



(19) **SU** ⁽¹¹⁾ **1 703 693** ⁽¹³⁾ **A1**
(51) **iiE**

ΑΙΝΟΑΑΘΝΟΑΑΙΙΟΥΕ ΕΙΙΕΟΑΟ ΙΙ
ΑΑΕΑΙ ΕÇΙΑΘΑΟΑΙΕΕ Ε ΙΟΕΔΥΟΕΕ

(12) **ΙΙΕΝΑΙΕΑ ΕÇΙΑΘΑΟΑΙΕΒ Ε ΑΑΟΙΘΝΕΙΙΟ ΝΑΕΑΑΟΑΕΥΝΟΑΟ ΝΝΝΘ**

(21), (22) Çà àèà: **4191353, 09.02.1987**

(46) Ααοà τόάεεεάοεε: **07.01.1992**

(56) Νñûεεε: Nucl. Acid. Res., 1983. 11. p. 4307-4323.

(98) Ααδñ äë ιαδαιεñεε:
11 113545 ΙΙΝΕΑΑ, 1-Ε ΑΙΘΙΛΕΙΟΥΕ ΙΘ-Α 1

(71) Çà àèðàεü:

ΑΝΑΝΙΠÇΙΟΥΕ ΙΑΟ×ΙΙ-ΕΝΝΕΑΑΙΑΑΟΑΕΥΝΕΕΕ
ΕΙΝΟΕΟΟΟ ΑΑΙΑΟΕΕΕ Ε ΝΑΕΑΕΟΕΕ ΙΘΙΙΟΥΕΑΙΙΟΥ
ΙΕΕΘΙΙΘΑΑΙΕÇΙΙΑ

(72) Εçιαδàðàðàεü: ΑΑΑΑΑΙΑ ΑΕΑΑΕΙΕΘ

ΑΑΙΘΑΕΑΑΕ×,
ΑΘΑΙ ΥΕΙΑΘ ΒΙΙΑΕ×, ΕΙÇΕΙΑ ΠΘΕΕ
ΕΑΑΙΙΑΕ×, ΙΑΘΕΙ ΝΑΘΑΑΕ
ΑΕΑΑΕΙΕΘΙΑΕ×, ΝΟΘΙΙΑΕΙ ΑΕΑΕΝΑΙΑΘ
ΒΕΙΑΕΑΑΕ×, ΝΟΑΘΕΙ ΑΕΕΟΙΘ ΥΙΕΕΥΑΑΕ×, ΠΘΕΙ
ΑΕΟΑΕΕΕ ΕΥΑΙΑΕ×, ΕΙΝΟΘΙΑ ΝΑΘΑΑΕ
ΑΕΕΟΙΘΙΑΕ×, ΟΕΙΑΙΕΝ ΑΕΑΕΝΑΙΑΘ
ΠΘΥΑΑΕ×, ΑΑΙΟ ΑΙΑΘΕΝ ΒΙΙΑΕ×, ΘΙΙΑΙ×ΕΕΙΑΑ
ΙΑΑΑ/ΕΑΑ ΑΕΕΟΙΘΙΑΙΑ, ΕΙΝΕΕΙΑ ΑΕΑΕΝΑΙΑΘ
ΕΑΑΙΙΑΕ×, ΟΘΟΟΑΙ ΙΑΕΝΕΙ
ΥΑΟΑΘΑΙΑΕ×, ΙΙ×ΟΕΥΝΕΕΕ ΑΙΑΘΑΕ
ΑΕΑΑΕΙΕΘΙΑΕ×, ×ΑΘΙΙΑΝΕΑΒ ΟΑΟΥΒΙΑ
ΑΑΙΕΑΙΕΙΙΑΙΑ, ΙΙΝΙΑΝΕΑΒ ΑΕΑΙΑ
ΑΕΑΕΝΑΑΑΙΑ, ΝΕΑΙΘΟΙΑΑ ΙΑΘΕΙΑ
ΑΕΑΕΝΑΑΑΙΑ, ΙΑÇΑΕΥ ΝΑΑΟΕΑΙΑ
ΙΑΙΑΑΕΑΑΑΙΑ1131111111111111313131111111
111111111

