

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291910** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.01.31

(22) Дата подачи заявки
2022.07.08

(51) Int. Cl. **C07K 14/605** (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)

(54) **НОВЫЙ ГИБРИДНЫЙ БЕЛОК CBD-HS-ES-GLP1, РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДА
ДЛЯ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ, ПРОДУЦИРУЮЩИЙ ЕГО ШТАММ-ПРОДУЦЕНТ
ESCHERICHIA COLI И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДА GLP-1**

(71) Заявитель:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ.
АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА
И Ю.А. ОВЧИННИКОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК (ИБХ РАН) (RU); АВВА
ФАРМАСЬЮТИКАЛС ЛТД (СУ)**

(72) Изобретатель:
**Зинченко Алексей Алексеевич,
Макаров Дмитрий Александрович,
Мягих Игорь Валентинович,
Павленко Даниил Михайлович,
Степаненко Василий Николаевич
(RU)**

(74) Представитель:
Квашнин В.П. (RU)

(57) Изобретение относится к области генной и белковой инженерии и может быть использовано в медицине и фармацевтической промышленности. Сконструированы рекомбинантные плазмидные ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1, pET-parB-CBD-HS-ES-GLP1 и pET23bKanR-CBD-HS-ES-GLP1, обеспечивающие синтез гибридного белка, содержащего последовательность полипептида GLP-1 в клетках Escherichia coli. Путём трансформации штамма E.coli BL 21(DE3) плазмидами pET23b-CBD-HS-ES-GLP1, pET-parB-CBD-HS-ES-GLP1 и pET23bKanR-CBD-HS-ES-GLP1 получены продуценты гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1. Разработан способ получения полипептида GLP-1, предусматривающий получение и культивирование продуцента гибридного белка, содержащего полипептид GLP-1, с последующим выделением и расщеплением указанного гибридного белка. Применение изобретения позволяет получить полипептид GLP-1 с высоким выходом и по упрощённой технологии.

A1

202291910

202291910

A1

**НОВЫЙ ГИБРИДНЫЙ БЕЛОК CBD-HS-ES-GLP1, РЕКОМБИНАНТНАЯ
ПЛАЗМИДА ДЛЯ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ, ПРОДУЦИРУЮЩИЙ ЕГО ШТАММ-
ПРОДУЦЕНТ ESCHERICHIA COLI И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДА
GLP-1**

ОПИСАНИЕ

Область техники настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к области геномной и белковой инженерии и может быть использовано в медицине и фармацевтической промышленности. Более конкретно, настоящее изобретение относится к гибриднему белку CBD-HS-ES-GLP1, предназначенному для получения полипептида GLP-1, рекомбинантным плазмидам рЕТ23b-CBD-HS-ES-GLP1 для экспрессии указанного гибридного белка, штамму-продуценту BL21(DE3)/CBD-HS-ES-GLP1, продуцирующему указанный гибридный белок, а также способу получения полипептида GLP-1.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Полипептид GLP-1, имеющий последовательность SEQ ID NO 1, является одним из инкретинов, понижающих уровень глюкозы путём модуляции секреции инсулина бета-клетками печени [Baggio LL, Drucker DJ (2007) Biology of incretins: GLP-1 and GIP. Gastroenterology 132:2131–2157]. GLP-1 и его аналоги используются для стимуляции секреции инсулина у больных инсулинонезависимым диабетом. Более того, GLP-1 и его аналоги ингибируют секрецию глюкагона, что приводит к значительному понижению уровня глюкозы в крови.

Известен способ получения полипептида GLP-1 с применением пептидного синтеза [CA2778047, C07K14/605, опубл. 15.06.2000]. Данный метод обладает всеми недостатками, присущими химическому синтезу полипептидов. Выход продукта получается низким, что приводит к большим расходам на реагенты и большому количеству отходов. Метод является времязатратным, что также негативно сказывается на возможности его эффективного применения для крупномасштабного производства.

Более перспективно получение полипептида GLP-1 с применением технологии рекомбинантной ДНК. Так, известен метод получения глюкагоноподобных полипептидов с использованием конструкции, кодирующей слитый белок [US7847063, C12N15/8257,

опубл. 08.02.2007]. Основным недостатком данного способа является применение бромциана, что делает его не подходящим для использования в качестве фармацевтического препарата в виду токсичности бромциана и сложности полной очистки продукта от примесей данного соединения.

Известен способ получения полипептида GLP-1 в виде слитого белка, содержащего аффинную метку [US8796431, C12P21/06, опубл. 12.05.2011]. Несмотря на простоту процедуры очистки, достигающейся применением аффинной хроматографии, конечный выход продукта довольно низкий. Кроме того, на стадии расщепления слитого белка применяется кислотный гидролиз, который приводит к образованию большого количества побочных продуктов.

Известен метод получения полипептида GLP-1 в конструкции, содержащей несколько копий соответствующего гена [CA3057252, C07K14/605, опубл. 27.09.2018]. Недостатком данного метода является применение сразу двух протеаз на этапе расщепления слитого белка, что удорожает процесс производства и усложняет дальнейшую очистку. Кроме того, в данном методе не предложен подход к очистке, которая в виду особенностей применяемой конструкции будет сложная и ресурсоёмкая.

Наиболее близким к описываемому изобретению является способ получения полипептида GLP-1 в слитом белке, содержащем интеиновую последовательность [WO2018/136572, C07K14/605, опубл. 26.07.2018]. В этом методе применяется слитый белок, содержащий хитин-связывающий домен, интеин, спейсер, сайт распознавания TEV-протеиназы и полипептид GLP-1. Основным недостатком данного метода является применение интеиновой технологии, которая приводит к низкому выходу конечного белка. При этом используется также расщепление слитого белка TEV-протеиназой, что приводит к усложнению процесса и увеличению количества стадий производства. Ещё одним недостатком является отсутствие полноценной схемы очистки. В изобретении описана только стадия очистки слитого белка от белков клетки-продуцента.

Таким образом, техническая проблема, решаемая настоящим изобретением, состояла в преодолении вышеуказанных недостатков существующих способов получения полипептида GLP-1, а именно в повышении эффективности и снижении трудоемкости и сложности способа получения полипептида GLP-1, в частности в повышении выхода полипептида GLP-1, по сравнению со способами, известными из уровня техники. Технический результат настоящего изобретения состоит в достижении повышенного выхода полипептида GLP-1, составляющего по меньшей мере 30% относительно суммарного белка клетки при чистоте препарата по меньшей мере 95%. Согласно одному конкретному варианту осуществления изобретения достигается чистота препарата, равная 99%. Согласно одному кон-

кретному варианту осуществления изобретения достигается выход полипептида GLP-1, равный 35%. Согласно другому конкретному варианту осуществления изобретения достигается выход полипептида GLP-1, равный 40%.

Указанная техническая проблема решается настоящим изобретением посредством обеспечения нового гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1, предназначенного для получения полипептида GLP-1, новой рекомбинантной плазмиды pET23b-CBD-HS-ES-GLP1 для экспрессии указанного гибридного белка, нового высокопродуктивного бактериального штамма-продуцента BL21(DE3)/CBD-HS-ES-GLP1, продуцирующего указанный гибридный белок, а также способа получения полипептида GLP-1, позволяющего получать полипептид GLP-1 с высоким выходом и высокой степенью чистоты.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к гибриднему белку CBD-HS-ES-GLP1, предназначенному для получения полипептида GLP1, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO 2 и содержащему аминокислотную последовательность $X_1X_2YX_3$, хитин-связывающий домен (CBD), специфический сайт узнавания энтеропептидазы (ES), гексагистидиновый домен (HS), полипептид GLP-1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 1, где $X_1X_2YX_3$ представляет собой аминокислотную последовательность, в которой X_1 выбрана из группы, состоящей из A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, R, P, O, S, U, T, W, Y и V, X_2 выбрана из K или N, и X_3 отсутствует или выбрана из H или Q.

Согласно одному из вариантов осуществления указанного гибридного белка аминокислотная последовательность $X_1X_2YX_3$ представляет собой VKY.

Согласно одному варианту осуществления указанного гибридного белка аминокислотная последовательность $X_1X_2YX_3$ представляет собой VNY.

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной плазмидной ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1, предназначенной для экспрессии указанного гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1, состоящей из следующих ключевых генетических элементов:

- промотора T7 и оператора lacO;
- синтетической нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO 5, кодирующей гибридный белок согласно настоящему изобретению CBD-HS-ES-GLP1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 2;
- гена устойчивости к антибиотику для проведения отбора рекомбинантных клеток;
- ориджина репликации бактериофага f1 (f1 ori).

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения, указанная рекомбинантная плазмидная ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1 имеет длину 3953 п. о., содержит в качестве гена устойчивости к антибиотику ген устойчивости к антибиотику ампициллину (*AmpR*) и бактериальный промотор гена устойчивости к ампициллину (*AmpR* промотор), и имеет расположение элементов, как показано на Фиг. 1.

Согласно другому варианту осуществления указанная рекомбинантная плазмидная ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1 имеет длину 3820 п. о., содержит в качестве гена устойчивости к антибиотику ген устойчивости к антибиотику канамицину (*KanR*), и имеет расположение элементов, как показано на Фиг. 2. Согласно настоящему изобретению плазмидная ДНК согласно такому варианту осуществления также упоминается как pET23bKanR-CBD-HS-ES-GLP1.

Согласно другому варианту осуществления указанная рекомбинантная плазмидная ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1 представляет собой рекомбинантную плазмидную ДНК pET-parB-CBD-HS-ES-GLP1, имеет длину 4391 п. о., содержит модуль hok/sok, стабилизирующий плазмиды [T, Gerdes K. Mechanism of post-segregational killing by the hok/sok system of plasmid R1. Sok antisense RNA regulates hok gene expression indirectly through the overlapping mok gene. J Mol Biol. 1992 Jan 5;223(1):41-54. doi: 10.1016/0022-2836(92)90714-у. PMID: 1370544], и имеет расположение элементов, как показано на Фиг. 3.

Настоящее изобретение также относится к штамму *Escherichia coli* BL21(DE3)/CBD-HS-ES-GLP1, продуцирующему гибридный белок CBD-HS-ES-GLP1 (SEQ ID NO 2), и содержащему указанную рекомбинантную плазмиду ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1.

Согласно другому варианту осуществления изобретения, указанный штамм *Escherichia coli* BL 21(DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 содержит рекомбинантную плазмиду ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1, которая имеет длину 3953 п. о., содержит в качестве гена устойчивости к антибиотику ген устойчивости к антибиотику ампициллину (*AmpR*) и бактериальный промотор гена устойчивости к ампициллину (*AmpR* промотор), а расположение ее генетических элементов показано на Фиг. 1.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения, указанный штамм *Escherichia coli* BL 21(DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 содержит рекомбинантную плазмиду ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1, которая имеет длину 3820 п. о., содержит в качестве гена устойчивости к антибиотику ген устойчивости к антибиотику канамицину (*KanR*), а расположение ее генетических элементов показано на Фиг. 2. Согласно настоящему изобретению штамм *Escherichia coli* согласно такому варианту осуществления также упоминается

как BL21(DE3)/KanR/CBD-HS-ES-GLP1.

Согласно другому варианту осуществления указанная рекомбинантная плазмидная ДНК pET-parB-CBD-HS-ES-GLP1 имеет длину 4391 п. о., содержит в модуль hok/sok, стабилизирующий плазмиды [T, Gerdes K. Mechanism of post-segregational killing by the hok/sok system of plasmid R1. Sok antisense RNA regulates hok gene expression indirectly through the overlapping mok gene. J Mol Biol. 1992 Jan 5;223(1):41-54. doi: 10.1016/0022-2836(92)90714-u. PMID: 1370544], и имеет расположение элементов, как показано на Фиг. 3. Согласно настоящему изобретению штамм *Escherichia coli* согласно такому варианту осуществления также упоминается как BL21(DE3)/parB/CBD-HS-ES-GLP1. Согласно настоящему изобретению штамм *Escherichia coli* BL 21(DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 получен путём трансформации клеток штамма *Escherichia coli* BL 21(DE3) рекомбинантной плазмидой согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к способу получения полипептида GLP1, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO 1, включающему стадии:

а) культивирования штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21(DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 согласно настоящему изобретению с получением биомассы клеток штамма-продуцента, продуцирующего гибридный белок CBD-HS-ES-GLP1 согласно настоящему изобретению;

б) выделения гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 согласно настоящему изобретению из биомассы клеток штамма-продуцента, полученных на стадии а);

с) ферментативного расщепления гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1, полученного на стадии б), с образованием полипептида GLP-1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 1;

д) очистки полипептида GLP-1, полученного на стадии с).

