



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 114652

(13) U

(51) МПК

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

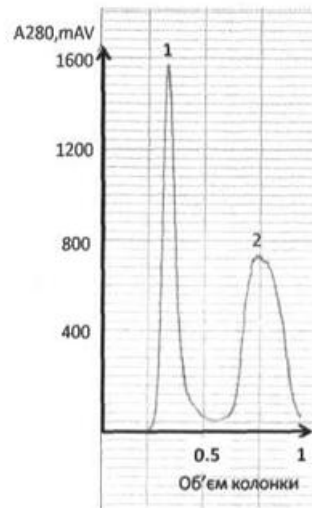
(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | | | |
|--|---------------------|---------------------|---|
| (21) Номер заявки: | u 2016 10423 | (72) Винахідник(и): | Похоленко Яніна Олександрівна (UA), Кордюм Віталій Арнольдович (UA), Іродов Дмитро Михайлович (UA), Окунєв Олег Володимирович (UA) |
| (22) Дата подання заявки: | 13.10.2016 | (73) Власник(и): | ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03680 (UA) |
| (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: | 10.03.2017 | (74) Представник: | Хоменко Ірина Іванівна, реєстр. №363 |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: | 10.03.2017, Бюл.№ 5 | | |

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ОЧИЩЕНОГО І РОЗЧИННОГО РЕКОМБІНАНТНОГО ІНТЕРЛЕЙКІНУ-10 ЛЮДИНИ, СИНТЕЗОВАНОГО ШТАМОМ-ПРОДУЦЕНТОМ E. COLI BL21/hIL10**(57) Реферат:**

Спосіб одержання очищеного і розчинного рекомбінантного інтерлейкіну-10 людини, синтезованого штамом-продуцентом E. coli BL21/hIL10, включає осадження бактеріальних клітин після завершення біосинтезу центрифугуванням та руйнування бактеріальних клітин та хромосомної ДНК ферментативним методом в присутності лізоциму та ДНК-ази з наступною сонікацією. Виконують осадження фракції тілець включення центрифугуванням та послідовно промивають тілця включення розчинами, що містять неіонні детергенти, та розчинами, які містять сечовину, шляхом суспендування осаду з наступним осадженням центрифугуванням, солюбілізацію тілець включення у присутності гуанідин гідрохлориду та ДТТ. Здійснюють ренатурацію hIL-10 шляхом заміни буфера за допомогою гель-фільтраційної хроматографії на колонці в присутності L-аргінін гідрохлориду та неіонного детергенту, з наступним хроматографічним очищенням білка в нативних умовах за допомогою аніообмінної та афінної хроматографії.

UA 114652 U



Фиг. 1

Пропонована корисна модель належить до молекулярної біології, генної інженерії, а саме - до способу одержання очищеного і розчинного рекомбінантного інтерлейкіну-10 людини (hIL-10), синтезованого штамом-продуцентом *E.coli* BL21/hIL10, який може бути використаний в біотехнології для подальшого одержання фармацевтичної субстанції і науково-дослідницької роботи.

Аналогами рекомбінантного hIL-10 є інтерлейкін-10, що експресується переважно моноцитами периферичної крові людини, а також Т-хелперами другого типу, дендритними клітинами і епітеліоцитами [1].

Відомий рекомбінантний hIL-10, який напрацьовують та очищають з трансгенних рослин тютюну [2], рису [3] та моркви [4]. Також, рекомбінантні аналоги hIL-10 людини одержують синтезом в бактеріях, таких як *E.coli* [5]-[7].

Оскільки, hIL-10 є ключовим протизапальним цитокіном, він має як велике терапевтичне так і діагностичне значення, адже може бути використаний як для лікування гострих і хронічних запальних захворювань людини [8]-[10], так і для діагностики, оскільки рівень його експресії змінюється при різних патологіях [11][12].

Відомо декілька методик одержання рекомбінантного hIL-10.

Відомий hIL-10 генно-інженерного походження, продукований в трансгенних рослинах, модифікованих його геном [3], який одержували шляхом екстракції з насіння рису. Зазначений спосіб одержання hIL-10 має суттєві недоліки, серед яких відносно тривалий вегетаційний період рису, а також те, що до вихідної послідовності hIL-10 була внесена послідовність 6х His-tag, яка може афінно зв'язуватись з металафінним сорбентом [3]. Застосування даного підходу здатне забезпечити швидке очищення цільового протеїну, проте має певні обмеження при застосуванні для очищення терапевтичних рекомбінантних білків, оскільки подібна модифікація може призвести до підвищення його імуногенності.

Відомий метод одержання рекомбінантного hIL-10 [2], який одержували шляхом екстракції рослин трансгенного тютюну. Зазначений спосіб одержання hIL-10 має суттєві недоліки, серед яких відносно тривалий вегетаційний період тютюну, а також те, що до вихідної послідовності hIL-10 була внесена послідовність еластино-подібного поліпептидного тагу (ELP), а також зеленого флуоресцентного білка, що значно збільшило накопичення цільового продукту в рослинних клітинах та полегшило спостереження за його експресією, проте подібна модифікація може призвести до підвищення його імуногенності.

Відомий спосіб отримання трансгенних рослин моркви, що продукує інтерлейкін-10 людини [4], що описує лише поліпшений спосіб одержання трансгенних рослин моркви, які продукують hIL-10. Подальшому виділенню та очистці не приділялась значна увага. Проте слід зазначити, що у будь-якому випадку одержані рослини мають тривалий період вегетації, складну процедуру екстракції (яка часто проводиться з використанням органічних розчинників), що призводить до денатурації цільового білка та виникає потреба в його ренатурації, а також складність процедури його очищення.

Також, відомий hIL-10 генно-інженерного походження, продукований в клітинах *Escherichia coli* [5]-[7]. Однак, при експресії гетерологічних білків у системі *E.coli* у значній кількості випадків спостерігається агрегація синтезованих білків, що призводить до накопичення цільового білка у вигляді нерозчинних неактивних цитоплазматичних агрегатів - тілець включення. А отже, при використанні такого продуценту виникає необхідність окрім етапу хроматографічного очищення вводити етап його виділення у функціонально активній формі (ренатурацію).

У вищезазначених роботах [5]-[7] основним методом, який використовується для ренатурації hIL-10, є розведення. Використання такого методу має суттєві недоліки, основним з яких є необхідність концентрації цільового продукту після етапу розведення, за рахунок чого значно збільшуються втрати цільового білка. Також застосування даного методу підвищує собівартість одержаного терапевтичного білка за рахунок збільшення витрат таких сполук, як, наприклад, глутатіон окиснений та глутатіон відновлений, які використовуються для коректного формування дисульфідних містків у ренатурованому продукті та ін.

В основу пропонованої корисної моделі поставлено задачу розробити більш технологічний та ефективний спосіб одержання очищеного і розчинного рекомбінантного інтерлейкіну-10 людини, синтезованого штамом-продуцентом *E.coli* BL21/hIL10.

Поставлена задача вирішується пропонованим способом одержання очищеного і розчинного рекомбінантного інтерлейкіну-10 людини, синтезованого штамом-продуцентом *E.coli* BL21/hIL10, який, відповідно до корисної моделі, включає осадження бактеріальних клітин після завершення біосинтезу центрифугуванням, руйнування бактеріальних клітин та хромосомної ДНК ферментативним методом в присутності лізоциму та ДНК-ази з наступною сонікацією, осадження фракції тілець включення центрифугуванням, послідовне промивання тілець

включення розчинами, що містять неіонні детергенти, та розчинами, які містять сечовину, шляхом суспендування осаду з наступним осадженням центрифугуванням, солюбілізацію тілець включення у присутності гуанідин гідрохлориду та ДТТ, ренатурацію hIL-10 шляхом заміни буфера за допомогою гель-фільтраційної хроматографії на колонці в присутності L-аргінін гідрохлориду та неіонного детергенту, з наступним хроматографічним очищенням білка в нативних умовах за допомогою аніообмінної та афінної хроматографії.

Авторами було показано, що при суперсинтезі в клітинах штаму-продуценту рекомбінантний hIL-10 накопичується у фракції тілець включення.

В даному аспекті пропонується корисна модель забезпечує спосіб одержання очищеного і розчинного рекомбінантного hIL-10 з клітин штаму-продуценту E.coli BL21/hIL10, за допомогою якого hIL-10 може бути одержаний в три стадії із збереженням властивих нативному білку антигенних детермінант та біологічної активності, з високим ступенем чистоти і у розчинній формі.

Спосіб виділення рекомбінантного білка hIL-10 з бактеріальних клітин буде легко оцінений спеціалістами даної галузі на основі опису і прикладів. Процес ренатурації і очищення легко автоматизується у разі використання хроматографічної системи, що програмується. Відповідно до корисної моделі вихід розчинного білка hIL-10, виділеного ренатурацією із тілець включення E.coli, складав більше 85 % вихідного цільового білка. Відсоток димерної форми, отриманої після очищення від олігомерних форм за допомогою аніонобмінної хроматографії, визначений розділенням очищеного ренатурованого білка за допомогою гель-фільтрації на колонці Superdex 75 10/300 GL, становив 90-95 %. При внесенні 1 мкг та наступному розділенні в 13 %-му поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію очищений і ренатурований білок виявлявся як дискретна смуга з молекулярною масою близько 19 кДа (Фіг. 3). Чистота розчинного продукту, одержаного після циклу хроматографічного розділення на колонці аніонобмінним сорбентом, розрахована методом денситометрії електрофореграм, складала більше 90 %, концентрація у пробі після ренатурації та аніонобмінної хроматографії - 0,1-0,05 мг/мл. Очищений білок hIL-10, виділений з бактеріальних тілець включення, зберігав активні антигенні детермінанти нативного інтерлейкіну-10 людини, що підтверджувалося у здатності його зв'язування з моноклональними та поліклональними антитілами до інтерлейкіну-10 людини у "сандвіч"-варіанті твердофазного імуоферментного аналізу. Також, було продемонстровано збереження специфічної біологічної активності, яка виявлялась у пригніченні виділення оксиду нітрогену клітинами лінії J774, стимульованими додаванням ліпополісахариду E.coli, під дією ренатурованого hIL-10.

Суть корисної моделі пояснюється графічними матеріалами, де:

На фіг. 1 - хроматограма ренатурації білка ML-10 із тілець включення заміною буфера на гель-фільтраційному сорбенті SephadexG-25: 1 - фракція, що містила hIL-10; 2 - фракція, яка містила гуанідин гідрохлорид та дитіотрітол.

На фіг. 2 - хроматограма очищення білка hIL-10 за допомогою аніонобмінної хроматографії на DEAE-Sepharose: 1 - фракція білка, яка не зв'язалася з сорбентом; 2 - фракція білка, що неспецифічно зв'язалася з сорбентом; 3 - фракція білка, елюйована з сорбенту буферним розчином з 1M NaCl; 4 - Зміна іонної сили буферного розчину шляхом додавання 1,5 M NaCl.

На фіг. 3 - електрофоретичний аналіз фракцій білків:

1-3: Електрофореграма лізатів клітин штаму-продуценту E.coli BL21/hIL10:

1-BL21 (DE3)/hIL10 через 18 годин після додавання ізопропіл-β-тіогалактозиду- 30 мкл клітинної суспензії;

2-3-BL21 (DE3)/hIL10 після лізису із додаванням лізоциму - осад (2) і надосад (3) клітинної фракції після лізису;

4-8 - Електрофореграма білкових фракцій, одержаних після ренатурації hIL-10:

4-5 - маркер молекулярної ваги - рекомбінантний IFN-α2b людини;

6-8 - надосад білкової фракції після ренатурації (5, 10, 25 мкл відповідно);

9-13 - Електрофореграма елюатів, одержаних після очищення на DEAE-Sepharose та Heparin-Sepharose:

9-11 - фракція, яка містить hIL-10;

12-13 - маркер молекулярної ваги - рекомбінантний IFN-α2b людини.

Приклад виділення рекомбінантного білка hIL-10 в очищеному та розчиненому стані. Для часткового очищення тілець включення використовували промивання буферним розчином наступного складу: 7M сечовина, 20mM Тріс-HCl pH 8.0, 1mM EDTA. Промивання здійснювали шляхом повного суспендування нерозчинного білка на ультразвуковому дезінтеграторі з наступним відділенням осаду центрифугуванням 15 хв. при 12000g. Ізольовані тільця включення ресуспендували в буферному розчині наступного складу: 7M гуанідин гідрохлорид,

0,1 М бікарбонатний буфер рН 8,5, 0,1 М L-аргініну, 0,1 % Tween-20, 0,1 М DTT, та інкубували з перемішуванням при +22 °С протягом 1 години. Солюбілізований білок відділяли від нерозчинної фракції центрифугуванням 15 хв. при 12000 g та наносили на хроматографічну колонку з Sephadex G-25 об'ємом 20 мл - 100 мл, урівноваженою розчином наступного складу:

5 0,1 М бікарбонатний буфер рН 8,5, 0,1 М L-аргініну, 0,1 % Tween-20. Цільовий білок елюювався 1 фракцією (фіг. 1) у тому ж буфері, яким була врівноважена колонка. Після елюції білок фільтрували через 0,2 мкм мембранний фільтр чи центрифугували 15 хв. при 12000 g і наносили на хроматографічну колонку з DEAE-Sepharose об'ємом 5-10 мл, еквілібровану буфером, в якому елюювався білок з Sephadex G-25. Еквілібрація сорбенту, проводилася згідно

10 з рекомендаціями фірми-виробника. Сорбент промивали урівноважуючим буфером (5 об'ємів колонки) та зв'язаний білок елюювали буфером наступного складу: 0,1 М бікарбонатний буфер рН 8,5, 0,1 М L-аргініну, 0,1 % Tween-20, 1,5 М NaCl. Димерна фракція інтерлейкіну-10 людини була присутня у фракції, яка не зв'язувалась із сорбентом, у той час як олігомерні форми білка елюювалися буферним розчином, який містив 1,5 М NaCl (фіг. 2). Для проведення етапу

15 хроматографічного очищення на афінному сорбенті (Heparin Sepharose) рН розчину, у якому знаходилася димерна фракція доводили до 7,2 додаванням 0,1 М розчину H_3PO_4 . Після цього білок наносили на хроматографічну колонку з Heparin Sepharose 5-10 мл, еквілібровану фосфатним сольовим буфером (ФСБ) рН 7,0-7,6, який містив 0,1 % Tween-20 та 0,1 М L-аргініну. Сорбент промивали урівноважуючим буфером (5 об'ємів колонки) та зв'язаний білок

20 елюювали буфером наступного складу: ФСБ рН 7,0-7,6, 0,1 М L-аргініну, 0,1 % Tween-20, 1,5 М NaCl. Моніторинг фракцій, що містять білок, проводили спектрофотометрично при 280 нм за допомогою UV-монітора. Одержані елюцією фракції білків аналізували електрофорезом. Електрофорез білків проводили за методом U.Laemmli [13], використовуючи для їхнього розділення 13-15 %-й поліакриламідний гель з 0,1 %-м додецилсульфату натрію. Кількість сумарного білка у різних фракціях визначалась спектрофотометрично за поглинанням розчину

25 при довжині хвилі 280 н.м. Коефіцієнт поглинання при 280 н.м. цільового білка становив - 0,38 для концентрації 1 мг/мл рекомбінантного hIL-10, розведеного у ФСБ.

Для аналізу молекулярних форм одержаного після ренатурації hIL10 використовували фракціонування на колонці Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, США). Еквілібрацію сорбенту здійснювали буфером наступного складу: 0,1 М бікарбонатний буфер рН 8,5, 0,1 М L-аргініну, 0,1 % Tween-20, швидкість потоку елюенту становила 0.5 мл/хв. Калібрування колонки здійснювали сумішшю білків-маркерів з відомою молекулярною вагою, а саме: БСА, овальбуміну, hIFN- α 2b. Аналіз продемонстрував, що одержаний hIL-10 (37,2 кДа) має приблизно той же час утримання, що і овальбумін (44 кДа). Слід зазначити, що фракціонуєча здатність використаної колонки не забезпечує розділення білків з настільки близькою молекулярною вагою.

Очищений білок hIL-10, виділений з бактеріальних тілець включення, зберігав активні антигенні детермінанти нативного інтерлейкіну-10 людини, що підтверджувалося у здатності його зв'язування з моноклональними та поліклональними антитілами до інтерлейкіну-10 людини у "сандвіч"-варіанті твердофазного імуоферментного аналізу. Також, було продемонстровано збереження специфічної біологічної активності, яка виявлялась у пригніченні виділення оксиду нітрогену клітинами лінії J774, стимульованими додаванням ліпополісахариду E.coli, під дією ренатурованого hIL-10.

Запропонований спосіб дозволив зменшити кількість технологічних етапів при виділенні та очищенні цільового продукту та збільшити його вихід приблизно у 4 рази (до 26-30 мг/1 L вихідної культури) порівняно з описаним в літературних джерелах (приблизно 6 мг/1 L вихідної культури [5]).

Джерела інформації:

1. R. Sabat, G. Grütz, K. Warszawska, S. Kirsch, E. Witte, K. Wolk, and J. Geginat, "Biology of interleukin-10," Cytokine Growth Factor Rev., Oct. 2010. - Vol. 21, № 5. - P. 331-344.

2. A. Kaldis, A. Ahmad, A. Reid, B. McGarvey, J. Brandle, S. Ma, A. Jevnikar, S. E. Kohalmi, and R. Menassa, "High-level production of human interleukin-10 fusions in tobacco cell suspension cultures," Plant Biotechnol. J., Jun. 2013. - Vol. 11, № 5. - P. 535-545.

3. Y. Fujiwara, Y. Aiki, L. Yang, F. Takaiwa, A. Kosaka, N.M. Tsuji, K. Shiraki, and K. Sekikawa, "Extraction and purification of human interleukin-10 from transgenic rice seeds," Protein Expr. Purif, Jul. 2010. - Vol. 72, № 1. - P. 125-130.

4. "Патент № 2374321 - Способ получения трансгенных растений моркови, продуцирующих интерлейкин-10 человека." [Online]. Available: <http://allpatents.ru/patent/2374321.html>. [Accessed: 04-May-2016].

5. S. Klompus, G. Solomon, and A. Gertler, "A simple novel method for the preparation of noncovalent homodimeric, biologically active human interleukin 10 in Escherichia coli-enhancing protein expression by degenerate PCR of 5' DNA in the open reading frame, " *Protein Expr. Purif.*, Dec. 2008. - Vol. 62, № 2. - P. 199-205.
- 5 6. L. R. Ptitsyn, I. B. Al'tman, and M. V. Gurov, "[Expression of synthetic human interleukin-10 gene and its mutant variants in Escherichia coli cells]," *Bioorg. Khim.*, Jan. 1998. - Vol. 24, №. 1. - P. 48-57.
7. L. R. Ptitsyn, I. B. Al'tman, M. V. Gurov, and A. N. Kurkin, "[Expression of human interleukin-10 in Escherichia coli cells]," *Biulleten Eksp. Biol. Meditsiny*, Mar. 1995. - Vol. 119, № 3. - P. 324-327.
- 10 8. M. G. A. Broeren, M. de Vries, M. B. Bennink, O. J. Arntz, A. B. Blom, M. I. Koenders, P. L. E. M. van Lent, P. M. van der Kraan, W. B. van den Berg, and F. A. J. van de Loo, "Disease-Regulated Gene Therapy with Anti-Inflammatory Interleukin-10 Under the Control of the CXCL10 Promoter for the Treatment of Rheumatoid Arthritis, " *Hum. Gene Ther.*, Mar. 2016. Vol. 27, № 3. - P. 244-254.
9. D. Hos, F. Bucher, B. Regenfuss, M.-L. Dreisow, F. Bock, L. M. Heindl, S. A. Eming, and C. Cursiefen, "IL-10 Indirectly Regulates Corneal Lymphangiogenesis and Resolution of Inflammation via Macrophages, " *Am. J. Pathol.*, Jan. 2016. - Vol. 186, № 1. - P. 159-171.
- 15 10. D. E. Soranno, C. B. Rodell, C. Altmann, J. Duplantis, A. Andres-Hernando, J. A. Burdick, and S. Faubel, "Delivery of interleukin-10 via injectable hydrogels improves renal outcomes and reduces systemic inflammation following ischemic acute kidney injury in mice " *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, p. ajprenal.00579.2015, Mar. 2016.
- 20 11. J. Chehimi, X. Ma, S. Chouaib, A. Zyad, T. Nagashunmugam, L. Wojcik, S. Chehimi, L. Nissim, and I. Frank, "Differential production of interleukin 10 during human immunodeficiency virus infection, " *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, Aug. 1996. - Vol 12, № 12. - P. 1141-1149.
12. H.D. Torrance, K. Brohi, R. M. Pearse, C.A. Mein, E. Wozniak, J.R. Prowle, C.J. Hinds, and M.J. O'Dwyer, "Association between gene expression biomarkers of immunosuppression and blood transfusion in severely injured polytrauma patients, " *Ann. Surg.*, Apr. 2015. - Vol. 261, № 4. - P. 751-759.
- 25 13. U. K. Laemmli, "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4," *Nature*, Aug. 1970. - Vol. 227, № 5259. - P. 680-685.

30

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб одержання очищеного і розчинного рекомбінантного інтерлейкіну-10 людини, синтезованого штамом-продуцентом *E. coli* BL21/hIL10, який **відрізняється** тим, що включає

35 осадження бактеріальних клітин після завершення біосинтезу центрифугуванням, руйнування бактеріальних клітин та хромосомної ДНК ферментативним методом в присутності лізоциму та ДНК-ази з наступною сонікацією, осадження фракції тілець включення центрифугуванням, послідовне промивання тілець включення розчинами, що містять неіонні детергенти, та розчинами, які містять сечовину, шляхом суспендування осаду з наступним осадженням

40 центрифугуванням, солюбілізацію тілець включення у присутності гуанідин гідрохлориду та ДТТ, ренатурацію hIL-10 шляхом заміни буфера за допомогою гель-фільтраційної хроматографії на колонці в присутності L-аргінін гідрохлориду та неіонного детергенту, з наступним хроматографічним очищенням білка в нативних умовах за допомогою аніообмінної та афінної хроматографії.

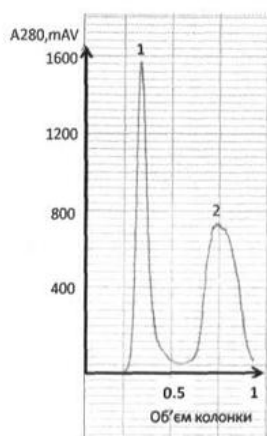


Fig. 1

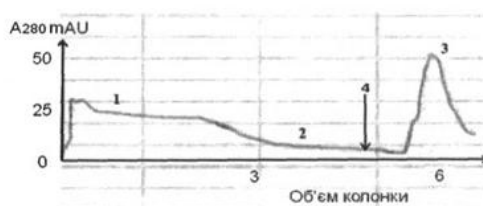


Fig. 2

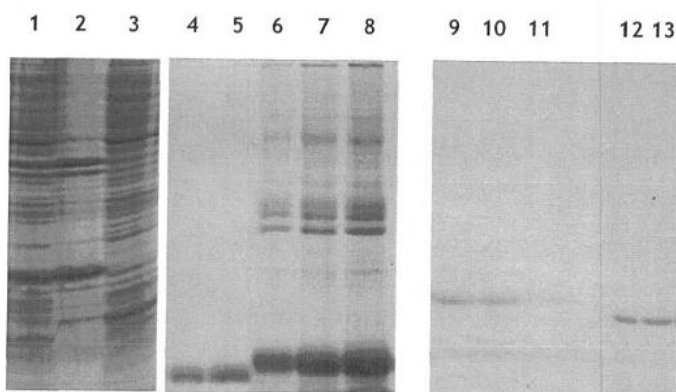


Fig. 3

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601