(54) Δαεηηαεηαηοια ιεαçιεαia ΑΙΕ @ - @ 2-19, εηαεδópυα ηελοαç ελοαδεαεεεia-2 +αεηααεα, ηηηηia αα
εηηηοδooεoiaaie @ ðoaii áaεoáðeé ÁSñiaRIñila coLI - ιοiaooáio ελοαδεαεεεia-2 +αεηααεα

S U 1 7 0 3 6 9 3 A 1

S U 1 7 0 3 6 9 3 A 1

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(71) Applicant: **VSESOYUZNYJ NAUCHNO-ISSLEDOVATELSKIJ
INSTITUT GENETIKI I SELEKTSII
PROMYSHLENNYKH MIKROORGANIZMOV**

(72) Inventor: **DEBABOV VLADIMIR GEORGIEVICH,
GREN ELMAR YANOVICH, KOZLOV YURIJ
IVANOVICH, MASHKO SERGEJ
VLADIMIROVICH, STRONGIN ALEKSANDR
YAKOVLEVICH, STERKIN VIKTOR
EMILEVICH, YURIN VITALIJ LVOVICH, KOSTROV
SERGEJ VIKTOROVICH, TSIMANIS ALEKSANDR
YUREVICH, AVOT ANDRIS
YANOVICH, ROMANCHIKOVA NADEZHDA
VIKTOROVNA, KOSIKOV ALEKSANDR
IVANOVICH, TRUKHAN MAKSIM
EDUARDOVICH, MOCHULSKIY ANDREJ
VLADIMIROVICH, CHERNOVSKAYA TATYANA
VENIAMINOVNA, NOSOVSKAYA ELENA
ALEKSEEVNA, SKVORTSOVA MARINA
ALEKSEEVNA, MAZEL SVETLANA
MENDELEEVNA**

(54) DNA PPR-IL 2-19 RECOMBINATION PLASMID WHICH CODES HUMAN INTERLEUCINE-2 SYNTHESIS AND STRUCTURE ESCHERICHIA COLI STRAIN. HUMAN INTERLEUCINE-2 PRODUCENT

[illegible]

pPR-IL2-19 è iðiaðoðeðópueé eioðáðeáeéi-2
 +áeiaiáeá à eíèe+añòàá 8-10 ò 107
 iáæáoiaðíaiúò áá. íà 1 è ááeòáðeáeüííe
 éóeüóóòü, +òí ñíñòááè àò 12% iò ñóliáðííáí
 éeáòí+ííáí ááeéá. 3 ñ.í. ò-eü. 1 èe., 1 óááé.
 Íà +aðòáæá eçíðáðæáíà òeçe+añèá eáðòá
 iðáæéáááííe ðáeííáeíáíòííe ièaç- ièáííe ÁÍÉ,
 Ñéííñòðóeðíááíà ííáà ðáeííáeíáíòíà ièaçíeáá
 pPR-IL2-19 ðaçiáðíí, 85 ò.í.í. íáñííá+eáápüà
 yéñíðáññèp ááíà IL2 ííà eííòðíeai ðááóé ðíðííe
 íáeáñòe PROR. ááeòáðeíðááá À ñíñòí uà eç
 áíèüðíáí 1-3,4 ò.í.í.) BamHI-Bgflí-òðááíáíòá
 ááeòíðííe ièaçiéäü pPR124B è iàeííá (0,45
 ò.í.í.) Ñ 13-Ááð-òðááíáíòá ièaçiéäü ðÁÁ 1213-
 23 (ííæeðeðòííáíííe ááááííeai Bgtll- eéíeáðá)
 è òàðáeòáðeçópüà ñ
 ñeááópueíe iðeçíáeáíè: ñíááðæeò ó+añòíe
 èíeòe(/) Ñ VJ í ñí í p ñí



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

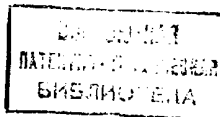
(19) SU (11) 1703693 A1

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГКНТ СССР

(51)5 C 12 N 15/26, 1/21

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



1

- (21) 4191353/13
(22) 09.02.87
(46) 07.01.92. Бюл. № 1
(71) Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов
(72) В.Г.Дебабов, Э.Я.Грен, Ю.И.Козлов, С.В.Машко, А.Я.Стронгин, В.Э.Стеркин, В.Л.Юрин, С.В.Костров, А.Ю.Циманис, А.Я.Авот, Н.В.Романчикова, А.И.Косиков, М.Э.Трухан, А.В.Мочульский, Т.В.Черновская, Е.А.Носовская, М.А.Скворцова и С.М.Мазель
(53) 575.224.2.577.2 (088.8)
(56) Nucl. Acid. Res., 1983, 11, p. 4307-4323.