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения на стадии б) осуществляют отделение клеток от культуральной жидкости, дезинтеграцию клеток, выделение тел включений из полученного дезинтеграта и солюбилизацию тел включения.

Согласно другому варианту осуществления на стадии б) при выделении тел включения из полученного дезинтеграта добавляют сульфат аммония

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения культивирование клеток *Escherichia coli* BL21 (DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 на стадии а) проводят в ростовой среде на протяжении по меньшей мере 7 часов.

Согласно другому варианту осуществления на стадии а) проводят индукцию биосинтеза рекомбинантного белка клетками *Escherichia coli* BL21 (DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 осуществляют через 3 часа после начала культивирования при помощи изопропил-β-D-1-

тиогалактоприанозида.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения на стадии с) расщепление гибридного белка осуществляют энтеропептидазой.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения на стадии d) очистку полипептида GLP-1 осуществляют с использованием одной стадии хроматографии.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения на стадии d) очистку полипептида GLP-1 осуществляют с использованием нескольких стадий хроматографии.

Согласно другому варианту осуществления на стадии d) очистку гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 осуществляют хроматографически на металл-хелатном сорбенте.

Согласно другому варианту осуществления на стадии b) очистку гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 осуществляют хроматографически на катионообменном сорбенте.

Согласно другому варианту осуществления на стадии b) очистку гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 осуществляют хроматографически на хитиновом сорбенте.

Согласно другому варианту осуществления на стадии d) очистку полипептида GLP-1 осуществляют с использованием обращенно-фазовой хроматографии.

Согласно другому варианту осуществления на стадии d) очистку полипептида GLP-1 осуществляют с использованием гель-фильтрационной хроматографии.

Согласно другому варианту осуществления на стадии d) очистку полипептида GLP-1 осуществляют при помощи осаждения сульфатом аммония и экстракции примесей буферным раствором.

Согласно другому варианту осуществления на стадии d) очистку гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 осуществляют хроматографически на хитиновом сорбенте.

Авторами настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что полученные ими и обладающие уникальной новой структурой гибридный белок CBD-HS-ES-GLP1 и плазмидная ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1 для экспрессии указанного гибридного белка обеспечивают достижение повышенного выхода полипептида GLP-1, составляющего по меньшей мере 30 % относительно суммарного белка клетки при чистоте препарата по меньшей мере 95 % в ходе разработанного авторами настоящего изобретения нового способа получения полипептида GLP1. Указанный технический результат полностью подтвержден Примерами, приведенными в настоящем документе ниже.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Карта плазмиды, где приведенные обозначения имеют следующие значения:

f1 ori – ориджин репликации бактериофага f1, *AmpR* – ген резистентности к ампициллину (ген β-лактамазы), *ori* – ориджин репликации colE1, *T7 promoter* – промотор бактериофага T7, *CBD-HS-ES-GLP1* – ген гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1, включающий полипептид GLP-1, гексагистидиновую и хитин-связывающую последовательности, *T7 terminator* – терминатор бактериофага T7.

Фиг. 2. Карта плазмиды, где приведенные обозначения имеют следующие значения: *f1 ori* – ориджин репликации бактериофага f1, *KanR* – ген резистентности к канамицину (ген аминогликозид-фосфотрансферазы), *ori* – ориджин репликации colE1, *T7 promoter* – промотор бактериофага T7, *CBD-HS-ES-GLP1* – ген гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1, включающий полипептид GLP-1, гексагистидиновую и хитин-связывающую последовательности, *T7 terminator* – терминатор бактериофага T7.

Фиг. 3. Карта плазмиды, где приведенные обозначения имеют следующие значения: *f1 ori* – ориджин репликации бактериофага f1, *KanR* – ген резистентности к канамицину (ген аминогликозид-фосфотрансферазы), *ori* – ориджин репликации colE1, *T7 promoter* – промотор бактериофага T7, *ragB* — *hok/sok* локус, *CBD-HS-ES-GLP1* – ген гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1, включающий полипептид GLP-1, гексагистидиновую и хитин-связывающую последовательности, *T7 terminator* – терминатор бактериофага T7.

Фиг. 4. Электрофоретический анализ тотального клеточного лизата, где приведенные обозначения имеют следующие значения: 1 – в момент индукции, 2 – 2 часа после индукции, 3 – 4 часа после индукции, 4 – 5 часов после индукции, 5 – стандарты молекулярных масс, Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo, cat # 26610.

Фиг. 5. Электрофоретический анализ гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1, где приведенные обозначения имеют следующие значения: 1 – стандарты молекулярных масс, Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo, cat # 26610, 2 - 3 – гибридный белок CBD-HS-ES-GLP1 до инкубирования с энтеропептидазой, 4 - 5 – реакционная смесь, содержащая полипептид GLP-1, получаемая после инкубирования с энтеропептидазой.

Фиг. 6. Хроматограмма, полученная в ходе хромато-масс-спектрометрического анализа полипептида GLP-1.

Фиг. 7. Масс-спектр, полученный в ходе хромато-масс-спектрометрического анализа полипептида GLP-1.

Фиг. 8. Электрофоретический анализ тотального клеточного лизата, где приведенные обозначения имеют следующие значения: 1 – культура до индукции, 2 – в момент индукции, 3 – 4 часа после индукции, 4 – стандарты молекулярных масс, Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo, cat # 26610

Фиг. 9. Электрофоретический анализ тотального клеточного лизата, где приведен-

ные обозначения имеют следующие значения: 1– стандарты молекулярных масс, Pierce Unstained Protein MW Marker, Thermo, cat # 26610, 2 – 1 час после индукции, 3 – 2 часа после индукции, 4 – 4 часа после индукции.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к гибриднему белку CBD-HS-ES-GLP1 для получения полипептида GLP1, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO 2, содержащему аминокислотную последовательность $X_1X_2YX_3$, хитин-связывающий домен (CBD), специфический сайт узнавания энтеропептидазы (ES), гексагистиридиновый домен (HS), полипептид GLP-1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 1, где $X_1X_2YX_3$ представляет собой аминокислотную последовательность, в которой X_1 выбрана из группы, состоящей из A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, R, P, O, S, U, T, W, Y и V, X_2 выбрана из K или N, и X_3 отсутствует или выбрана из H или Q.

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной плазмидной ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1 для экспрессии указанного гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1, состоящей из следующих ключевых генетических элементов:

- промотора T7 и оператора lacO;
- синтетической нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO 5, кодирующую гибридный белок согласно настоящему изобретению, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 2;
- гена устойчивости к антибиотику для проведения отбора рекомбинантных клеток;
- ориджина репликации бактериофага f1 (f1 ori).

Согласно одному варианту осуществления указанная рекомбинантная плазмидная ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1 имеет длину 3953 п. о., содержит в качестве гена устойчивости к антибиотику - ген устойчивости к антибиотику ампициллину (*AmpR*) и бактериальный промотор гена устойчивости к ампициллину (*AmpR промотор*), а расположение ее генетических элементов показано на Фиг. 1.

Согласно другому варианту осуществления указанная рекомбинантная плазмидная ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1 имеет длину 3820 п. о., содержит в качестве гена устойчивости к антибиотику ген устойчивости к антибиотику канамицину (*KanR*), а расположение ее генетических элементов показано на Фиг. 2. Согласно настоящему изобретению плазмидная ДНК согласно такому варианту осуществления также упоминается как pET23bKanR-CBD-HS-ES-GLP1.

Согласно другому варианту осуществления указанная рекомбинантная плазмидная ДНК pET-parB-CBD-HS-ES-GLP1 имеет длину 4391 п. о., содержит модуль hok/sok,

стабилизирующий плазмиды, и имеет расположение элементов, как показано на Фиг. 3. Согласно настоящему изобретению плазмидная ДНК согласно такому варианту осуществления также упоминается как pET-parB-CBD-HS-ES-GLP1.

Настоящее изобретение также относится к штамму *Escherichia coli* BL21(DE3)/CBD-HS-ES-GLP1, продуцирующему гибридный белок CBD-HS-ES-GLP1 (SEQ ID NO 2), содержащему указанную рекомбинантную плазмиду ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения, указанный штамм *Escherichia coli* BL 21(DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 содержит рекомбинантную плазмиду ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1, которая имеет длину 3953 п. о., содержит в качестве гена устойчивости к антибиотику - ген устойчивости к антибиотику ампициллину (*AmpR*) и бактериальный промотор гена устойчивости к ампициллину (*AmpR промотор*), а расположение указанных ее генетических элементов показано на Фиг. 1.

Согласно одному варианту осуществления указанный штамм *Escherichia coli* BL 21(DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 содержит рекомбинантную плазмиду ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1, которая имеет длину 3820 п. о., содержит в качестве гена устойчивости к антибиотику ген устойчивости к антибиотику канамицину (*KanR*), а расположение ее генетических элементов показано на Фиг. 2. Согласно настоящему изобретению штамм *Escherichia coli* согласно такому варианту осуществления также упоминается как BL21(DE3)/KanR/CBD-HS-ES-GLP1.

Согласно одному варианту осуществления указанный штамм *Escherichia coli* BL 21(DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 содержит рекомбинантную плазмиду ДНК pET-parB-CBD-HS-ES-GLP1, которая имеет длину 4391 п. о., содержит модуль hok/sok, стабилизирующий плазмиды, а расположение ее генетических элементов показано на Фиг. 3. Согласно настоящему изобретению штамм *Escherichia coli* согласно такому варианту осуществления также упоминается как BL21(DE3)/parB/CBD-HS-ES-GLP1.

Согласно настоящему изобретению штамм *Escherichia coli* BL 21(DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 получен путём трансформации клеток штамма *Escherichia coli* BL 21(DE3) рекомбинантной плазмидой согласно настоящему изобретению.

Другим объектом настоящего изобретения является способ получения полипептида GLP-1 (SEQ ID NO 1), включающий стадии:

а) культивирования штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21(DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 по любому из п. 7—10 с получением биомассы клеток штамма-продуцента, продуцирующего гибридный белок CBD-HS-ES-GLP1 согласно настоящему изобретению;

б) выделения гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 согласно настоящему изобрете-

нию из биомассы клеток штамма-продуцента, полученных на стадии а);

с) ферментативного расщепления гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1, полученного на стадии b), с образованием полипептида GLP-1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 1;

d) очистки полипептида GLP-1, полученного на стадии с).

На стадии b) осуществляют отделение клеток от культуральной жидкости, дезинтеграцию клеток, выделение тел включений из полученного дезинтеграта, солюбилизацию тел включения.

Культивирование клеток *Escherichia coli* BL21 (DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 в ростовой среде осуществляют на протяжении по меньшей мере 6 часов.

Индукцию биосинтеза рекомбинантного белка клетками *Escherichia coli* BL21 (DE3)/ CBD-HS-ES-GLP1 осуществляют через 2–5 часов после начала культивирования при помощи изопропил- β -D-1-тиогалактоприанозида.

Отделение культуральной жидкости от клеток осуществляют центрифугированием.

Дезинтеграцию клеток осуществляют при помощи ультразвукового дезинтегратора.

Выделение тел включения из дезинтеграта осуществляют центрифугированием.

Выделение гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 из полученных солюбилизованных тел включения осуществляют хроматографически на металл-хелатном, хитиновом или ионообменном сорбенте.

Определения и термины

Различные термины, относящиеся к объектам настоящего изобретения, используются выше, а также в описании и в формуле изобретения. Если иное не оговаривается, все технические и научные термины, используемые в данной заявке, имеют то же самое значение, которое понятно для специалистов в данной области. Ссылки на методики, используемые при описании данного изобретения, относятся к хорошо известным методам, включая изменения этих методов и замену их эквивалентными методами, известными специалистам.

