

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ  
СОБСТВЕННОСТИ

(19) ВУ (11) 24728

(13) С1

(45) 2025.11.05

(51) МПК

C 12N 1/21 (2006.01)

C 12N 15/70 (2006.01)

C 12N 15/29 (2006.01)

C 12R 1/19 (2006.01)

## (54) РЕКОМБИНАНТНЫЙ ШТАММ ESCHERICHIA COLI, ПРОДУЦИРУЮЩИЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ АЛЛЕРГЕН BET V 1

(21) Номер заявки: а 20240179

(22) 2024.08.02

(71) Заявитель: Государственное учреждение "Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья" (ВУ)

(72) Авторы: Пархомчук Ольга Юрьевна; Фомина Елена Георгиевна; Григорьева Елена Евгеньевна (ВУ)

(73) Патентообладатель: Государственное учреждение "Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья" (ВУ)

(56) HOFFMANN-SOMMERGRUBER K. et al. High-level expression and purification of the major birch pollen allergen, Bet v 1. Protein expression and purification, 1997, № 9, p. 33-39.

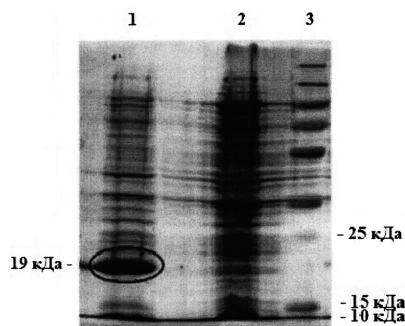
WEISS C. et al. High-level expression of tree pollen isoallergens in Escherichia coli. Int Arch Allergy Immunol, 1996, № 110, p. 282-287.

FERREIRA F. et al. Dissection of immunoglobulin E and T lymphocyte reactivity of isoforms of the major birch pollen allergen Bet v 1: potential use of hypoallergenic isoforms for immunotherapy. J. Exp. Med., 1996, v. 183, p. 599-609.

ПАРХОМЧУК О.Ю. и др. Получение экспрессирующего вектора, содержащего нуклеотидную последовательность гена, кодирующего белок Bet v 1 - основной аллерген пыльцы березы. Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук, 2023, т. 68, № 2, с. 104-113.  
RU 2618840 С2, 2017.

(57)

Рекомбинантный штамм бактерий Escherichia coli РКПБА-Б-660, продуцирующий рекомбинантный аллерген Bet v 1.



Фиг. 1

Изобретение относится к микробиологии, биотехнологии, иммунологии и аллергологии и решает задачу получения нового штамма - продуцента рекомбинантного аллергена Bet v 1 (изоформа Bet v 1.0101).

Для получения синтетических форм аллергенов используются как эукариотические, так и прокариотические системы экспрессии [1]. Что касается белка Bet v 1, то для синтеза этого полипептида применяются и те, и другие системы, у каждой из которых есть свои преимущества и недостатки. В частности, известны исследования, согласно которым для экспрессии белка Bet v 1 были использованы растительные организмы. Одним из таких растений является представитель семейства пасленовых *Nicotiana benthamiana* [2]. Другой метод заключался в использовании геминивирусного вектора pBYR2HS, содержащего соответствующую вставку, с дальнейшей его трансформацией в *Agrobacterium tumefaciens*. Листья *Nicotiana benthamiana* погружали в суспензию, содержащую трансформированные агробактерии, и подвергали вакуумной инфльтрации [3]. Также известны и такие платформы для производства рекомбинантного аналога главного аллергена пыльцы березы, как зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* и трансгенный рис [4]. Результаты всех этих исследований доказывают возможность достаточно успешного использования растительных организмов для получения синтетических форм аллергенов. Однако наряду с большим количеством преимуществ применения таких систем экспрессии существует и ряд недостатков. Основная проблема заключается в сложных методах экстракции полученных таким способом белков, что в результате негативно отражается на конечном количестве целевого продукта [5]. Что касается прокариотических систем экспрессии, то наиболее изученной и часто применяемой при получении аллергена Bet v 1 является система *Escherichia coli* [6-9].

Известен способ получения неанафилактических форм аллергенов, основанный на применении рекомбинантных технологий [10]. В качестве аллергена был использован основной аллерген пыльцы березы Bet v 1. Ген, кодирующий белок Bet v 1, встраивали в плазмиду pET17b в виде димера, тримера и тетрамера. Полимеры Bet v 1 были экспрессированы в *Escherichia coli* BL21 (DE3) и очищены.