(54) РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДНАЯ ДНК pPR-IL2-19, КОДИРУЮЩАЯ СИНТЕЗ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА, СПОСОБ ЕЕ КОНСТРУИРОВАНИЯ И ШТАММ БАКТЕРИЙ ESCHERICHIA COLI - ПРОДУЦЕНТ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА

Изобретение относится к микробиологической и медицинской промышленности, молекулярной биологии и генно-инженерной биотехнологии и представляет собой сконструированную *in vitro* рекомбинантную плазмидную ДНК, обеспечивающую микробиологический синтез интерлейкина-2 человека, способ ее конструирования и штамм *E. coli*, содержащий эту рекомбинантную плазмиду - продуцент интерлейкина-2 человека.

Целью изобретения является повышение уровня накопления интерлейкина-2 человека в клетках штамма-продуцента.

2

(57) Изобретение относится к микробиологической и медицинской промышленности, молекулярной биологии и генно-инженерной биотехнологии. Целью изобретения является повышение уровня накопления интерлейкина-2 (ИЛ-2) человека в клетках штамма-продуцента. Методами генной инженерии получена рекомбинантная плазмида pPR-IL2-19, которая обеспечивает регулируемый высокоэффективный синтез интерлейкина-2 человека в клетках *E. coli* под контролем промоторно-операторной области *proO* бактериофага λ . Разработан способ конструирования этой плазмиды. Отобран штамм *E. coli* ВНИИгенетики VL 903 (pPR-IL2-19) (регистрационный номер ВКПМ В-3866 во Всесоюзной коллекции промышленных микроорганизмов), содержащий плазмиду pPR-IL2-19 и продуцирующий интерлейкин-2 человека в количестве $8-10 \times 10^7$ международных ед. на 1 л бактериальной культуры, что составляет 12% от суммарного клеточного белка. 3 с.п. ф-лы, 1 ил., 1 табл.

На чертеже изображена физическая карта предлагаемой рекомбинантной плазмидной ДНК.

Сконструирована новая рекомбинантная плазмида pPR-IL2-19 размером $\approx 3,85$ т.п.н., обеспечивающая экспрессию гена IL2 под контролем регуляторной области *proO* бактериофага λ , состоящая из большого ($\approx 3,4$ т.п.н.) BamHI-BglII-фрагмента векторной плазмиды pPR124B и малого (0,45 т.п.н.) Cfr13-BglII-фрагмента плазмиды pAA 1213-23 (модифицированной введением BglII-линкера) и характеризующаяся следующими признаками: содержит участок иници-

SU 1703693 A1

LA 693071 US

(19) SU (11) 1703693 A1

SU 1703693 A1

SU 1 7 0 3 6 9 3 A1

वैवाले.

5

10

25

30

35

45

55

60

-4-

İİēō+āİēā ōāēāāİē İēāçİēāū,
İāāİā+ēāāpūāē İēİōāç ēİōāōēāēēİā-2
+āēİāāēā, İōİāİā ō ā İāİēİēūēİ
yōāİā, çāēēp+āpūēōİ ā İİçāāİēē
İōİāāōōİ+İİē İēāçİēāū ðÅÅ1213-23Å ē
İİēāāōpūāāİ ēİİİōōēōİāāİē ðāēİāēİāİōİē
İēāçİēāū pPR-IL2-19.

3 iĕā ĀĬĒ iĕāçĭēāū ḏĀĀ 1213-23 ḏāñūāīē pō ā-10 āā. ḏāñōḏēēōāçū Stul ā iḏīāā īāūāīā 30 iĕē, ñīāāḏēāūāē āóōāḏ āē ḏāñōḏēēōēē- (10 īl ḏōēñ-HCl ḏī 7,9, 6 īl MgCl₂, 6 īl 2-iāḏēārīyōāīē, 150 īl NaCl), āāēā ĀĬĒ ñāēāāpō ēç ḏāēōēīīīē ñīāñē āīāāēāīēāī yōāīēā. ñīāāīē īōāāē pō ḏāīḏēōḏāēḏīāīēāī ā 20 iĕē ī20. Āīññīāēāīēā ēēīāāḏēçīāīīē iĕāçĭēāīē ĀĬĒ ñ Bgfl-ēēīēāḏāīē Collaborative Research iḏīāā ō ñ īīīūp 20 āā. ĀĬĒ- ēēāāçū Ō4 ā iḏīāā īāūāīī 30 iĕē, ñīāāḏēāūāē āóōāḏ āē ēēāḏīāīē (60 īl ḏōēñ-HCl, ḏī 7,6. 10 īl MgCl₂, p 2- iāḏēārīyōāīē, 0,4 īl (ĀŌŌ), 2 iĕā iĕāçĭēāīē ĀĬĒ ē 0,5 iĕā ēēīēāḏīā.

Ἰνῆα ἐεᾶδῖαιε ἈἼΕ ἐγ δαεὸεῖνῖε νῖανῖε
 Ἰνᾶᾶᾶᾶᾶᾶ ὑὸαῖνῖε, δᾶνὸαῖδ ᾖ ὁ Ἰᾶᾶᾶᾶᾶᾶ
 ὀαῖαῖᾶὀαὀεῖνῖε ᾶᾶὀῖεῖῥ ὀᾶνὸδῆὀαῖε Bgll
 ᾶ Ἰῖᾶᾶ ἰᾶᾶἰ 40 ἰεῖ. νῖᾶᾶᾶᾶᾶᾶᾶ ᾶὀᾶὀ ᾶῖ
 δᾶνὸδῆὀῖῖ-2 (6 ἰ ὀδῆῖ-HCl, ὀῖ 7,6, 6 ἰ
 MgCl2. 6 ἰ 2-ἰᾶῖᾶῖᾶῖᾶῖ, 50 ἰ NaCl). ἈἼΕ
 ἰᾶῖᾶ Ἰνᾶᾶᾶᾶᾶ ὑὸαῖνῖε, δᾶνὸαῖδ ᾖ ὁ
 ἰᾶᾶῖᾶ+ᾶᾶᾶ ὀῖῖῖῖῖῖῖ Ἰῖᾶῖὀῖ ἈἼΕ. ᾶῖ
 +ᾶῖ 1 ἰῖᾶ ἰᾶῖᾶᾶᾶ ἰᾶῖᾶῖᾶ ἈἼΕ ᾶ 240 ἰῖᾶ
 ᾶὀᾶὀᾶ ᾶῖ ῖῖᾶῖᾶῖᾶ ἰᾶᾶᾶᾶᾶᾶᾶ 2
 ᾶᾶ. ἈἼΕ-ῖῖᾶᾶᾶ Ὀ4. Ἰῖὀ+ᾶῖῖῖ νῖᾶᾶᾶᾶ
 ὀᾶῖνῖὀῖὀὀᾶ ῖῖᾶὀῖ E.coli C600.
 Ὑὀᾶῖὀᾶ; Ἰνὸᾶ ὀᾶῖνῖὀῖᾶὀῖ Ἰνῖᾶᾶᾶ ᾶ ὀ
 5 -10° ῖῖῖῖῖ ἰᾶ 1 ἰῖᾶ ἰᾶὀῖῖῖ
 ἰᾶῖᾶᾶ ὀᾶᾶ ἰᾶῖᾶῖᾶῖᾶ ἈἼΕ Ἰ
 Ἰᾶὀῖὀῖᾶῖᾶῖᾶ ἰᾶὀῖᾶ Ἀὀῖᾶῖᾶ ῖ
 Ἀῖῖ, ῖῖῖῖῖὀᾶ ᾶᾶ ᾶῖ ὀᾶνὸδῆὀῖῖῖῖᾶ
 ᾶᾶῖῖᾶ. Ἰῖὀ+ᾶῖᾶ ὀᾶῖῖ ἰᾶὀᾶῖ
 ἰᾶῖᾶᾶ ὀᾶᾶ1213-23Ἀ ᾶ ἰὀῖῖ+ᾶ ἰ ῖῖᾶῖῖ
 ὀᾶῖᾶῖᾶῖᾶῖᾶ ἰᾶῖᾶὀῖ ὀᾶᾶ1213-23 Ἰᾶᾶὀῖ
 ἰῖῖῖῖῖῖ ὀ+ᾶῖὀῖ ὀᾶᾶῖᾶῖ Bgll
 ᾶᾶῖ ῖᾶᾶᾶῖ Ἰῖᾶᾶᾶᾶᾶᾶ. Ἰ 1 /ῖᾶᾶῖ ἰῖ
 Stul.

30 iea AIE ieaçi eaü ðÄÄ 12 i l -2 JB
ðçñüäië pò ðññòðèèðàçíé Cfr 13 .0° ää
aèèäññòè) a iðíäa íáüäíí 1 ièè ñíääðæäüäé
áóóäð äè ðññòð - ,;+, 1
iðíäóèüü òäðíäíäòèäñíäí äèäðíèèçä
í ääääð- ääpò ýéäèððíðíäçó ä 1.1%-íí ääèä

[illegible]

O aāçîêñêðëáíóëëâîçëàòðëôîñòàòîâ.
Ðààëëèþ ïñòàíáâëëàþò ïðîäóâàíåâà.
ÄÊ ò ñèáñê ïäðîññàâàþò ÿòàííè è

đàñòâĩỗ pò â 20 iêế.

Ἰησοῦς αἰψὺς ῥῆμα ῥῶσιν ὁδὸν αἰσίου ῥῆμα5 ἰεσὺ
 ὁΑΑ1213-23Α ἐκκλῆυξόπο ἰα
 ἀαεὺ ἰαεὺ ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς
 ἀε εἰοαῖ ὁδὸς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς
 εἰοαῖ ὁδὸς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς
 ῥῆμα ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς
 ῥῆμα ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς ὅς

03 iêã ÁÍÊ iëaçiëäü pBR124B
 ðãñüãîë pò ðãñüðëëòàçîë BamHI â iðîãã
 10 iãüàî.ë 12 iëë, ãîããðäüüäë áóðãð äë
 ðãñüðëëüòë- I. Ðãäëüëp ãüàîiãäëëäüò
 ðãîëüüüë äã- iðîääëëçãüëäë ÁÍÊ ë
 iðîäîiãääüäü

15 5 iōēēāēīāīē ēēēēiōū yōāīēī. Īnāāīē
ōāñōāīō pō ā 20 iēē 120. Ōāēēāīēā
īāōāōpūēōñ iōē ōāñūāīēāīēē Āīē
ōāñōōēēōāōīē īāīōāīī+ā+īūō ēīīōīā
īñōūāñōāē pō iōē īīūē 51-yīāīōēēāāçū. Āē
yōīāī Āīē

20 O ãëãðíëëçòþò 30 ää. 51-ýíáíííóëëääçú ä
íðíää íáuíáíí 50 íëë. ñíääðæäúäë 30 íì ÑíçÑíí, ðí 4,4, 4,5 íì ZnSO-1. 250 íì NaCl ä ää+áíëä 20
íëí íðë 20°Ñ Ðääëöèþ ííòáíääëääþò
íäöääíðëíë äáíííí è ÄÍË

25 5 iãðãîñæäàpò yòàîîèì. Îñàäîê
ðàñòàîð òò à 15 iêê í20.

Īīēō+āīūē òàèèì ġīīġīāīī
 īōāīàòàò èèīāàòēçīāāīīē īēàçīèāū
 pBR124B āīīġīāāēī bō ġ òāāāīāīòīī īēàçīèāū

30 0 0ÅÅ1213-23Å, àùääëäíëä èìòðìäì
 0ëàçàíí Åë ýòíäí 1 íëä íëàçìëäííë ÁÍË è 2
 íëä 0ðäáííäíòä íäðäáàòùäàðò ÁÍË-èëäàçíë
 0àçä 04 ä áó0äðä äë èëäëðíääíë íðë
 íäùäíä 0ääë0ëííííë ñíäñë 30 íëë. Íñëä
 35 íäðä5 ññäëäíë ÁÍË è 0àñòäíðäíë
 ññäëä à 20 íëë 120 íðäíäðäò íäðäáàòùäàðò
 0ä- ñòðëëòýçíë Bgfl 0ëàçàíííí íäðàçíí. ÁÍË àùä
 0àç ññäëäðò ýòäííëí.
 0àñòäíðò ðò è íääííä+ëäàðò äíñííäëíäíëä
 40 èëíäëíðò ííëäë0ë ÁÍË ä èíëùòääùä òíðí ñ
 ñíííùð

[illegible]

60 Ĭ đ è ì â đ 2. ĩĕó+âĭeă şoàĭă
E.coli ÂĚĚăâĭăòeèà VL 903 (pPR-IL2-19j -
ĭđĭăó- ôăĭă èĭôăđeăééĭă-2 +ăĭĭăăă.

Ìeàcièàó pPR-IL2-19. éiàèóóùóó
 ñèíòàç èíòàèèàèèèà-2 +àèíààèà,
 òðàííóíòíàòèàè (íðèìàð 1) ààíà ò à èèàòèè
 øòàìà ðàòèèèàíóííàí E.coli ÁÍÈèàíàòèèà VL

903 èç êîëëâëòëë ÁĪĒĒâāīāòëëë (ðāāëñòðāòëīīūē īīāð ÁĒĪĪ Ā-3546 āī Āñāñīpçīē êîëëâëòëë īðīīūðëāīīūð īëëðīīðāāīëçīā). Ÿòðāëðëāīīñòū ðāāīñòīðīāòëë êëâðīē A.coli ÁĪĒĒâāīāòëëā VL 903 ñīñòāāë àò īēīēī 10 êēīīā īā 1 īēā īāòëāīē īëāçīēāū pPR- IL2-19. Òðāīñòīðīāīòū īòāëðāðò īā ñòāāā, ñīāāðæāūāē āīīëòëëëēī (100 īēā/īē) īñēā êóëūðëāëðīāāīē êëâðīē ā ðā+āīēā ñòòīē īðē 28°Ñ. Ēç īðīāðāīīūð êēīīā āū- āāë ðò īëāçīēāīòð ÁĪĒ ē īīāðāāðæāāðò āā êāāīòë+īñòū īðāīāðāòò pPR-IL2-19 ñ īīīūūð ðāñòðëëðēīīīāī āīāëëçā. īīëó+āīīūē ðòāīī E.coli ÁĪĒĒâāīāòëëā VL 903 (pPR-IL2-19) āāīīēðīāāī āī Āñāñīpçīē êîëëâëòëë īðīīūðëāīīūð īëëðīīðāāīëçīā ē ēīāā ðāāëñòðāòëīīūē īīāð ÁĒĪĪ- Ā-3761.

Ī ð ē ī ā ð 3. īīëó+āīēā ðòāīīā E.coli ÁĪĒĒâāīāòëëā VL 903 (pPR-IL2-19).

Āñā īīāðāòëë īñòūāñòāë ðò ā ñīīòāāðñòāë ñ īðēīāðīī 2. īòëë+ēā ñīñòīëò ā òīī, +òī ā ēā+āñòāā ðāòëīēāīòā īðē ðāīñòīðīāòëë êñīēūçòðò ðòāīī E.coli ÁĪĒĒâāīāòëëā VL 902 ē ā ðāçòëūðāðā ððāīñòīðīāòëë êëâðīē Ÿòīāī ðāòëīēāīòā īëāçīēāīē pPR- IL2-19 īīëó+āðò ðòāīī E.coli ÁĪĒĒâāīāòëëā VL 902 (pPR-IL2-19) - īðīāóóāīò ēīòāðëāëëēīā-2 +āēīāāēā.

Ī ð ē ī ā ð 4. īīëó+āīēā ðòāīīā E.coli C600-htpR(pPR-IL2-19).

Āñā īīāðāòëë īñòūāñòāë ðò ā ñīīòāāðñòāë ñ īðēīāðīī 2. īòëë+ēā ñīñòīëò ā òīī, +òī ā ēā+āñòāā ðāòëīēāīòā êñīēūçòðò ðòāīī E.coli ÑāĪĪ-thpR, īāñòūëë āīīēīëðāëūīī ððīīñīāëūīòð īòðāòëð ā āāīā htpR. Ā ðāçòëūðāðā ððāīñòīðīāòëë êëâðīē Ÿòīāī ðāòëīēāīòā īëāçīēāīē pPR-IL2-19 īīëó+āðò ðòāīī E.coli ÑāĪĪ-htpR (pPR-IL2- 19) (ĀĒĪĪ Ā-3828) - īðīāóóāīò ēīòāðëāëëēīā-2 +āēīāāēā.

Ī ð ē ī ā ð 5. īīðāāāēāīēā īðīāóóāīòā ēīòāðëāëëēīā-2 +āēīāāēā.

Āë īīðāāāēāīē īðīāóóëðāīīñòë ðòāīīā īëāçīēāñīāāðæāūēā êëâðëë āūðāūēāāðò īðē 28°Ñ īā ñēīðāīīē āāāðëçīçāī- īīē ñòāāā Òīòðēīāāðā, ñīāāðæāūāē 50 īēā/īē āīīëòëëēēīā, ā ðā+āīēā 14 +. Āūðīñòð īā êīñ ēāð áëīāññò êñīēūçòðò āë īīëó+āīē īñāāīāī īāðāðëāēā. Āë Ÿòīāī êëâðëë īāðāīñ ò ā ēīēāū Ÿðëāīīēāðā īāūāīī 750 īē ñī 100 īē ñòāāū Òīòðēīāāðā, ñī 100 īēā/īē āīīëòëëēēīā ē āūðāūēāāðò īðē 28°Ñ īā ēā+āëēā īðē 240 īā/īēī ā ðā+āīēā á +. īīðë+āñēā īēīòīñòū īñāĀ.īē êóëūðòð ñīñòāāë àò 1,5-2,5 āā.

Òāðīāīòāòëð īðīāīā ò ā ðāðīāīòāðā. ñīīāūāīīī ñēñòāīāīē ðāāóëëðīāāīē ðī, ðāīīāðāòòðū, ñēīðīñòë īāðāīāðëāāīē ē āŸðāòëë. Āë ðāðīāīòāòëë êñīēūçòðò ñòāāó Òīòðēīāāðā ñī 100 īēā/īē āīīëòëëēēīā ē 10 ā/ē āëðēīçū. īñāāīòð êóëūðòðò āīīñ ò ā ēīēë+āñòāā 5-10%. Ēóëūðëāëðīāāīēā īñòūāñòāë ðò īðē ðī 6,á-6,8, īāāāðæāēāā Ÿòìð ððīāāīū īāā+āē

āīīēā+īīē āīāū. īāðāòð +āñòū ðāðīāīòāòëë āī 0. Ā550 3,5 īðīāīā ò īðē 28°Ñ, ā çàðāī īñòūāñòāë ðò ðāðīēīāóòëð, īāūðā ðāīīāðāòòðò āī 42-45°Ñ ā ðā+āīēā 5 īēī, īñēā +āāī īðīāīēæāðò ðāðīāīòāòëð āūā 2 +.

īñēā īēīī+āīē īðīòāññā āë īīðāāēāīē āëòëāīñòë ēīòāðëāëëēīā-2 +āēīēāēā

ĒÇ 1 ĪĒ ĒóĒŪŌóóŸĒŪĪĒ ĄĒĒĒĪŃŃĒ ĒĒŃ. ŌĒĒ

īñāæāāðò ðāīòðëðóāëðīāāīēāī ē īñāāīē ðāñòñīāīēðòðò ā 1 īē 8 Ī ðāñòāīðā āó.Ÿīē- āēīòēīðëāā īðē 20°Ñ ā ðā+āīēā 40 īēī êëë 1 %-īī ðāñòāīðā āīāāóëëñóëūðāðā īāððë ā 0,02 Ī ðñòāòīī āóóāðā ðī 7,2, ñīāāðæāūāī 1% 2-īāðëāīòīŸðāīēā. Ā īñēāāīāī ñēó+āā īāðāçòū īðīāðāāðò 2-4 īēī īðē 100°Ñ. īñāāīē īòāðāñūāāðò ðāīòðëðóāëðīāāīēāī ē īīðāāāë ðò āëòëāīñòū ñīāāðæāūāāīñ ā īāāīñāāī+īīē āëāēīñòë ððāëòëë ēīòāðëāëëēīā-2.

Āë īīðāāēāīē āīēë ñēīðāçëðīāāīīāī ēīòāðëāëëēīā-2 +āēīāāēā īò ñóīāðīīāī êëâðī+īīāī āāëēā êëâðëë èç 1 īē êóëūðòðāëū- īīē āëāēīñòë īñāæāāðò ðāīòðëðóāëðīāāīēāī ē īāðāāāðūāāðò óëāçāīīūī īāðāçīī. īðāīāðāò āīāëëçëðòðò Ÿëāëòðīòīðāçīī ā 15%-īī īīēāëðëëēāīēāīī āāēā ā īðēñòðñòāëë 0,1 % āīāāóëëñóëūðāðā īāððë .

Āāëë, ðāçāāēāīūā ā āāēā, īðēðāðëāāðò ā ðāñòāīðā Ēóīāññē R-250. Ēīēë+āñòāāīīā ñīāāðæāīēā āāēðā ā çīāð īīðāāāë ðò īñēā ñēāīēðīāāīē īðīēðāñāīīāī āāē īā āāòīāòë+āñēī ēāçāðīī āāīñëòīāððā. Ēāāīòëðëēāòëð çīīū, ñīīòāāðñòāòðūāē ñēīðāçëðīāāīīñó ā ēēāòëāð çðāēīīò ēīòāð- ēāëëēīò-2 +āēīāāēā, īðīāīā ò īā īñīāā ñòāāīāīē ñ Ÿëāëòðīòīðāðë+āñēīē īīāāëæīñòūð īāðëāðīūð āāëēīā, ā ðāëæā ñ īīīūūð āēīòðëīāā ðāçāāēāīīūð āāëēīā īā īëððī- ðāëëðēīçīūā ðëëūðòð ñ īñēāāòðūēī īðī- āēāīēāī çīī ēīòāðëāëëēīā

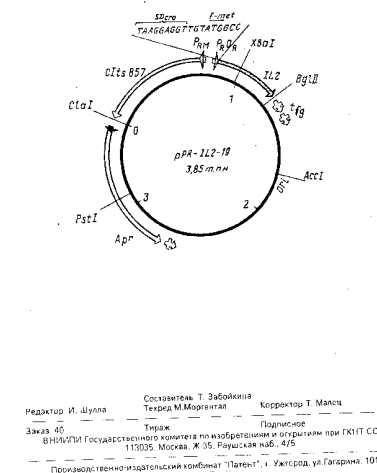
īāðāāīòēīē ā ðāñòāīðāð, ñīāāðæāūēð īūðēīūā īīīēēī- īāëūīūā āīòëðāēā īðīðëā ēīòāðëāëëēīā-2 t-v āīðēīūðēīūā ēðīēë+ūē āīòëðāēā, ēīīúðāë- ðīāāīūā ñ īāðīēñēāāçīē èç ððāīā. īñēā ñīīòāāðñòāòðūāē īðīòāāóðū īēðāðëāāīē çīīā ēīòāðëāëëēīā īðī āë āòñ ā āëāā ēīðë+īāāīē īīēīñū īā īāīēðāðāīīī ðīīā īëððīòāëëðēīçīīāī ðëëūððā.

Āēīēīāë+āñēā āëòëāīñòū ēīòāðëāëëë- īā-2 +āēīāāēā ā ðāçëë+īūð īëāçīēāīūð ðòāīīāð E.coli - īðīāóóāīòāð ēīòāðëāëëēīā, ā ðāëæā āīē ñēīðāçëðīāāīīāī ā êëâðëāð āāëēīāīāī īðīāóóëðā āāīā IL2 īò ñóīāðīīāī āāëēā īðāñòāāēāīū ā ðāāëëòā. Ōāëëī īāðāçīī, èçīāðāðāīēā īçāīē āò īīāñēòū īðīāóóëð ēīòāðëāëëēīā-2 āī 8- 10 ò 107 īāæāóīāðīāīūð āā. īā 1 ē āāëðāðëāëūīē êóëūðòðū, +òī ñīñòāāë āò 12% īò ñóīāðīīāī êëâðī+īīāī āāëēā.

Ōīðīóēā èçīāðāðāīē 1. Ðāēīīāēīāīòīā īëāçīēāīā ