) Формула изобретения

30 1. Плазмидный экспрессионный вектор pBAD15A для получения безметионинового рекомбинантного рецепторного антагониста интерлейкина-36 (ИЛ-36РА) человека путем культивирования штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3], содержащего плазмидный экспрессионный вектор pET-IL36Raf и упомянутый вектор, и последующего выделения ИЛ-36РА, содержащий:

- 35 - ген метионинаминопептидазы *E. coli*,
- промотор pBADara,
- терминаторы транскрипции гена *rrnB* (*rrnB* T1T2),
- регуляторную последовательность *araBAD* оперона,
- ориджин репликации плазмид p15A,
- 40 - ген хлорамфеникол ацетилтрансферазы (*CamR*) и
- рестрикционные сайты, необходимые для объединения отдельных фрагментов в векторе, карта которого приведена на Фиг. 2.

2. Плазмидный экспрессионный вектор pET15A для получения безметионинового рекомбинантного ИЛ-36РА человека путем культивирования штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3], содержащего плазмидный экспрессионный вектор pET-IL36Raf и
45 упомянутый вектор, и последующего выделения ИЛ-36РА, содержащий:

- ген метионинаминопептидазы *E. coli*,
- промотор фага T7,

- терминатор транскрипции генов фага T7,
- регуляторную последовательность гена *lacI*,
- ориджин репликации плазмид *p15A*,
- ген хлорамфеникол ацетилтрансферазы (*CamR*) и

5 - рестрикционные сайты, необходимые для объединения отдельных фрагментов в векторе, карта которого приведена на Фиг. 3.

3. Штамм - продуцент безметионинового рекомбинантного ИЛ-36РА человека, представляющий собой штамм *Escherichia coli* BL21Star[DE3], содержащий плазмидный экспрессионный вектор *pET-IL36Raf* и вектор по п. 1 или 2.

10 4. Способ получения штамма по п. 3, заключающийся в трансформации штамма *Escherichia coli* BL21Star[DE3] плазмидным экспрессионным вектором *pET-IL36Raf* и вектором по п. 1 или 2 с последующей индукцией экспрессии генов рецепторного антагониста интерлейкина-36 человека (ИЛ-36РА) и метионинаминопептидазы *E. coli*.

15 5. Применение препарата безметионинового рекомбинантного рецепторного антагониста интерлейкина-36 человека, полученного с использованием штамма по п. 3, для лечения дерматитов.

20

25

30

35

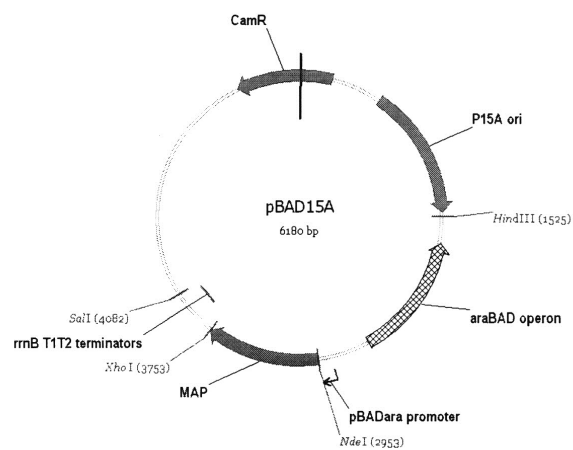
40

45

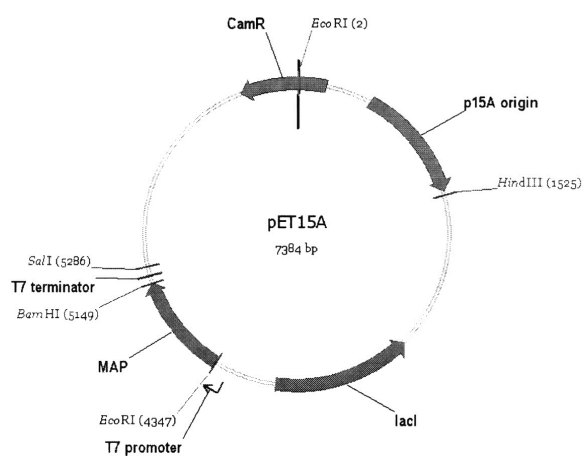
5'ATGGCTATCTCAATCAAGACCCCAGAAGATATCGAAAAAATGCGCGT
CGCTGGCCGACTGGCTGCCGAAGTGCTGGAGATGATCGAACCGTATGT
TAAACCGGGCGTCAGCACCGGCGAGCTGGATCGCATCTGTAATGATTA
CATTGTTAATGAACAACACGCGGTTTCTGCCTGCCTCGGCTATCACGGC
TATCCGAAATCCGTTTGCATCTCTATTAATGAAGTGGTGTGCCACGGTA
TCCCGGACGATGCTAAGCTGCTGAAAGATGGCGATATCGTTAACATTG
ATGTCACCGTAATCAAAGATGGTTTCCACGGCGATACCTCGAAAATGTT
TATCGTCGGTAAGCCGACCATCATGGGCGAACGTCTGTGCCGCATCAC
GCAAGAAAGCCTGTACCTGGCGCTACGCATGGTAAAACAGGCATTAA
TCTGCGCGAAATCGGTGCGGCGATTGAGAAATTTGTGGAAGCAGAAGG
CTTCTCCGTCGTTTCGTGAATATTGCGGACACGGTATTGGTCGCGGCTTC
CATGAAGAACCGCAGGTGCTGCACTATGACTCCCGTGAAACCAACGTC
GTAAGTAAACCTGGGATGACGTTACCATCGAGCCAATGGTCAACGCG
GGTAAAAAAGAGATCCGCACCATGAAAGATGGCTGGACGGTAAAAAC
CAAAGATCGCAGCTTGTCTGCACAATATGAGCATACTATTGTGGTGAAT
GATAACGGCTGCGAAATTCTGACGCTACGCAAGGATGACACCATCCCG
GCGATAATCTCGCACGACGAATAATAA3'

Фиг. 1

32

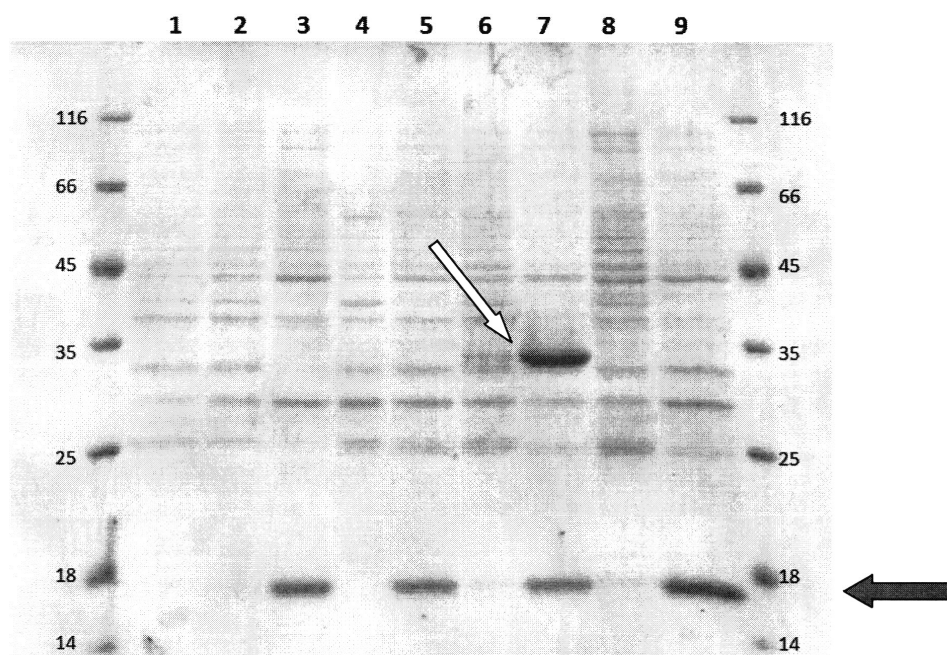


Фиг. 2

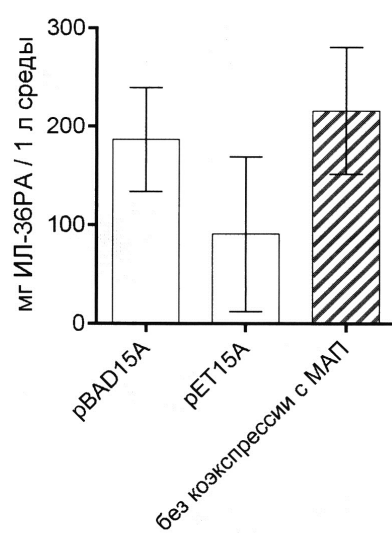


Фиг. 3

33

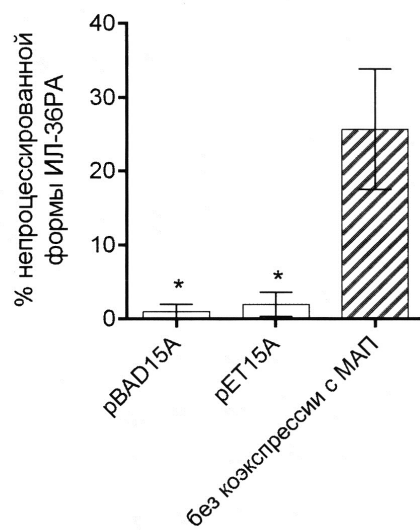


Фиг. 4

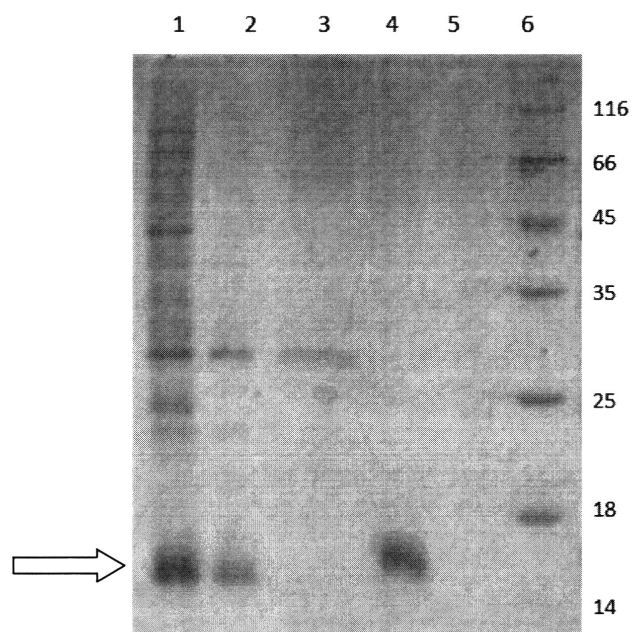


Фиг. 5

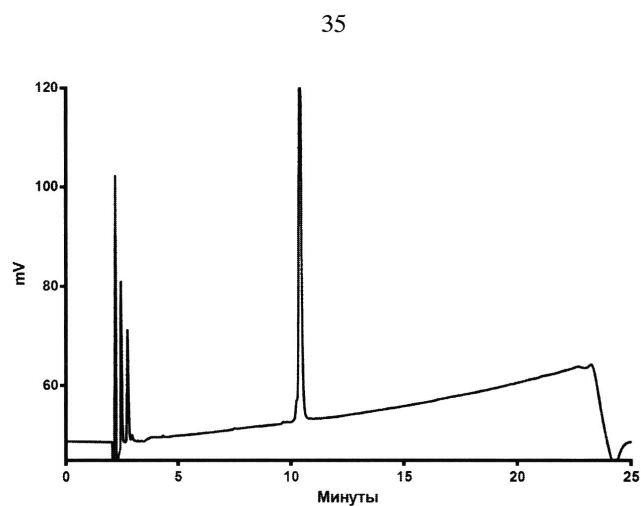
34



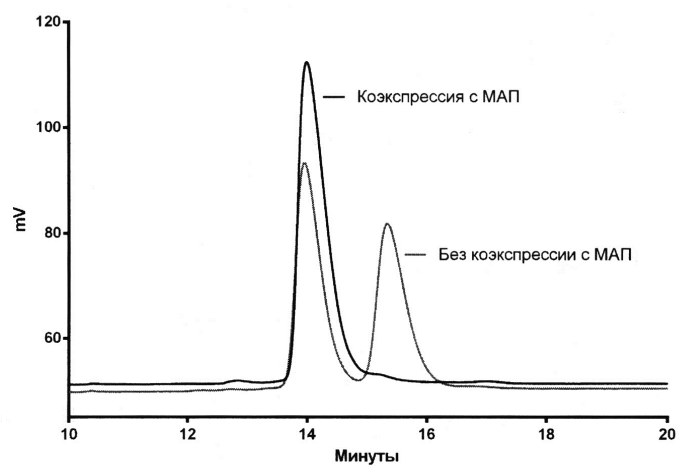
Фиг. 6



Фиг. 7

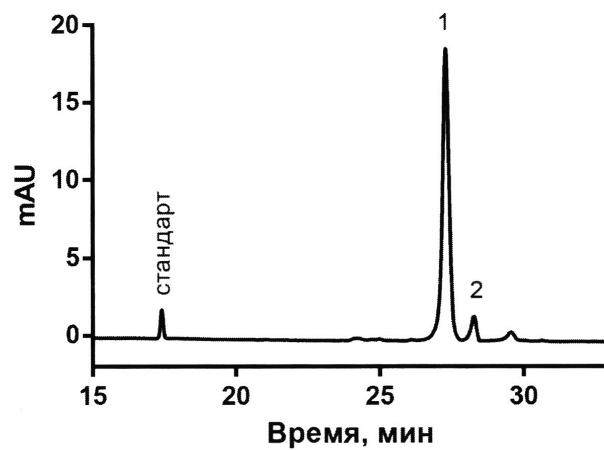


Фиг. 8

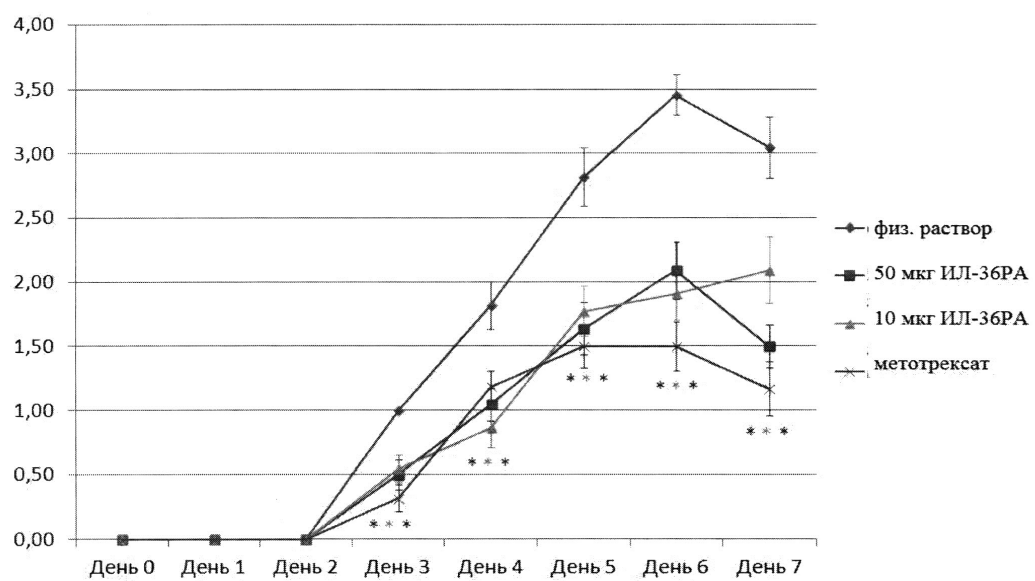


Фиг. 9

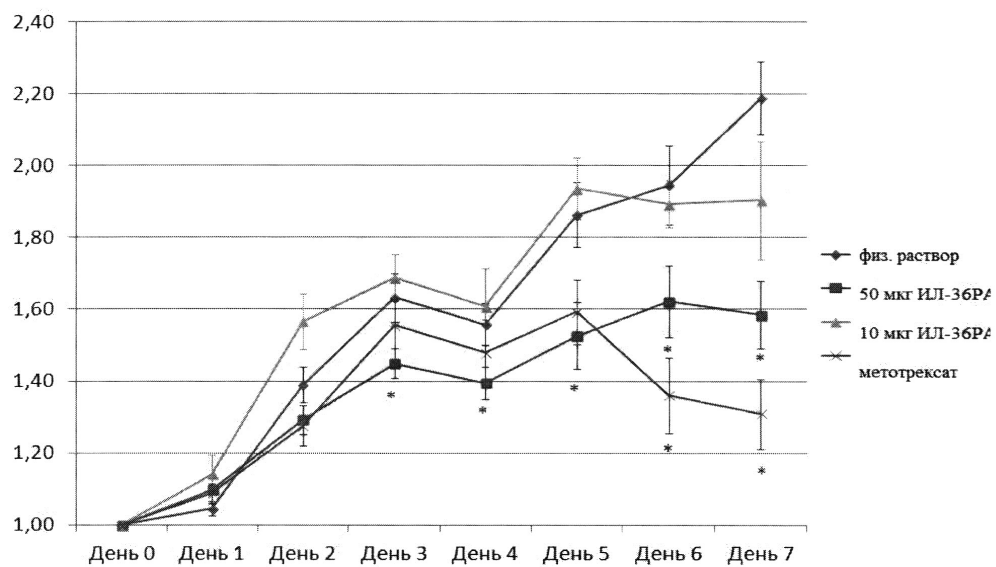
36



Фиг. 10



Фиг.11



ФИГ.12