В описании данного изобретения термины «включает» и «включающий» интерпретируются как означающие «включает, помимо всего прочего». Указанные термины не предназначены для того, чтобы их истолковывали как «состоит только из».

Как используется в настоящем документе, термин «полипептид GLP-1» относится к пептиду, имеющему следующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO 1.

Термин «энтеропептидаза» в настоящем документе означает протеолитический фермент с шифром КФ 3.4.21.9, а также все его фрагменты и аналоги, обладающие специ-

фической протеолитической активностью в отношении фрагментов аминокислотных последовательностей, включающих -Asp-Asp-Asp-Asp-Lys- (SEQ ID NO 6) и -Asp-Asp-Asp-Asp-Arg- (SEQ ID NO 4).

Варианты осуществления настоящего изобретения

Далее будут приведены варианты осуществления изобретения, путем приведения нескольких примеров. Каждый пример предоставлен посредством объяснения изобретения и не может являться ограничением изобретения. Фактически, специалистам в данной области техники будет понятно, что в изобретение могут быть внесены различные модификации и изменения без изменения объема прав или сущности изобретения. Например, признаки, показанные или описанные как один вариант осуществления, могут быть использованы в другом варианте осуществления для получения ещё одного варианта осуществления.

Таким образом, предполагается, что модификации и изменения, подпадающие под объем прилагаемых пунктов формулы изобретения и их эквивалентов, охватываются настоящим изобретением. В случае предоставления диапазона параметров, предполагается, что в данный диапазон также включается каждая из конечных точек такого диапазона. Специалисту в данной области техники следует понимать, что настоящее исполнение представляет собой описание только приведённых в качестве примера вариантов осуществления и не предполагается в качестве ограничения более широких аспектов настоящего изобретения, более широкие аспекты которого являются осуществленными приведёнными в качестве примера схемами, конструкциями, техниками и процедурами.

Создание экспрессионной плазмиды

Поставленная задача данного изобретения решается за счёт конструирования экспрессионной плазмиды рЕТ23b-CBD-HS-ES-GLP1 длиной 3953 п. о., обеспечивающую экспрессию гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 в клетках *Escherichia Coli*, трансформированных указанной плазмидой.

Указанная плазида, далее обозначаемая как рЕТ23b-CBD-HS-ES-GLP1, состоит из следующих ключевых генетических элементов, расположенных в соответствии с Фиг. 1:

- гена устойчивости к антибиотику ампициллину (AmpR) и бактериального промотора гена устойчивости к ампициллину (AmpR promoter);
- ориджина репликации бактериофага fl (fl ori);
- промотора T7 и оператора lacO;
- синтетической нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO 5, кодирующей гибридный белок CBD-HS-ES-GLP1 (SEQ ID NO 2), содержащий полипептид

GLP-1 (SEQ ID NO 1), сайт узнавания энтерокиназы SEQ ID NO 4, лидерный полипептид (SEQ ID NO 3), имеющий в составе гексагистидиновый участок HS и участок связывания хитина CBD.

В вышеуказанной плазмиде, строение которой раскрыто на Фиг. 1 настоящего описания, ген *AmpR* предназначен для селекции стабильных клеток *Escherichia Coli*. Бактериальный промотор гена устойчивости к ампициллину (*AmpR promoter*) предназначен для его экспрессии.

Ориджин репликации бактериофага *φ1* /*Analysis of Genes and Genomes*, John Wiley & Sons, 2004, S. 140/ широко используется для создания экспрессионных векторов.

Продуктом трансляции синтетической последовательности SEQ ID NO 5 является полипептид последовательности SEQ ID NO 2, включающий лидерный полипептид SEQ ID NO 3, имеющий в составе гексагистидиновый участок HS и участок связывания хитина CBD, сайт узнавания энтеропептидазы человека ES (SEQ ID NO 4), полипептид GLP-1.

Структура указанной плазмидной ДНК (плазмиды), состоящей из указанных ключевых генетических элементов, представлена на Фиг. 1.

Плазмиду согласно изобретению получают из плазмидного вектора pET-23b, описанного в предшествующем уровне техники [/https://www.merckmillipore.com/RU/ru/product/pET-23b+-DNA-Novagen,EMD_BIO-69746/](https://www.merckmillipore.com/RU/ru/product/pET-23b+-DNA-Novagen,EMD_BIO-69746/). Для получения плазмиды по изобретению последовательность SEQ ID NO 5, полученную полным нуклеотидным синтезом, встраивают в плазмидный вектор pET-23b по сайтам рестрикции XhoI и NdeI.

Также для целей настоящего изобретения для создания плазмиды, представленной на Фиг. 1, могут использоваться и другие методы генной инженерии, не упомянутые в настоящем описании в явном виде, которые известны в уровне техники в настоящее время или будут созданы впоследствии. При осуществлении конкретных воплощений настоящего изобретения специалист, основываясь на существующем уровне знаний, может выбрать наиболее оптимальный метод создания плазмиды.

Создание экспрессионной плазмиды с геном устойчивости к канамицину

Поставленная техническая проблема данного изобретения может быть решена также за счёт конструирования экспрессионной плазмиды pET23bKanR-CBD-HS-ES-GLP1 длиной 3820 п. о., обеспечивающую экспрессию гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 в клетках *Escherichia Coli*, трансформированных указанной плазмидой.

Указанная плаزمида, далее обозначаемая как pET23bKanR-CBD-HS-ES-GLP1, состоит из следующих ключевых генетических элементов, расположенных в соответствии с

Фиг. 2:

- гена устойчивости к антибиотику канамицину (KanR) и бактериального промотора гена устойчивости к канамицину;
- ориджина репликации бактериофага fl (fl ori);
- промотора T7 и оператора lacO;
- синтетической нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO 5, кодирующей гибридный белок CBD-HS-ES-GLP1 (SEQ ID NO 2), содержащий полипептид GLP-1 (SEQ ID NO 1), сайт узнавания энтерокиназы SEQ ID NO 4, лидерный полипептид (SEQ ID NO 3), имеющий в составе гексагистидиновый участок HS и участок связывания хитина CBD.

В вышеуказанной плазмиде, строение которой раскрыто на Фиг. 2 настоящего описания, ген *KanR* предназначен для селекции стабильных клеток *Escherichia Coli*. Бактериальный промотор гена устойчивости к канамицину предназначен для его экспрессии.

Продуктом трансляции синтетической последовательности SEQ ID NO 5 является полипептид последовательности SEQ ID NO 2, включающий лидерный полипептид SEQ ID NO 3, имеющий в составе гексагистидиновый участок HS и участок связывания хитина CBD, сайт узнавания энтеропептидазы человека ES (SEQ ID NO 4), полипептид GLP-1.

Структура указанной плазмидной ДНК (плазмиды), состоящей из указанных ключевых генетических элементов, представлена на Фиг. 2.

Плазмиду согласно изобретению получают из плазмидного вектора pET-23b. В данном векторе ген устойчивости к антибиотику канамицину, известный из уровня техники <https://plasmid.med.harvard.edu/PLASMID/GetVectorDetail.do?vectorid=319#:~:text=Name%3A-,pET28a,pET28%2C%20pET%2D28a/> встраивают предпочтительно, но без ограничения, по сайтам рестрикции PciI и PsiI с получением плазмиды pET23b/KanR. Для получения плазмиды по изобретению последовательностью SEQ ID NO 5, полученную полным нуклеотидным синтезом, встраивают в плазмидный вектор pET-23b/KanR по сайтам рестрикции XhoI и NdeI.

Также для целей настоящего изобретения для создания плазмиды, представленной на Фиг. 2, могут использоваться и другие методы генной инженерии, не упомянутые в настоящем описании в явном виде, которые известны в уровне техники в настоящее время или будут созданы впоследствии. При осуществлении конкретных воплощений настоящего изобретения специалист, основываясь на существующем уровне знаний, может выбрать наиболее оптимальный метод создания плазмиды.

Создание экспрессионной плазмиды со стабилизирующим модулем hok/sok

Поставленная техническая проблема данного изобретения может быть решена так-

же за счёт конструирования экспрессионной плазмиды рЕТ-parB-CBD-HS-ES-GLP1 длиной 4391 п. о., обеспечивающую экспрессию гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 в клетках *Escherichia Coli*, трансформированных указанной плазмидой.

Указанная плазида, далее обозначаемая как рЕТ-parB-CBD-HS-ES-GLP1, состоит из следующих ключевых генетических элементов, расположенных в соответствии с Фиг. 3:

- гена устойчивости к антибиотику канамицину (KanR) и бактериального промотора гена устойчивости к канамицину;
- ориджина репликации бактериофага fl (fl ori);
- промотора T7 и оператора lacO;
- parB — hok/sok локуса;
- синтетической нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO 5, кодирующей гибридный белок CBD-HS-ES-GLP1 (SEQ ID NO 2), содержащий полипептид GLP-1 (SEQ ID NO 1), сайт узнавания энтерокиназы SEQ ID NO 4, лидерный полипептид (SEQ ID NO 3), имеющий в составе гексагистидиновый участок HS и участок связывания хитина CBD.

В вышеуказанной плазмиде, строение которой раскрыто на Фиг. 3 настоящего описания, ген *KanR* предназначен для селекции стабильных клеток *Escherichia Coli*. Бактериальный промотор гена устойчивости к канамицину предназначен для его экспрессии. hok/sok локус предназначен для повышения стабильности плазмиды, в том числе для выращивания клеток-продуцентов в большом объёме без использования антибиотика.

Продуктом трансляции синтетической последовательности SEQ ID NO 5 является полипептид последовательности SEQ ID NO 2, включающий лидерный полипептид SEQ ID NO 3, имеющий в составе гексагистидиновый участок HS и участок связывания хитина CBD, сайт узнавания энтеропептидазы человека ES (SEQ ID NO 4), полипептид GLP-1.

Структура указанной плазмидной ДНК (плазмиды), состоящей из указанных ключевых генетических элементов, представлена на Фиг. 3.

Плазмиду согласно изобретению получают из плазмидного вектора рЕТ. В данном векторе ген устойчивости к антибиотику канамицину, известный из уровня техники, встраивают предпочтительно, но без ограничения, по сайтам рестрикции PciI и PsiI с получением плазмиды рЕТ/KanR. Последовательность SEQ ID NO 7, содержащую hok/sok локус, известный из уровня техники, встраивают предпочтительно, но без ограничения, в плазмидный вектор рЕТ/KanR по сайтам рестрикции PciI и XmaI с получением плазмиды рЕТ/parB. Для получения плазмиды по изобретению последовательностью SEQ ID NO 5, полученную полным нуклеотидным синтезом, встраивают в плазмидный вектор рЕТ/parB по сайтам рестрикции XhoI и NdeI.

Также для целей настоящего изобретения для создания плазмиды, представленной на Фиг. 3, могут использоваться и другие методы генной инженерии, не упомянутые в настоящем описании в явном виде, которые известны в уровне техники в настоящее время или будут созданы впоследствии. При осуществлении конкретных воплощений настоящего изобретения специалист, основываясь на существующем уровне знаний, может выбрать наиболее оптимальный метод создания плазмиды.

Получение штамма-продуцента *E.coli* BL21 (DE3)/CBD-HS-ES-GLP1

Штамм BL21(DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 получают трансформированием клеток *Escherichia Coli* BL21(DE3) экспрессионной плазмидой pET23b-CBD-HS-ES-GLP1 размером 3953 п. о., кодирующей гибридный белок SEQ ID NO 2, состоящей из следующих ключевых генетических элементов:

- гена устойчивости к антибиотику ампициллину (*AmpR*) и бактериального промотора гена устойчивости к ампициллину (*AmpR promoter*);
- ориджина репликации бактериофага *f1*;
- промотора T7 и оператора *lacO*;
- синтетической нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO 5, кодирующей гибридный белок CBD-HS-ES-GLP1 (SEQ ID NO 2), содержащий полипептид GLP-1 (SEQ ID NO 1), сайт узнавания энтерокиназы SEQ ID NO 4, лидерный полипептид (SEQ ID NO 3), имеющий в составе гексагистидиновый участок HS и участок связывания хитина CBD.

Исходным материалом для создания штамма-продуцента по изобретению является известный из уровня техники штамм *E. Coli* BL21 (DE3) /Haeyoung Jeong, Valérie Barbe, Choong Hoon Lee, David Vallenet, Dong Su Yu, Sang-Haeng Choi, Arnaud Couloux, Seung-Won Lee, Sung Ho Yoon, Laurence Cattolico, Cheol-Goo Hur, Hong-Seog Park, Béatrice Ségurens, Sun Chang Kim, Tae Kwang Oh, Richard E. Lenski, F. William Studier, Patrick Daegelen, Jihyun F. Kim, Genome Sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3), *Journal of Molecular Biology*, Volume 394, Issue 4, 2009, 644-652/. Экспрессионной плазмидой длиной 3953 п. о., состоящей из ключевых генетических элементов (а) – (д), расположенных друг относительно друга так, как представлено на Фиг. 1, трансформируют клетки штамма *E.Coli* BL21 (DE3).

Предпочтительно (без ограничения), для введения указанной плазмиды в клетки штамма *E. Coli* BL21 (DE3) используют метод электропорации, известный из уровня техники /Tamara Kleber-Janke, Wolf-Meinhard Becker, Use of Modified BL21(DE3) *Escherichia coli* Cells for High-Level Expression of Recombinant Peanut Allergens Affected by Poor Codon

Usage, Protein Expression and Purification, Volume 19, Issue 3, 2000, 419-424/ и включенный в настоящее описание посредством ссылки. Специалисту понятно, что в других воплощениях настоящего изобретения для введения плазмиды в клетки *E. Coli* BL21 (DE3) могут использоваться и другие методы трансформации, известные из уровня техники, например, метод с использованием полиэтиленгликоля, кальций-хлоридный метод. Также для целей настоящего изобретения для введения в клетки *E. Coli* BL21 (DE3) плазмиды, представленной на Фиг. 1, могут использоваться и другие методы трансформации, не упомянутые в настоящем описании в явном виде, которые известны в уровне техники в настоящее время или будут созданы впоследствии. При осуществлении конкретных воплощений настоящего изобретения специалист, основываясь на существующем уровне знаний, может выбрать наиболее оптимальный метод трансформации клеток.

Трансформированные клетки засевают на чашки Петри с агаризованной средой с добавлением селекционного агента ампициллина до конечной концентрации ампициллина 50 мкг/мл клетки. Из клонов, устойчивых к ампициллину, выделяют ДНК плазмиды pET23b-CBD-HS-ES-GLP1, которую анализируют путём секвенирования.

Предлагаемый штамм-продуцент *Escherichia coli* BL21 (DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 характеризуется следующими признаками:

Морфологические признаки: клетки палочковидной формы, грамтрицательные, неспороносные.

Культуральные признаки: клетки хорошо растут на простых питательных средах; при росте на агаризованной среде «LB» (на 1 литр 10 г пептон, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl, 20 г агара) – колонии круглые, гладкие, мутные, блестящие, серые, край ровный.

Физико-биологические признаки: клетки растут при температуре от 4°C до 40°C при оптимальном значении pH от 6,8 до 7,5. В качестве источника азота используют как минеральные соли в аммонийной форме, так и органические соединения, включающие пептон, триптон, дрожжевой экстракт, аминокислоты и т. д. В качестве источника углерода используют аминокислоты, глицерин, углеводы.

Устойчивость к антибиотикам: клетки проявляют устойчивость к пенициллиновым антибиотикам (до 500 мкг/мл).

Получение штамма-продуцента *E. coli* BL21 (DE3)/KanR/CBD-HS-ES-GLP1

Штамм BL21(DE3)/KanR/CBD-HS-ES-GLP1 получают трансформированием клеток *Escherichia Coli* BL21(DE3) экспрессионной плазмидой pET23bKanR-CBD-HS-ES-GLP1 размером 3820 п. о., кодирующей гибридный белок SEQ ID NO 2, состоящей из следующих ключевых генетических элементов:

- гена устойчивости к антибиотику канамицину (KanR) и бактериального промотора гена устойчивости к канамицину;
- ориджина репликации бактериофага *φ1*;
- промотора T7 и оператора *lacO*;
- синтетической нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO 5, кодирующей гибридный белок CBD-HS-ES-GLP1 (SEQ ID NO 2), содержащий полипептид GLP-1 (SEQ ID NO 1), сайт узнавания энтерокиназы SEQ ID NO 4, лидерный полипептид (SEQ ID NO 3), имеющий в составе гексагистиридиновый участок HS и участок связывания хитина CBD.

Исходным материалом для создания штамма-продуцента по изобретению является известный из уровня техники штамм *E. Coli* BL21 (DE3). Экспрессионной плазмидой длиной 3820 п. о., состоящей из ключевых генетических элементов (а) – (д), расположенных друг относительно друга так, как представлено на Фиг. 2, трансформируют клетки штамма *E. Coli* BL21 (DE3).

Предпочтительно (без ограничения), для введения указанной плазмиды в клетки штамма *E. Coli* BL21 (DE3) используют метод электропорации, известный из уровня техники и включенный в настоящее описание посредством ссылки. Специалисту понятно, что в других воплощениях настоящего изобретения для введения плазмиды в клетки *E. Coli* BL21 (DE3) могут использоваться и другие методы трансформации, известные из уровня техники, например, метод с использованием полиэтиленгликоля, кальций-хлоридный метод. Также для целей настоящего изобретения для введения в клетки *E. Coli* BL21 (DE3) плазмиды, представленной на Фиг. 2, могут использоваться и другие методы трансформации, не упомянутые в настоящем описании в явном виде, которые известны в уровне техники в настоящее время или будут созданы впоследствии. При осуществлении конкретных воплощений настоящего изобретения специалист, основываясь на существующем уровне знаний, может выбрать наиболее оптимальный метод трансформации клеток.

Трансформированные клетки засевают на чашки Петри с агаризованной средой с добавлением селекционного агента ампициллина до конечной концентрации ампициллина 50 мкг/мл клетки. Из клонов, устойчивых к ампициллину, выделяют ДНК плазмиды pET23bKanR-CBD-HS-ES-GLP1, которую анализируют путём секвенирования.

Предлагаемый штамм-продуцент *Escherichia coli* BL21 (DE3)/KanR/CBD-HS-ES-GLP1 характеризуется следующими признаками:

Морфологические признаки: клетки палочковидной формы, грамотрицательные, неспороносные.

Культуральные признаки: клетки хорошо растут на простых питательных средах.

При росте на агаризованной среде «LB» (на 1 литр 10 г пептон, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl, 20 г агара) – колонии круглые, гладкие, мутные, блестящие, серые, край ровный.

Физико-биологические признаки: клетки растут при температуре от 4°C до 40°C при оптимальном значении pH от 6,8 до 7,5. В качестве источника азота используют как минеральные соли в аммонийной форме, так и органические соединения, включающие пептон, триптон, дрожжевой экстракт, аминокислоты и т. д. В качестве источника углерода используют аминокислоты, глицерин, углеводы.

Устойчивость к антибиотикам: клетки проявляют устойчивость к канамицину (до 500 мкг/мл).

Получение, выделение и очистка гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1

Способ получения гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 включает культивирование клеток штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21 (DE3)/CBD-HS-ES-GLP1, полученной путём трансформации клеток *Escherichia coli* BL21 (DE3) раскрытой на Фиг. 1 плазмидой длиной 3953 п. о., состоящей из указанных ключевых генетических элементов, на ростовой среде с получением культуральной жидкости, отделение биомассы клеток от культуральной жидкости, дезинтеграцию клеток, выделение тел включений из полученного дезинтеграта, солюбилизацию тел включения и выделение гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 из полученных солюбилизованных тел включения.

Другой способ получения гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 включает культивирование клеток штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21 (DE3)/KanR/CBD-HS-ES-GLP1, полученной путём трансформации клеток *Escherichia coli* BL21 (DE3) раскрытой на Фиг. 2 плазмидой длиной 3820 п. о., состоящей из указанных ключевых генетических элементов, на ростовой среде с получением культуральной жидкости, отделение биомассы клеток от культуральной жидкости, дезинтеграцию клеток, выделение тел включений из полученного дезинтеграта, солюбилизацию тел включения и выделение гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 из полученных солюбилизованных тел включения.

В предпочтительном воплощении, однако без ограничения, культивирование клеток *Escherichia coli* BL21 (DE3)/CBD-HS-ES-GLP1, в ростовой среде осуществляют на протяжении по меньшей мере 7 часов.

В предпочтительном воплощении, однако без ограничения, индукцию биосинтеза рекомбинантного белка клетками *Escherichia coli* BL21 (DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 осуществляют на 3 часа культивирования при помощи изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид.

В предпочтительном воплощении, однако без ограничения, отделение культуральной жидкости от клеток осуществляют центрифугированием.

В предпочтительном воплощении, однако без ограничения, дезинтеграцию клеток осуществляют при помощи ультразвукового дезинтегратора.

В предпочтительном воплощении, однако без ограничения, выделение тел включения из дезинтеграта осуществляют центрифугированием.

В предпочтительном воплощении, однако также без ограничения, выделение гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 из полученных солюбилизованных тел включения осуществляют хроматографически. В более предпочтительных воплощениях, но без ограничения ими, выделение гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 из солюбилизованных тел включения осуществляют на металл-хелатном хроматографическом сорбенте.

Расщепление гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 в предпочтительном воплощении, однако также без ограничения, осуществляют при помощи энтеропептидазы, исходя из соотношения 1 ед. фермента на 1 мг гибридного белка.

Наконец, в предпочтительном воплощении, однако также без ограничения, дальнейшую очистку полипептида GLP-1, проводят при помощи хроматографических методов.

Осуществление заявляемого изобретения иллюстрируется приведенными ниже примерами, не ограничивающими объем настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1. Конструирование экспрессионной плазмиды

Химический синтез олигонуклеотидов выполняют твердофазным фосфоамидитным методом на ДНК-синтезаторе ASM-102U (БИОССЕТ, Новосибирск) с наращиванием олигонуклеотидной цепи в направлении от 3'-конца к 5'-концу с помощью защищенных фосфамидитов – 5'-диметокситритил-N-ацил-2'-дезоксинуклеозид-3'-O-(β-цианэтилдиизопропиламино)-фосфитов, активированных тетразолом. Синтез проводят в масштабе 0,5-0,7 мкмоль, используя в качестве носителя пористое стекло (размер пор 500 Å), к которому через 3'-сукцинатную связь присоединяют первое нуклеозидное звено (нагрузка 20-30 мкмоль/г). Используют синтетический цикл стандартного фосфоамидитного метода.

Для приготовления вектора ДНК плазмиды рЕТ23b (450 мкг, 150 пмоль) обрабатывают в 6 мл буфера 20 мМ Трис-ацетата, 10 мМ ацетата магния, 50 мМ ацетат калия, 100 мкг/мл БСА рестриктазой XhoI (1000 ед. акт.), а затем – в 6 мл буфера 100 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl, 10 мМ MgCl₂, 100 мкг/мл БСА рестриктазой NdeI (1000 ед. акт.) в течение 1 ч при 37°C. Векторный фрагмент после электрофореза в 15% агарозном геле вырезают из геля и переносят в 30 мл буфера NT, растворяют при 50 °C в течение 5-10 мин и наносят на колонку NucleoSpinExtractIII. Промывают буфером NT 3 и элюируют 7,5 мкл буфера NE.

Олигонуклеотидные последовательности SEQ ID NO 8 – SEQ ID NO 145, коди-

рующие гибридный белок SEQ ID NO 2, получают полным нуклеотидным синтезом в нескольких вариантах, где последовательность $X_1X_2YX_3$ представляла собой: AKY, RKY, NKY, DKY, SKY, QKY, EKY, GKY, HKY, IKY, LKY, KKY, MKY, FKY, RKY, PKY, OKY, SKY, UKY, TKY, WKY, YKY, VKY, ANY, RNY, NNY, DNY, CNY, QNY, ENY, GNY, HNY, INY, LNY, KNY, MNY, FNY, RNY, PNY, ONY, SNY, UNY, TNY, WNY, YNY, VNY, AKYH, RKYH, NKYH, DKYH, SKYH, QKYH, EKYH, GKYH, HKYH, IKYH, LKYH, KKYH, MKYH, FKYH, RKYH, PKYH, OKYH, SKYH, UKYH, TKYH, WKYH, YKYH, VKYH, ANYH, RNYH, NNYH, DNYH, CNYH, QNYH, ENYH, GNYH, HNYH, INYH, LNYH, KNYH, MNYH, FNYH, RNYH, PNYH, ONYH, SNYH, UNYH, TNYH, WNYH, YNYH, VNYH, AKYQ, RKYQ, NKYQ, DKYQ, SKYQ, QKYQ, EKYQ, GKYQ, HKYQ, IKYQ, LKYQ, KKYQ, MKYQ, FKYQ, RKYQ, PKYQ, OKYQ, SKYQ, UKYQ, TKYQ, WKYQ, YKYQ, VKYQ, ANYQ, RNYQ, NNYQ, DNYQ, CNYQ, QNYQ, ENYQ, GNYQ, HNYQ, INY, LNYQ, KNYQ, MNYQ, FNYQ, RNYQ, PNYQ, ONYQ, SNYQ, UNYQ, TNYQ, WNYQ, YNYQ или VNYQ.

При этом получали следующие варианты гибридного белка, имеющего аминокислотные последовательности SEQ ID NO 146 - SEQ ID NO 283

Полученные варианты синтетических последовательностей SEQ ID NO 8 – SEQ ID NO 145 по отдельности обрабатывают в 40 мкл буфера 20 mM Трис-ацетата, 10 mM ацетата магния, 50 mM ацетат калия, 100 мкг/мл БСА рестриктазой XhoI (10 ед. акт.), а затем – в 40 мкл буфера 100 mM NaCl, 50 mM Трис-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 мкг/мл БСА рестриктазой NdeI (10 ед. акт.) в течение 1 ч при 37°C. Синтетические фрагмент после электрофореза в 15 % агарозном геле вырезают из геля и переносят в 200 мкл буфера NT, растворяют при 50°C в течение 5-10 мин и наносят на колонку NucleoSpinExtractII. Промывают буфером NT 3 и элюируют 50 мкл буфера NE.

Все описанные выше полученные синтетические фрагменты в количестве 2 пмоль прибавляют по отдельности к растворам 1 мкг, полученного из ДНК плазмиды pET23b, описанного выше векторного фрагмента в 10 мкл буфера (20 mM трис-HCl, pH 7,56, 10 mM MgCl₂, 0,2 mM гАТР, 10 mM дитиотреитол) и лигируют с помощью 10 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы в течение 12 ч при 10°C.

Помещают на лёд пробирки с компетентными клетками (XL1-Blue, Евроген) до полного размораживания содержимого из расчёта одна пробирка на трансформацию. Аккуратно перемешивают суспензию клеток легким встряхиванием. Добавляют в каждую пробирку полученную после обработки Т4-ДНК-лигазой алкивоту реакционной смеси, аккуратно перемешивают содержимое лёгким встряхиванием. Инкубируют пробирки во льду в течение 20 - 30 мин. Переносят пробирки в водяную баню (42 °C) на 30 - 45 сек.

Быстро переносят пробирки из водяной бани в лёд и инкубируют в течение 3 - 5 мин. Добавляют не менее 3-х объёмов предварительно подогретой до 37 - 42 °С среды SOB или SOC (Becton Dickinson), перемешивают содержимое и инкубируют при 37°С в течение 40 - 60 мин в орбитальном шейкере-инкубаторе (Multitron, Infors) при скорости 225 - 250 об/мин. Высеивают содержимое пробирок на чашки Петри диаметром 60 мм (Перинт).

Аликвоты полученной плазмидных ДНК используют для трансформации компетентных клеток *E.coli* BL21 (DE3). Трансформанты высеивают на чашки с агаризованной средой LB, в которую добавляют ампициллин до конечной концентрации ампициллина 50 мкг/мл. Из клонов выделяют ДНК плазмиды pET23b-CBD-HS-ES-GLP1. Скрининг рекомбинантов проводят с помощью секвенирования.

Пример 2. Получение штамма-продуцента *E.coli* BL21 (DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 и характеристика его продуктивности

Штамм-продуцент *E.coli* BL21 (DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 получают трансформацией компетентных клеток *E.coli* BL21 (DE3) плазмидой, получение которой описано в примере 1.

Штамм-продуцент *E.coli* BL21 (DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 культивируют при 37°С в 100 мл жидкой питательной среды LB с добавкой ампициллина до конечной концентрации ампициллина 100 мкг/мл в течение 3 ч в колбах Ерленмейера (1л, Corning) в орбитальном шейкере-инкубаторе со скоростью вращения 220 об/мин до достижения оптической плотности культуральной жидкости при длине волны 600 нм 0,7-0,8 ед. Затем осуществляют индукцию биосинтеза рекомбинантного белка прибавлением изопропил-β-D-1-тиогалактоприанозида до конечной концентрации изопропил-β-D-1-тиогалактоприанозида 0,5 мМ и инкубируют в течение 4 ч. Каждый час отбирают пробу по 2 мл, количество культуры, соответствующее 1 мл, центрифугируют в течение 10 мин при 6000 об/мин. Осаждённые клетки переносят в 100 мкл лизирующего буфера с красителем бромфеноловым синим, с добавлением 2-меркаптоэтонола, инкубируют 5 мин при 98 °С, аликвоты по 3 мкл используют для электрофореза в 14 % SDS-ПААГ. Гель окрашивают добавлением 0,1 % раствора Кумасси R-250 и сканируют с помощью денситометра Shimadzu CS-930. Результаты представлены на Фиг. 4, 4 – клеточный лизат, 5 – стандарты молекулярных масс. Выход полипептида GLP-1 по результатам денситометрического анализа составляет 35 % относительно суммарного белка клетки.

Пример 3. Получение полипептида GLP-1

После окончания культивирования по примеру 2 клетки продуцента рекомбинант-

ного белка (биомассу) отделяют центрифугированием (5000 g, 20 мин, 4°C), разрушают на ультразвуковом дезинтеграторе (Elma) в буферном растворе (50 мМ Трис/НСl, 10 мМ ЭДТА, рН 8). Добавляют сульфат аммония до конечной концентрации 200 г, инкубируют в течение 1–2 ч и отделяют тела включения центрифугированием (15000 g, 45 мин). Тела включения экстрагируют в буфере (50 мМ Tris рН 11 8М Urea). Солубилизованный белок наносят на металл-хелатный сорбент (Profinity IMAC, Ni-charged, Bio-Rad) и элюируют белок ступенью буферного раствора 0,250 М имидазол, 0,025 мМ Трис, 2 М мочевины, 0,1 М NaCl, рН 8.

Элюат концентрируют на ультрафильтрационной мембране 3 кДа и добавляют энтеропептидазу исходя из соотношения 1 ед. фермента на 1 мг гибридного белка, тем самым инициируя расщепление гибридного белка, и инкубируют при 22°C в течение 14–19 ч. Из полученной смеси отбирают пробу в количестве 30 мкл и с красителем бромфеноловым синим инкубируют 3 мин при 100°C. Пробы по 4 мкл используют для электрофореза в 15 % SDS-ПААГ. Гель прокрашивают кумасси R-250 по стандартной методике и сканируют с помощью денситометра Shimadzu CS-930. Результаты представлены на Фиг. 5. 1 – стандарты молекулярных масс, 2 - 3 – до инкубирования, 4 - 5 – после инкубирования. После инкубирования при 22°C в течение 13 - 19 ч. доводят рН раствора соляной кислотой до 3.0 и центрифугируют. Дальнейшую очистку и анализ полипептида GLP-1 проводят посредством обращенно-фазовой хроматографии. Подлинность полученного полипептида GLP-1 подтверждали методом ВЭЖХ МС. Проводили хроматографическое разделение на колонке Phenomenex Aeris PEPTIDE 1.7u XB-C18150*2.1 mm с использованием хроматографической системы Accela UPLC (Thermo) в режиме градиентного элюирования (линейный градиент концентрации ацетонитрила 5-55 %). Для масс-спектрометрического анализа использовали сопряжённый детектор типа ионная ловушка LCQ Deca XP Plus (Thermo Finnigan) в режиме электрораспылительной ионизации. Детектирование производили в режиме регистрации положительных ионов в диапазоне масс 200-2000 Да. На фиг. 6 и 7 представлен результат хромато-масс-спектрометрического анализа полипептида GLP-1. Чистота препарата составляет 99 % согласно хроматограмме на фиг. 6.

Пример 4. Конструирование экспрессионной плазмиды с геном устойчивости к канамицину

Полученные в примере 1 варианты ДНК плазмиды рЕТ23b-CBD-HS-ES-GLP1 в количестве 3 мкг (1 пмоль) каждая по отдельности обрабатывают в 40 мкл буфера 20 мМ Трис-ацетата, 10 мМ ацетата магния, 50 мМ ацетат калия, 100 мкг/мл БСА рестриктазой PsiI (10 ед. акт.), а затем – в 40 мкл буфера 100 мМ NaCl, 50 мМ Трис-НСl, 10 мМ MgCl₂,

100 мкг/мл БСА рестриктазой PciI (10 ед. акт.) в течение 1 ч при 37°C. Векторные фрагмент после электрофореза в 15% агарозном геле вырезают из геля и переносят в 200 мкл буфера NT, растворяют при 50 °С в течение 5-10 мин и наносят на колонку NucleoSpinExtractII. Промывают буфером NT 3 и элюируют 50 мкл буфера NE.

ДНК плазмиды pET28a (3 мкг, 1 пмоль) обрабатывают в 6 мл буфера 20 мМ Трис-ацетата, 10 мМ ацетата магния, 50 мМ ацетат калия, 100 мкг/мл БСА рестриктазой PciI (1000 ед. акт.), а затем – в 40 мкл буфера 100 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl, 10 мМ MgCl₂, 100 мкг/мл БСА рестриктазой PciI (1000 ед. акт.) в течение 1 ч при 37°C. Векторный фрагмент после электрофореза в 15% агарозном геле вырезают из геля и переносят в 3 мл буфера NT, растворяют при 50 °С в течение 5-10 мин и наносят на колонку NucleoSpinExtractII. Промывают буфером NT 3 и элюируют 7,5 мл буфера NE.

Описанный выше полученный фрагмент плазмиды pET28a в количестве 2 пмоль прибавляют по отдельности к растворам 1 мкг, полученных из ДНК плазмиды pET23b-CBD-HS-ES-GLP1, описанных выше векторных фрагментов в 10 мкл буфера (20 мМ трис-HCl, pH 7,56, 10 мМ MgCl₂, 0,2 мМ гАТФ, 10 мМ дитиотреитол) и лигируют с помощью 10 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы в течение 12 ч при 10°C.

Помещают на лёд пробирки с компетентными клетками (XL1-Blue, Евроген) до полного размораживания содержимого из расчёта одна пробирка на трансформацию. Аккуратно перемешивают суспензию клеток легким встряхиванием. Добавляют в каждую пробирку полученную после обработки Т4-ДНК-лигазой аликвоту реакционной смеси, аккуратно перемешивают содержимое лёгким встряхиванием. Инкубируют пробирки во льду в течение 20 - 30 мин. Переносят пробирки в водяную баню (42 °С) на 30–45 сек. Быстро переносят пробирки из водяной бани в лёд и инкубируют в течение 3 - 5 мин. Добавляют не менее 3-х объёмов предварительно подогретой до 37 - 42 °С среды SOB или SOC (Vecton Dickinson), перемешивают содержимое и инкубируют при 37°C в течение 40 - 60 мин в орбитальном шейкере-инкубаторе (Multitron, Infors) при скорости 225 - 250 об/мин. Высеивают содержимое пробирок на чашки Петри диаметром 60 мм (Перинт).

Аликвоту полученных плазмидных ДНК используют для трансформации компетентных клеток *E.coli* BL21 (DE3). Трансформанты высеивают на чашки с агаризованной средой LB, в которую добавляют ампициллин до конечной концентрации ампициллина 50 мкг/мл. Из клонов выделяют ДНК плазмиды pET23bKanR-CBD-HS-ES-GLP1. Скрининг рекомбинантов проводят с помощью секвенирования.

Пример 5. Получение штамма-продуцента *E.coli* BL21 (DE3)/KanR/CBD-HS-ES-GLP1 и характеристика его продуктивности

Штамм-продуцент *E. coli* BL21 (DE3)/KanR/CBD-HS-ES-GLP1 получают трансформацией компетентных клеток *E. coli* BL21 (DE3) плазмидой, получение которой описано в примере 4.

Штамм-продуцент *E. coli* BL21 (DE3)/KanR/CBD-HS-ES-GLP1 культивируют при 37°C в 100 мл жидкой питательной среды LB с добавкой канамицина сульфата до конечной концентрации добавкой канамицина сульфата 50 мкг/мл в течение 3 ч в колбах Ерленмейера (1л, Corning) в орбитальном шейкере-инкубаторе со скоростью вращения 220 об/мин до достижения оптической плотности культуральной жидкости при длине волны 600 нм 0,7-0,8 ед. Затем осуществляют индукцию биосинтеза рекомбинантного белка прибавлением изопропил- β -D-1-тиогалактоприанозида до конечной концентрации изопропил- β -D-1-тиогалактоприанозида 0,5 mM и инкубируют в течение 4 ч. Каждый час отбирают пробу по 2 мл, количество культуры, соответствующее 1 мл, центрифугируют в течение 10 мин при 6000 об/мин. Осаждённые клетки переносят в 100 мкл лизирующего буфера с красителем бромфеноловым синим, с добавлением 2-меркаптоэтонола, инкубируют 5 мин при 98 °C, аликвоты по 3 мкл используют для электрофореза в 14 % SDS-ПААГ. Гель окрашивают добавлением 0,1 % раствора Кумасси R-250 и сканируют с помощью денситометра Shimadzu CS-930. Результаты представлены на Фиг. 8. 4 – клеточный лизат, 5 – стандарты молекулярных масс. Выход полипептида GLP-1 по результатам денситометрического анализа составляет 35 % относительно суммарного белка клетки.

Пример 6. Конструирование экспрессионной плазмиды с модулем повышения стабильности генетической конструкции

Полученные в примере 4 варианты ДНК плазмиды pET23b-KanR-CBD-HS-ES-GLP1 в количестве 3 мкг (1 пмоль) каждая по отдельности обрабатывают в 40 мкл буфера 20 mM Трис-ацетата, 10 mM ацетата магния, 50 mM ацетатат калия, 100 мкг/мл БСА рестриктазой XmaI (10 ед. акт.), а затем – в 40 мкл буфера 100 mM NaCl, 50 mM Трис-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 мкг/мл БСА рестриктазой PciI (10 ед. акт.) в течение 1 ч при 37°C. Векторные фрагмент после электрофореза в 15% агарозном геле вырезают из геля и переносят в 200 мкл буфера NT, растворяют при 50 °C в течение 5-10 мин и наносят на колонку NucleoSpinExtractII. Промывают буфером NT 3 и элюируют 50 мкл буфера NE.

Синтетическую последовательность SEQ ID NO 7 (60 пмоль) обрабатывают в 6 мл буфера 20 mM Трис-ацетата, 10 mM ацетата магния, 50 mM ацетатат калия, 100 мкг/мл БСА рестриктазой XmaI (1000 ед. акт.), а затем – в 6 мл буфера 100 mM NaCl, 50 mM Трис-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 мкг/мл БСА рестриктазой PciI (1000 ед. акт.) в течение 1 ч при 37°C. Векторный фрагмент после электрофореза в 15% агарозном геле вырезают из геля и пере-

носят в 3 мл буфера NT, растворяют при 50 °С в течение 5-10 мин и наносят на колонку NucleoSpinExtractII. Промывают буфером NT 3 и элюируют 50 мкл буфера NE. Описанный выше полученный фрагмент синтетической последовательности SEQ ID NO 145 в количестве 2 пмоль прибавляют по отдельности к растворам 1 мкг, полученных из ДНК плазмиды pET23b-KanR-CBD-HS-ES-GLP1, описанных выше векторных фрагментов в 10 мкл буфера (20 mM трис-HCl, pH 7,56, 10 mM MgCl₂, 0,2 mM гАТФ, 10 mM дитиотреитол) и лигируют с помощью 10 ед. акт. T4-ДНК-лигазы в течение 12 ч при 10°С.

Помещают на лёд пробирки с компетентными клетками (XL1-Blue, Евроген) до полного размораживания содержимого из расчёта одна пробирка на трансформацию. Аккуратно перемешивают суспензию клеток легким встряхиванием. Добавляют в каждую пробирку полученную после обработки T4-ДНК-лигазой аликвоту реакционной смеси, аккуратно перемешивают содержимое лёгким встряхиванием. Инкубируют пробирки во льду в течение 20 - 30 мин. Переносят пробирки в водяную баню (42 °С) на 30–45 сек. Быстро переносят пробирки из водяной бани в лёд и инкубируют в течение 3 - 5 мин. Добавляют не менее 3-х объёмов предварительно подогретой до 37 - 42 °С среды SOB или SOC (Vecton Dickinson), перемешивают содержимое и инкубируют при 37°С в течение 40 - 60 мин в орбитальном шейкере-инкубаторе (Multitron, Infors) при скорости 225 - 250 об/мин. Высеивают содержимое пробирок на чашки Петри диаметром 60 мм (Перинт).

Аликвоту полученных плазмидных ДНК используют для трансформации компетентных клеток *E.coli* BL21 (DE3). Трансформанты высеивают на чашки с агаризованной средой LB, в которую добавляют ампициллин до конечной концентрации ампициллина 50 мкг/мл. Из клонов выделяют ДНК плазмиды pET-parB-CBD-HS-ES-GLP1. Скрининг рекомбинантов проводят с помощью секвенирования.

Пример 7. Получение штамма-продуцента *E.coli* BL21 (DE3)/parB-CBD-HS-ES-GLP1 и характеристика его продуктивности

Штамм-продуцент *E.coli* BL21 (DE3)/parB-CBD-HS-ES-GLP1 получают трансформацией компетентных клеток *E.coli* BL21 (DE3) плазмидой, получение которой описано в примере 6.

Штамм-продуцент *E.coli* BL21 (DE3)/parB-CBD-HS-ES-GLP1 культивируют при 37°С в 100 мл жидкой питательной среды LB с добавкой канамицина сульфата до конечной концентрации добавкой канамицина сульфата 50 мкг/мл в течение 3 ч в колбах Ерленмейера (1л, Corning) в орбитальном шейкере-инкубаторе со скоростью вращения 220 об/мин до достижения оптической плотности культуральной жидкости при длине волны 600 нм 0,7-0,8 ед. Затем осуществляют индукцию биосинтеза рекомбинантного белка при-

бавлением изопротил- β -D-1-тиогалактоприанозида до конечной концентрации изопротил- β -D-1-тиогалактоприанозида 0,5 мМ и инкубируют в течение 4 ч. Каждый час отбирают пробу по 2 мл, количество культуры, соответствующее 1 мл, центрифугируют в течение 10 мин при 6000 об/мин. Осаждённые клетки переносят в 100 мкл лизирующего буфера с красителем бромфеноловым синим, с добавлением 2-меркаптоэтонола, инкубируют 5 мин при 98 °С, аликвоты по 3 мкл используют для электрофореза в 14 % SDS-ПААГ. Гель окрашивают добавлением 0,1 % раствора Кумасси R-250 и сканируют с помощью денситометра Shimadzu CS-930. Результаты представлены на Фиг. 9. 4 – клеточный лизат, 5 – стандарты молекулярных масс. Выход полипептида GLP-1, по результатам денситометрического анализа составляет 40 % относительно суммарного белка клетки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гибридный белок CBD-HS-ES-GLP1, предназначенный для получения полипептида GLP1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 2, содержащий аминокислотную последовательность $X_1X_2YX_3$, хитин-связывающий домен (CBD), специфический сайт узнавания энтеропептидазы (ES), гексагистидиновый домен (HS), полипептид GLP-1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO 1, где $X_1X_2YX_3$ представляет собой аминокислотную последовательность, в которой X_1 выбрана из группы, состоящей из A, R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, R, P, O, S, U, T, W, Y и V, X_2 выбрана из K или N, и X_3 отсутствует или выбрана из H или Q.

2. Гибридный белок CBD-HS-ES-GLP1 по п.1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность $X_1X_2YX_3$ представляет собой VKY.

3. Гибридный белок CBD-HS-ES-GLP1 по п.1, отличающийся тем, что аминокислотная последовательность $X_1X_2YX_3$ представляет собой VNY.

4. Рекомбинантная плазмидная ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1 для экспрессии гибридного белка по п.1, состоящая из следующих ключевых генетических элементов:

- промотора T7 и оператора lacO;
- синтетической нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO 5, кодирующую гибридный белок по п. 1;
- гена устойчивости к антибиотику для проведения отбора рекомбинантных клеток;
- ориджина репликации бактериофага f1 (f1 ori).

5. Рекомбинантная плазмидная ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1 по п. 4, отличающаяся тем, что имеет длину 3953 п. о., содержит в качестве гена устойчивости к антибиотику ген устойчивости к антибиотику ампициллину (*AmpR*) и бактериальный промотор гена устойчивости к ампициллину (*AmpR промотор*), и имеет расположение элементов, как показано на Фиг. 1.

6. Рекомбинантная плазмидная ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1 по п. 4, отличающийся тем, что имеет длину 3820 п. о., содержит в качестве гена устойчивости к антибиотику ген устойчивости к антибиотику канамицину (*KanR*), и имеет расположение элементов, как показано на Фиг. 2.

7. Рекомбинантная плазмидная ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1 по п. 4, которая представляет собой рекомбинантную плазмиду pET-parB-CBD-HS-ES-GLP1, отличающаяся тем, что имеет длину 4391 п. о., содержит в качестве гена устойчивости к антибиотику ген устойчивости к антибиотику канамицину (*KanR*), дополнительно содержит hok/sok locus, стабилизирующий плазмиды, и имеет расположение элементов, как показано на Фиг.

3.

8. Штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/CBD-HS-ES-GLP1, продуцирующий гибридный белок по п. 1, содержащий рекомбинантную плазмидную ДНК pET23b- CBD-HS-ES-GLP1 по п.4.

9. Штамм *Escherichia coli* по п. 8, отличающийся тем, что получен путём трансформации клеток штамма *Escherichia coli* B 21(DE3) рекомбинантной плазмидной ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1 по п.5.

10. Штамм *Escherichia coli* по п. 8, отличающийся тем, что получен путём трансформации клеток штамма *Escherichia coli* BL21(DE3) рекомбинантной плазмидной ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1 по п. 6.

11. Штамм *Escherichia coli* по п. 8, отличающийся тем, что получен путём трансформации клеток штамма *Escherichia coli* BL21(DE3) рекомбинантной плазмидной ДНК pET23b-CBD-HS-ES-GLP1 по п. 7.

12. Способ получения полипептида GLP1, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO 1, включающий стадии:

а) культивирования штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21(DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 по любому из п. 8—11 с получением биомассы клеток штамма-продуцента, продуцирующего гибридный белок CBD-HS-ES-GLP1 по п. 1;

б) выделения гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 по п.1 из биомассы клеток штамма-продуцента, полученных на стадии а);

с) ферментативного расщепления гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1, полученного на стадии б), с образованием полипептида GLP-1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 1;

д) очистки полипептида GLP-1, полученного на стадии с).

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что на стадии б) осуществляют отделение клеток от культуральной жидкости, дезинтеграцию клеток, выделение тел включений из полученного дезинтеграта и солюбилизацию тел включения.

14. Способ по п. 12 или 13, отличающийся тем, что на стадии б) при выделении тел включения из полученного дезинтеграта добавляют сульфат аммония

15. Способ по любому из п. 12—14, отличающийся тем, что культивирование клеток *Escherichia coli* BL21 (DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 на стадии а) проводят в ростовой среде на протяжении по меньшей мере 7 часов.

16. Способ по любому из п. 12—15, отличающийся тем, что на стадии а) проводят индукцию биосинтеза рекомбинантного белка клетками *Escherichia coli* BL21 (DE3)/CBD-HS-ES-GLP1 через 3 часа после начала культивирования при помощи изопропил-β-D-1-

тиогалактоприанозида.

17. Способ по любому из п. 12—16, отличающийся тем, что на стадии с) расщепление гибридного белка осуществляют энтеропептидазой.

18. Способ по любому из п. 12—17, отличающийся тем, что на стадии b) очистку полипептида GLP-1 осуществляют с использованием одной стадии хроматографии.

19. Способ по любому из п. 12—17, отличающийся тем, что на стадии b) очистку полипептида GLP-1 осуществляют с использованием нескольких стадий хроматографии.

20. Способ по любому из п. 12—19, отличающийся тем, что на стадии b) очистку гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 осуществляют хроматографически на металл-хелатном сорбенте.

21. Способ по любому из п. 12—19, отличающийся тем, что на стадии b) очистку гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 осуществляют хроматографически на катионообменном сорбенте.

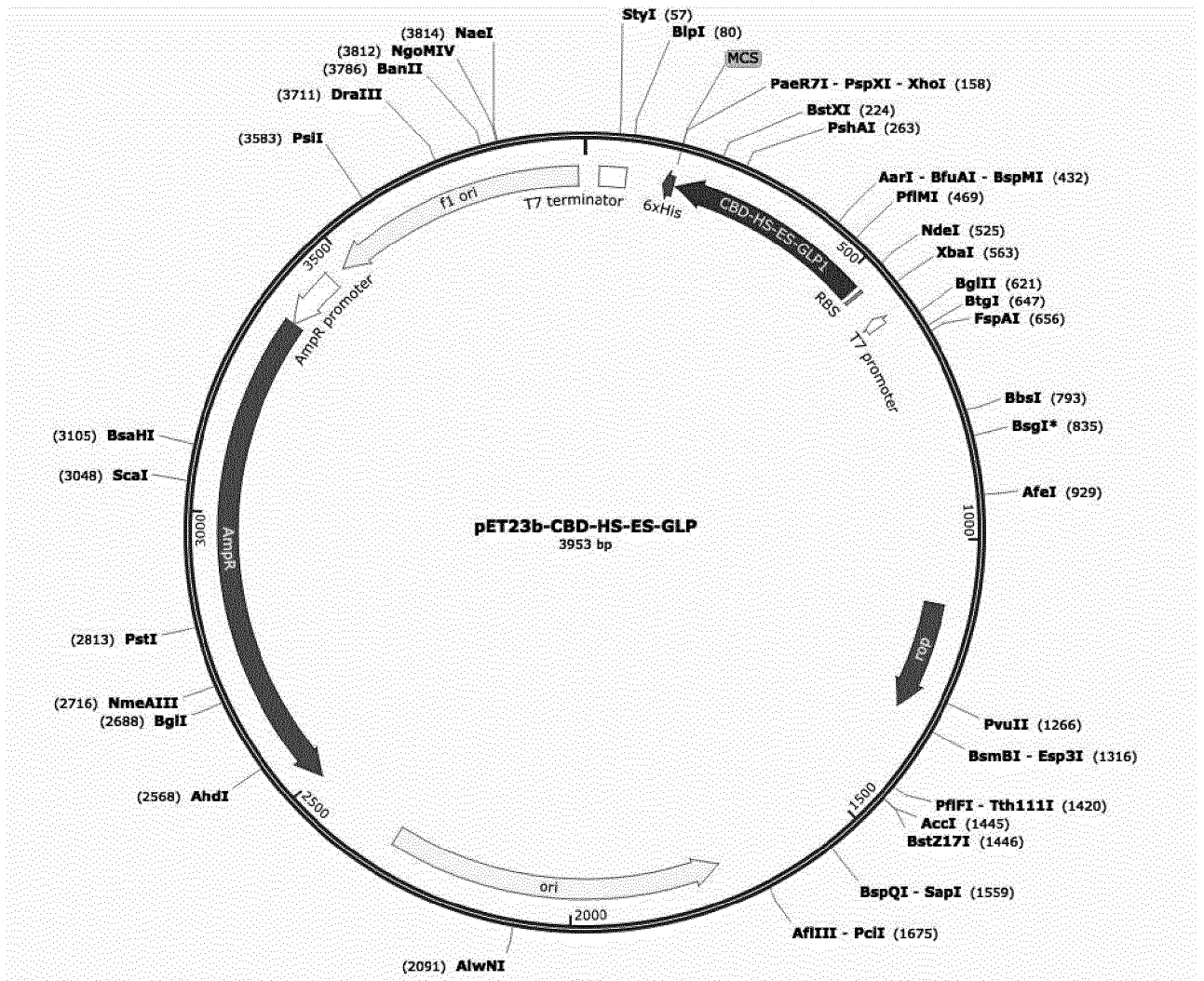
22. Способ по любому из п. 12—19, отличающийся тем, что на стадии b) очистку гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 осуществляют хроматографически на хитиновом сорбенте.

23. Способ по любому из п. 12—21, отличающийся тем, что на стадии d) очистку полипептида GLP-1 осуществляют с использованием обращенно-фазовой хроматографии.

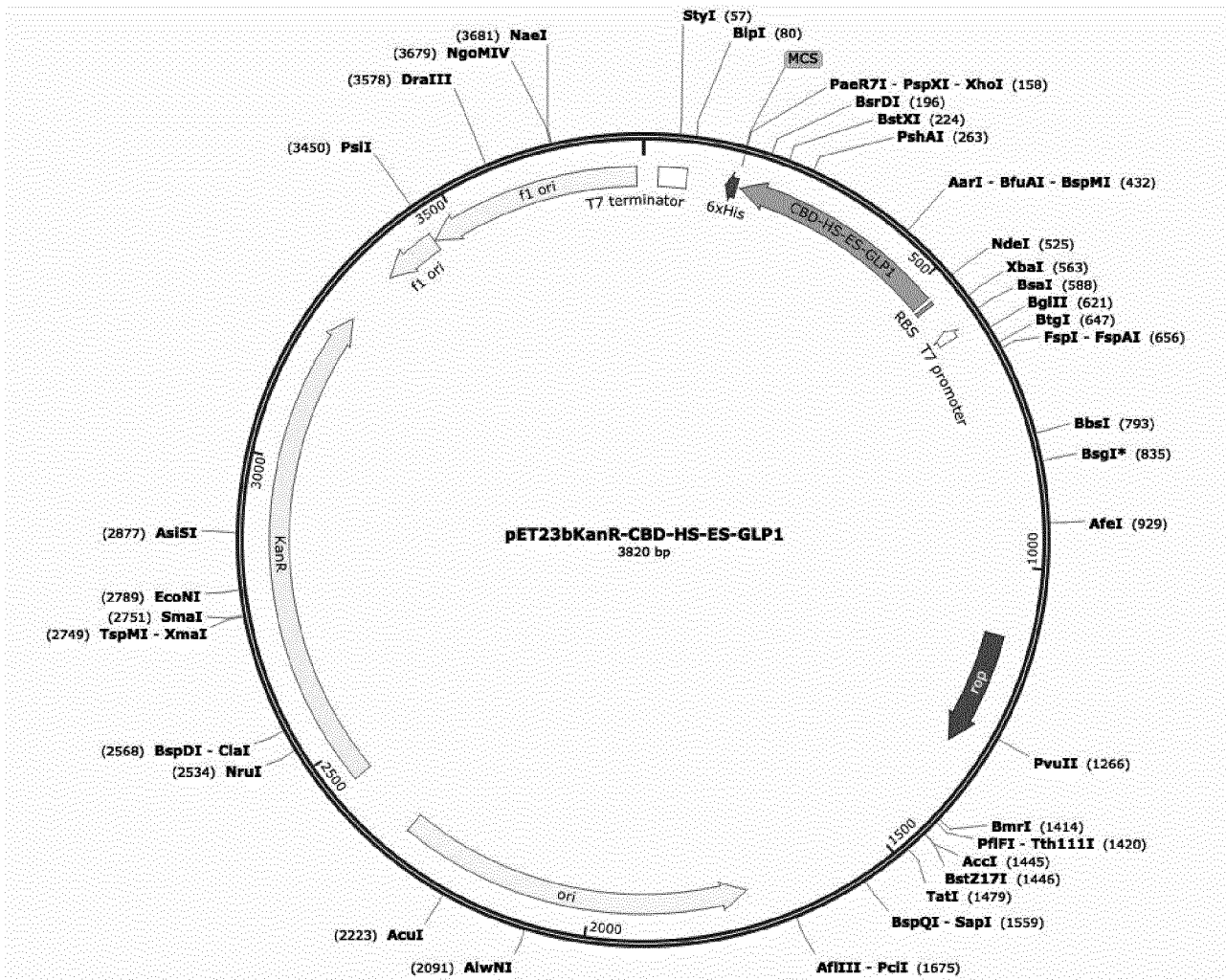
24. Способ по любому из п. 12—22, отличающийся тем, что на стадии d) очистку полипептида GLP-1 осуществляют с использованием гель-фильтрационной хроматографии.

25. Способ по любому из п. 12—22, отличающийся тем, что на стадии d) очистку полипептида GLP-1 осуществляют при помощи осаждения сульфатом аммония и экстракции примесей буферным раствором.

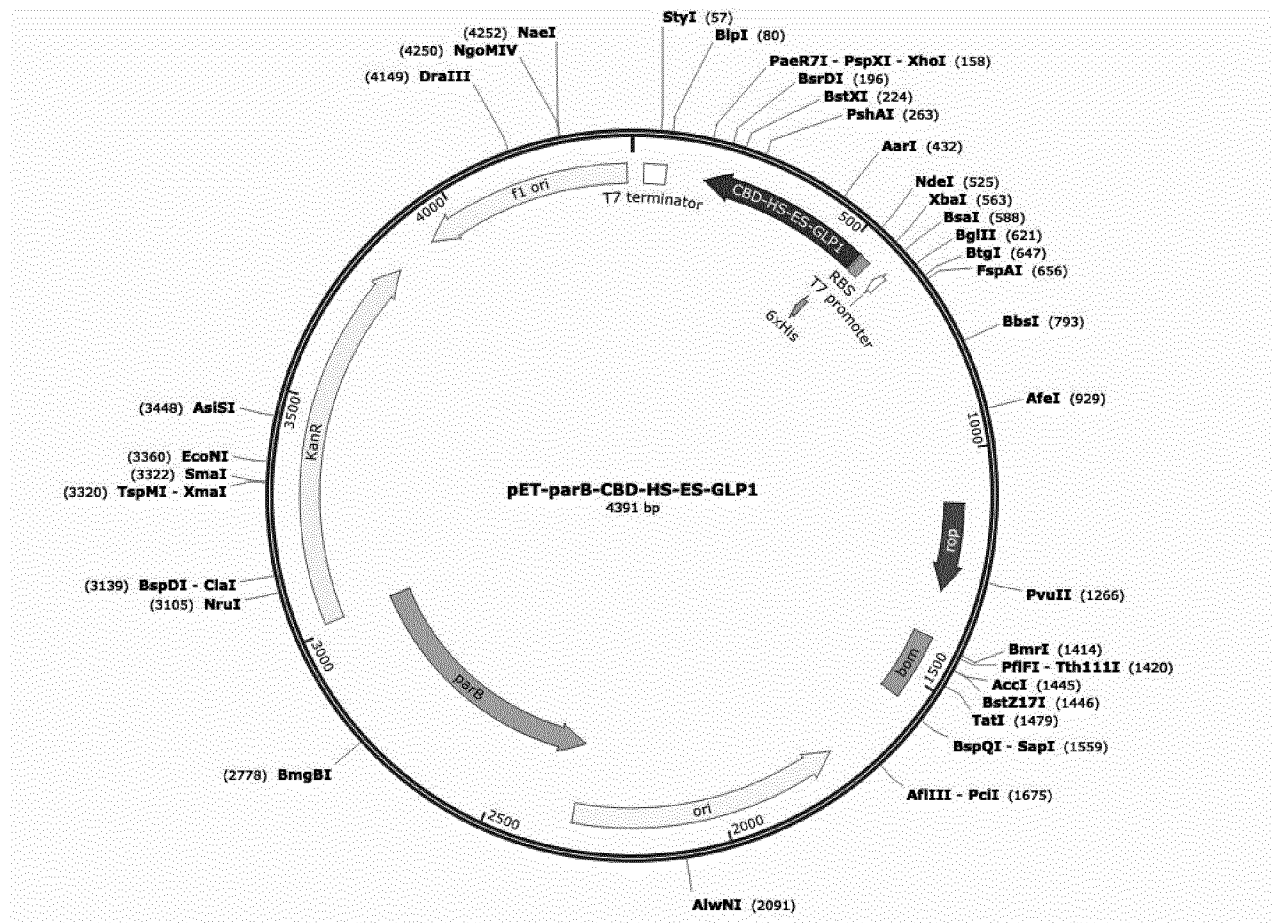
26. Способ по любому из п. 12—22, отличающийся тем, что на стадии d) очистку гибридного белка CBD-HS-ES-GLP1 осуществляют хроматографически на хитиновом сорбенте.



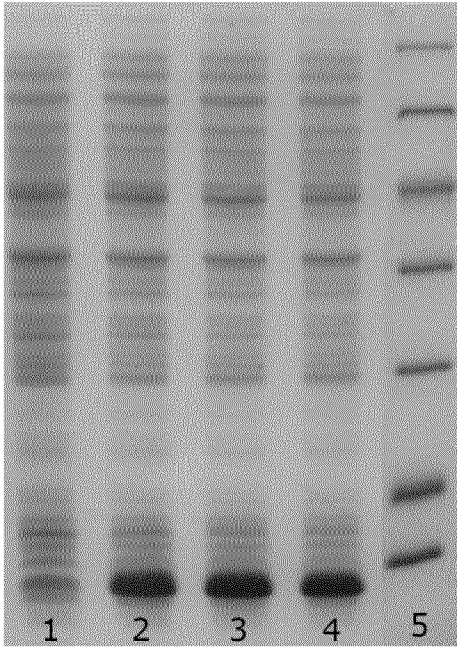
Фиг. 1.



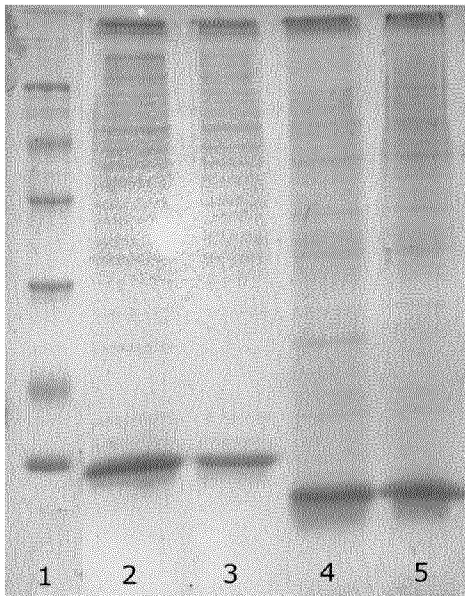
Фиг. 2.



Фиг. 3.



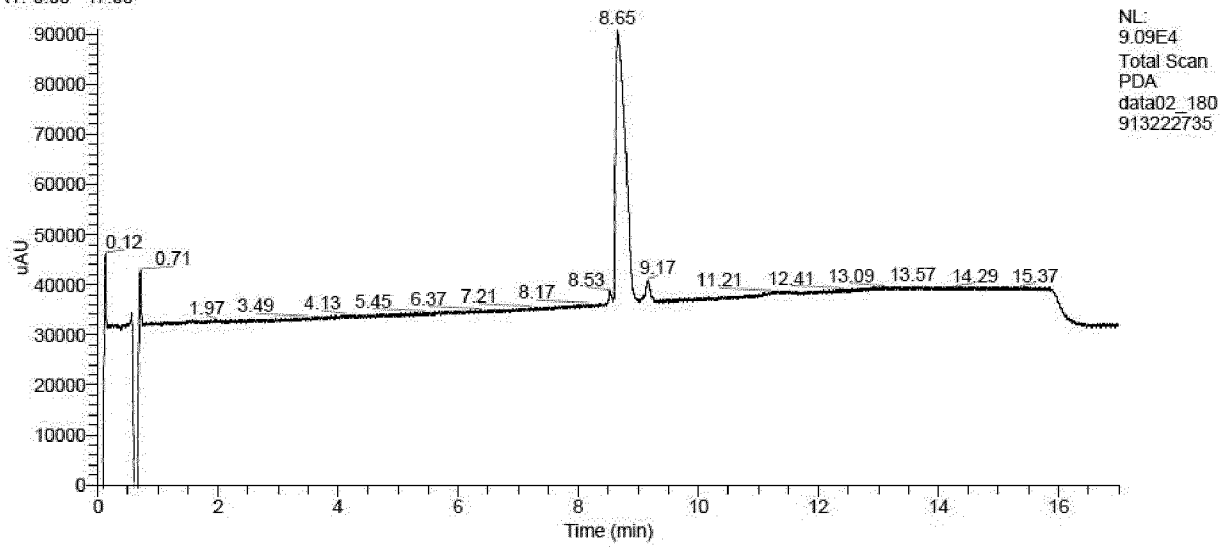
Фиг. 4



Фиг.5

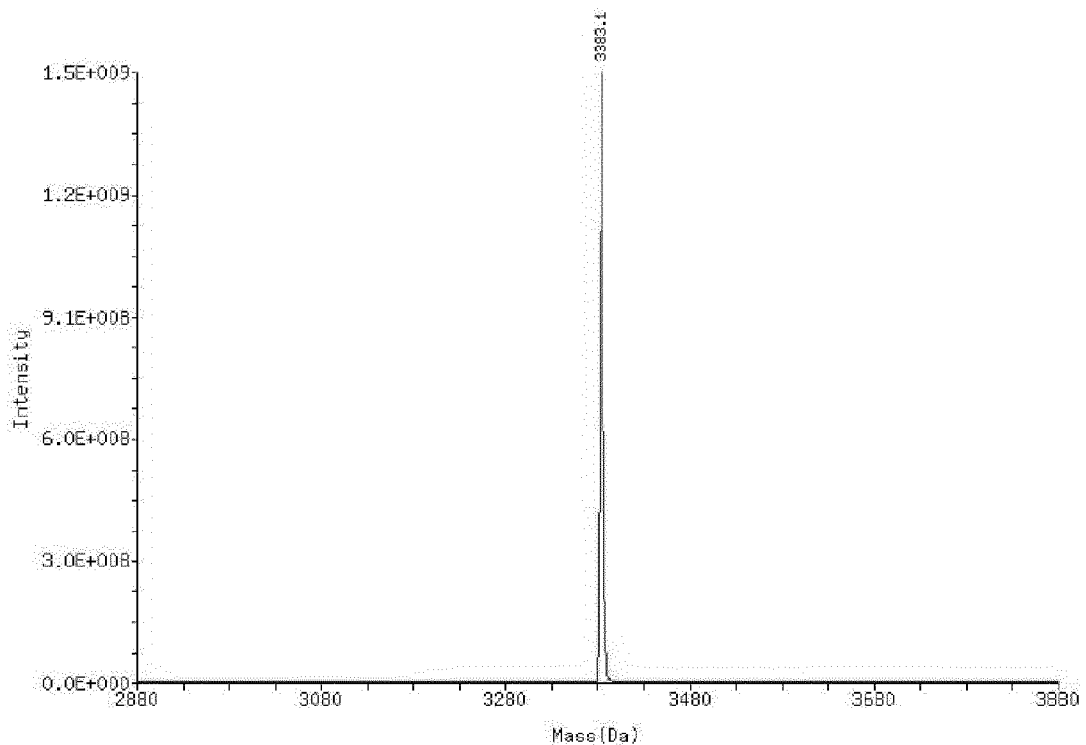
D:\data\data02_180913222735
liroglutid butyl №18
RT: 0.00 - 17.00

9/13/2018 10:27:35 PM
inj: 20.000000

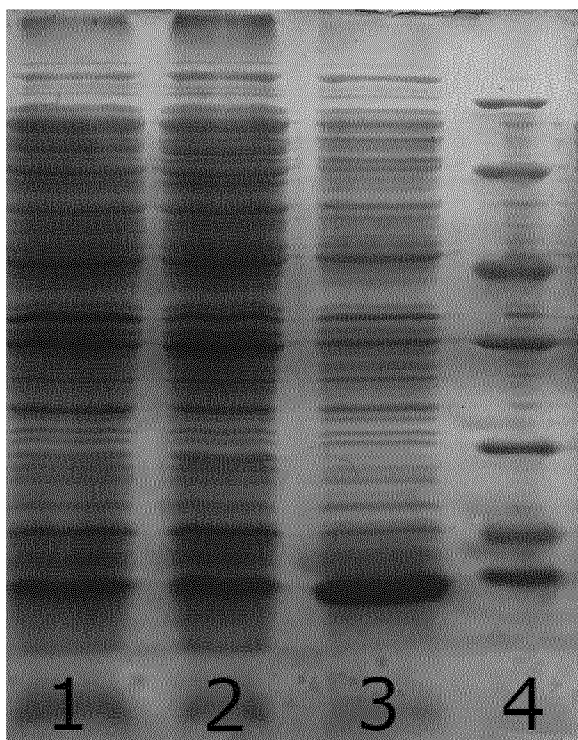


Фиг. 6.

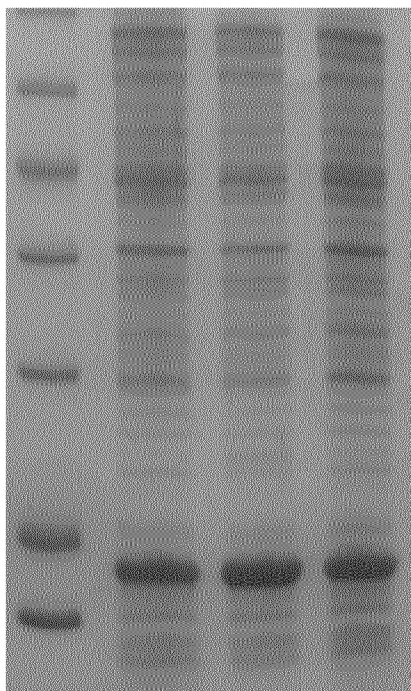
[<<] [Top] [ESI Mass Spectrum] [Deconvolution] [Deconvolution Peak Report] [View Data] [Log File]
Zoom Display Deconvoluted Mass Spectrum:



Фиг. 7.



Фиг. 8.



Фиг. 9.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:
202291910

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C07K 14/605, 19/00, C12N 15/62, 15/70, 1/21, C12P 21/02, C12R 1/19

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, ЕАПАТИС, ЕРОQUE Net, Reaxys, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
D, A	WO 2018/136572 A1 (SAVIOR LIFETEC CORP et al.) 26.07.2018, параграфы [0011]-[0053], [0081], [0084]-[0086]	1-26
A	WO 2020/084496 A1 (JANSSEN PHARMACEUTICA NV et al.) 30.04.2020, параграфы [0010]-[0018], фигура 3	1-26
D, A	US 2015/0259431 A1 (AMUNIX OPERATING INC) 17.09.2015, параграфы [0003]-[0015], [0018], [0030]	1-26
A	US 2019/0112355 A1 (HEPTARES THERAPEUTICS LIMITED) 18.04.2019, формула	1-26

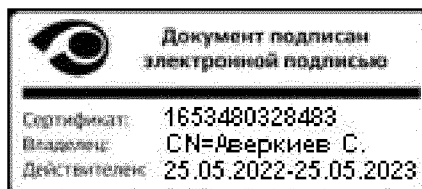
последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«А» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 09 ноября 2022 (09.11.2022)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202291910

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

C07K 14/605 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)