Разработан способ получения рекомбинантного полипептида для лечения и профилактики аллергии на пыльцу березы и яблоко, содержащего пептидные фрагменты аллергенов Bet v 1 и Mal d 1, слитые с полипептидом PreS вируса гепатита В [11]. Для экспрессии рекомбинантных полипептидов была использована бактериальная система *Escherichia coli* BL21(DE3) и плазида pET27b.

Способ получения и оценки свойств рекомбинантного аналога мажорного аллергена пыльцы березы Bet v 1 основывается на получении генетической конструкции, содержащей оптимизированную последовательность для гетерологичной экспрессии белка Bet v 1A в бактериальной системе *Escherichia coli* штамм M15[pREP4]. В качестве экспрессирующего вектора использована плазида pQE-30, содержащая T5 промотор под регуляцией lac-оперонов и имеющая ген устойчивости к ампициллину [9].

Из известных штаммов-продуцентов наиболее близким по технической сущности к предлагаемому является штамм *Escherichia coli* pMW175/BL21(DE3) (прототип) [8]. Штамм-прототип получен трансформацией *Escherichia coli* BL21(DE3) рекомбинантной плазмидой pMW175, в которой содержится ген, кодирующий белок Bet v 1. Продуктивность штамма в отношении рекомбинантного аллергена Bet v 1 составляет 8-10 мг/л очищенного рекомбинантного белка на литр культуральной среды. Очистка полученного полипептида проходила в несколько этапов, включая ионообменную и гидрофобную хроматографию.

Недостатками штамма-прототипа являются сравнительно невысокая продуктивность рекомбинантного аллергена Bet v 1 и многостадийность очистки целевого продукта.

Задачей заявленного изобретения является получение штамма *Escherichia coli*, эффективно продуцирующего рекомбинантный аллерген Bet v 1 в растворимой форме, оптими-

зация очистки синтезированного полипептида от бактериальных белков с использованием высокоаффинной металл-хелатной хроматографии за счет присоединения к N-концу белка 10 остатков гистидина, достижение концентрации целевого продукта в количестве 15-20 мг/л бактериальной культуры.

Поставленная задача достигается следующим образом.

Получен рекомбинантный штамм бактерий *Escherichia coli* РКПБА-Б-660, продуцирующий рекомбинантный аллерген Bet v 1.

Источником гена, кодирующего белок Bet v 1, являлась пыльца березы повислой, собранная на территории Республики Беларусь. Для выделения РНК был использован метод, основанный на применении LiCl [12]. Синтез кДНК на матрице РНК осуществляли с помощью реакции обратной транскрипции с применением набора реагентов RevertAid First cDNA Synthesis Kit производства Thermo Scientific, США, согласно прилагаемой инструкции. Амплификаты гена, кодирующего белок Bet v 1, получали методом ПЦР с использованием специфических олигонуклеотидных последовательностей, синтезированных ООО "АртБиоТех", Республика Беларусь. Праймеры содержали дополнительные сайты рестрикции для последующего клонирования в экспрессирующий вектор pJC40 [13]: BetvldH 5' - CGCGAAGCTTATGGGTGTTTTCAATTACGA - 3' (прямой), BetvIrx 5' - GCGCCTCGAGGTTGTAGGCATCGGAGTG - 3' (обратный). Для анализа фрагментов ДНК, полученных в результате проведения ПЦР, использовали метод электрофореза в 1,5 % агарозном геле. Продукт, соответствующий гену, кодирующему белок Bet v 1, выделяли и лигировали в вектор pJC40 после обработки вставки и плазмиды рестриктазами HindIII (Fermentas, Литва) и XhoI (Thermo Scientific, США).

В качестве лигирующего фермента использовали T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) согласно инструкции производителя. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* XLBlue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI qZΔM15 Tn10 (Tet r)]), полученные с последующим высевом на плотную питательную среду LB (Titan Biotech, India) (1 % триптон, 0,5 % дрожжевой экстракт, 0,5 % NaCl), содержащую 50 мкг/мл ампициллина. Одиночные колонии переносили в колбы, содержащие 25 мл среды LB с ампициллином, и культивировали 12 ч при постоянном шейкировании при + 37 °С. Выделение плазмидных ДНК осуществляли колоночным методом с использованием набора реагентов GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя. Наличие вставки в плазмидных ДНК проверяли с использованием рестриктаз HindIII, XhoI (Thermo Scientific, США). Специфичность клонированного фрагмента подтверждали с помощью секвенирования по методу Сэнгера [14]. При постановке секвенирующей реакции использовали набор Brilliant Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Scientific) в соответствии с инструкцией производителя; для разделения фрагментов ДНК, полученных в результате секвенирующей реакции, - метод капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе 3500 xL Applied Biosystems; для последующей обработки полученных данных - программу Bioedit Sequence Alignment Editor, version 7.2.5. В результате была получена плазида pJC40-Bet v 1, несущая ген, кодирующий белок Bet v 1.

Путем последующей трансформации плазмидой pJC40-Bet v 1 клеток *Escherichia coli* BL21(DE3) был получен рекомбинантный штамм бактерий *Escherichia coli* РКПБА-Б-660, продуцирующий рекомбинантный аллерген Bet v 1.

Рекомбинантный штамм бактерий *Escherichia coli* РКПБА-Б-660 отличается от штамма-реципиента BL21(DE3) наличием нескольких копий рекомбинантной плазмиды pJC40-Bet v 1, в которую встроен ген, ответственный за синтез гетерологичного (своего растению) белка Bet v 1.

Благодаря примененной более эффективной (чем в случае прототипа) системе экспрессии клонированного гена, кодирующего белок Bet v 1, клетки рекомбинантного штамма бактерий *Escherichia coli* РКПБА-Б-660 проявляют способность к более высокой

## BY 24728 C1 2025.11.05

продукции аллергена Bet v 1, которая, судя по электрофоретическому анализу в полиакриламидном геле, накапливается в клетках в мажорном количестве от суммарного водорастворимого белка.

Рекомбинантный штамм бактерий *Escherichia coli* депонирован в Республиканскую коллекцию патогенных биологических агентов под № РКПБА-Б-660 от 25.06.2024 и характеризуется следующими свойствами.

Генотип.

*Escherichia coli* BL21(DE3) (F-ompT hsdS(rB- mB-) gal dcm  $\lambda$ (DE3)). Клетки содержат плазмиду со встроенным геном, кодирующим белок Bet v 1 и геном amp, детерминирующим устойчивость клеток к ампициллину.

Культурально-морфологические особенности штамма.

Грамотрицательные прямые палочки размером  $(1,1-1,5) \times (2,0-3,0)$  мкм, одиночные, спор и капсул не образуют. Клетки хорошо растут на простых питательных средах, например, на среде Lysogeny broth (LB), содержащих в качестве селективирующего агента ампициллин в концентрации 50 мкг/мл. На агаризованной среде - колонии гладкие, круглые, слабо выпуклые, с ровным краем. В жидких средах образуют равномерную светорассеивающую суспензию, при хранении без перемешивания оседают на дно. Для клеток характерен оптимум роста при  $+37^\circ\text{C}$ . Интервал pH-оптимума роста составляет 7,4-7,5.

Характеристики полезного вещества, синтезируемого штаммом.

Рекомбинантный белок - аллерген Bet v 1 (изоформа Bet v 1.0101) длиной 160 аминокислотных остатков и гистидиноый "хвост" (10 аминокислот). Продуктивность рекомбинантного штамма бактерий *Escherichia coli* РКПБА-Б-660 составляет не менее 10-15 % белка клеточного лизата при культивировании в условиях индукции.

Клетки штамма-продуцента хранят в жидком азоте в криопротекторе (10 % глицерина) бессрочно.

Для культивирования рекомбинантного штамма бактерий *Escherichia coli* РКПБА-Б-660 с целью получения Bet v 1 применяют питательную среду LB (pH = 7,5), приготовленную на дистиллированной воде, следующего состава (%):

триптон	1,0
дрожжевой экстракт	0,5
NaCl	0,5
ампициллин	50 мкг/мл.

Для наработки рекомбинантного белка проводят культивирование трансформированных бактериальных клеток штамма *Escherichia coli* РКПБА-Б-660 на жидкой питательной среде LB, содержащей ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, при постоянном встряхивании на шейкере при  $+37^\circ\text{C}$  до момента достижения клеточной культурой оптической плотности OD 600 = 0,3. Биосинтез целевого белка индуцировался внесением в питательную среду изопропил- $\beta$ -D-тиогалактопиранозид в конечной концентрации 0,4 мМ с дальнейшей инкубацией в течение 3 ч при тех же условиях. Осажденные центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин) бактериальные клетки ресуспендировали в буферном растворе (0,5 М NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH = 8,0).

Оценку специфичности рекомбинантного аллергена проводили с использованием разработанного иммуноферментного лия-теста, в основе которого лежит реакция "антиген - антитело". В качестве антигена был использован полученный рекомбинантный белок в концентрации 1 мкг/мл. В качестве источника специфических антител к рекомбинантному полипептиду Bet v 1.0101 были использованы сыворотки пациентов, страдающих поллинозом, в том числе и на пыльцу березы. Интерпретацию полученных результатов проводили в соответствии с наличием/отсутствием специфически окрашенных полос преципитации в области нанесения белка Bet v 1.0101.

Предлагаемый штамм получен впервые и никогда ранее не использовался для получения рекомбинантного аллергена Bet v 1 (изоформа Bet v 1.0101).

## Пример.

Трансформацию компетентных клеток *Escherichia coli*, штамм BL21(DE3), осуществляли рекомбинантной плазмидой pJC40-Bet v 1, содержащей нуклеотидную последовательность гена, кодирующего белок Bet v 1.0101. Культивирование трансформированных бактериальных клеток штамма *Escherichia coli* РКПБА-Б-660 осуществляли на жидкой питательной среде LB, содержащей ампициллин в концентрации 50 мкг/мл, при постоянном встряхивании на шейкере при + 37 °С до момента достижения клеточной культурой оптической плотности OD 600 = 0,3. Биосинтез целевого белка индуцировался внесением в питательную среду изопропил-β-D-тиогаляктопиранозида в конечной концентрации 0,4 мМ с дальнейшей инкубацией в течение 3 ч при тех же условиях. Осажденные центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин) бактериальные клетки ресуспендировали в буферном растворе (0,5 М NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH = 8,0). В результате индукции синтеза рекомбинантного белка Bet v 1.0101 в составе полученного экспрессирующего плазмидного вектора был получен бактериальный лизат. Электрофоретический анализ лизата бактериальных клеток представлен на фиг. 1 (дорожка 1 - лизат бактериальных клеток после индукции ИПТГ; дорожка 2 - лизат бактериальных клеток без индукции ИПТГ; дорожка 3 - маркер молекулярных масс). Величина клонированного в экспрессирующий вектор фрагмента составляет 480 п.н., или 160 аминокислотных остатков, с расчетной массой полипептида 19,6 кДа (с учетом положения сайтов рестрикции и гистидинового "хвоста"). На гель-электрофорезе в области 19 кДа видна мажорная полоса на фоне значительного подавления синтеза бактериальных белков.

Получение рекомбинантного полипептида, максимально очищенного от клеточных белков, осуществляли с использованием аффинной металлхелатной хроматографии на автоматическом жидкостном хроматографе среднего давления FPLC ÄKTAexplorer 100 (GE Healthcare) с применением колонки HisTrap Chelating HP (GE Healthcare) объемом 1 мл в денатурирующих условиях. Очистка целевого белка при использовании данного метода происходит за счет взаимодействия N-концевых гистидиновых остатков рекомбинантного полипептида с иммобилизованными на сорбенте ионами металлов (Ni<sup>2+</sup>). На фиг. 2 представлены результаты очистки рекомбинантного аллергена Bet v 1 от бактериальных белков (дорожка 1 - лизат бактериальных клеток после индукции ИПТГ; дорожка 2 - лизат бактериальных клеток после обработки ультразвуком и центрифугирования; дорожка 3 - бактериальный лизат после нанесения на колонку; дорожки 4, 6 - фракции отмывки; дорожка 5 - маркер молекулярных масс; дорожки 7, 8 - фракции элюции). Фракции элюции содержат белок с молекулярной массой, соответствующей теоретически рассчитанной (~19 кДа). Наблюдался достаточно высокий уровень экспрессии целевого продукта (~15-20 мг/л) со следовым количеством бактериальных белков.

Оценку специфичности рекомбинантного аллергена проводили с использованием разработанного иммуоферментного лиа-теста, в основе которого лежит реакция "антиген - антитело". В качестве антигена был использован полученный рекомбинантный белок в концентрации 1 мкг/мл. В качестве источника специфических антител к рекомбинантному полипептиду Bet v 1 были использованы сыворотки пациентов, страдающих поллинозом (с сенсibilизацией на пыльцу березы (положительный контроль) и сыворотки пациентов с сенсibilизацией к другим пыльцевым аллергенам (атопический контроль). Интерпретацию полученных результатов проводили в соответствии с наличием/отсутствием специфически окрашенных полос преципитации в области нанесения белка Bet v 1. На фиг. 3 представлены результаты оценки специфичности полученного полипептида Bet v 1. Наличие характерного окрашивания в области нанесения белка свидетельствовало об образовании комплекса "аллерген - антитело" на стрипах, обработанных сыворотками с высоким содержанием антител к Bet v 1 (№ 1-8), и отсутствие таких полос на стрипах, обработанных сыворотками, не содержащими специфических к Bet v 1 аллергену антител (№ 9-11), является доказательством специфичности полученного рекомбинантного аллергена.

# BY 24728 C1 2025.11.05

Таким образом, получен штамм *Escherichia coli*, эффективно продуцирующий растворимый рекомбинантный белок Bet v 1 (15-20 мг/л) за счет присоединения к N-концу полипептида 10 остатков гистидина, при этом очистку белка Bet v 1 проводят в одну стадию посредством использования высокоаффинной металл-хелатной хроматографии.

Источники информации:

1. SINGH M.B. et al. Recombinant expression systems for allergen vaccines. *Inflammation & allergy drug targets*, 2006, № 5(1), p. 53-59.

2. KREBITZ M. et al. Rapid production of the major birch pollen allergen Bet v 1 in *Nicotiana benthamiana* plants and its immunological in vitro and in vivo characterization. *FASEB J*, 2000, № 14(10), p. 1279-1288.

3. YAMADA Y. et al. High-Yield Production of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 With Allergen Immunogenicity in *Nicotiana benthamiana*. *Front Plant Sci*, 2020, № 11, p. 344.

4. HIRSCHL S. et al. Expression and Characterization of Functional Recombinant Bet v 1.0101 in the Chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int Arch Allergy Immunol*, 2017, № 173 (1), p. 44-50.

5. SCHMIDT M. et al. Expression systems for production of recombinant allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002, № 128(4), p. 264-270.

6. WEISS C. et al. High-level expression of tree pollen isoallergens in *Escherichia coli*. *Int Arch Allergy Immunol*, 1996, № 110(3), p. 282-287.

7. WALLNER M. et al. The influence of recombinant production on the immunologic behavior of birch pollen isoallergens. *PLoS One*, 2009, № 4 (12), e8457.

8. HOFFMANN-SOMMERGRUBER K. et al. High-level expression and purification of the major birch pollen allergen. Bet v 1. *Protein Expr Purif*, 1997, № 9(1), p. 33-39.

9. ПАВЛОВ Н.А. и др. Получение и оценка свойств рекомбинантного аналога мажорного аллергена пыльцы березы Bet v 1. *Российский аллергологический журнал*, 2012, № 3, с. 7-13.

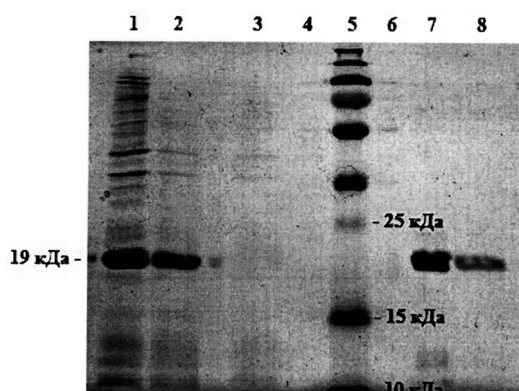
10. EP 1019085, 2000.

11. RU 2761431, 2022.

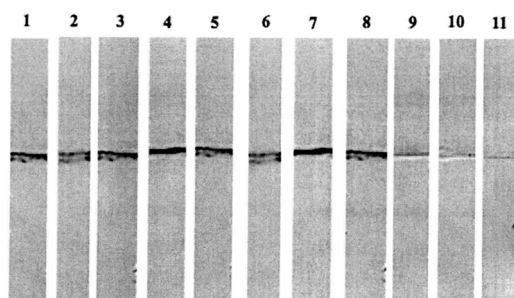
12. BIJLI K. et al. Isolation of total RNA from pollens. *Preparat. Biochem. Biotechnol*, 2001, v. 31, № 2, p. 155-162.

13. CLOS, J. et al. pJC20 and pJC40 - two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif*, 1994, v. 5, № 2, p. 133-137.

14. SANGER, F. et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, 1977, v. 74, № 12, p. 5463-5467.



Фиг. 2



Фиг. 3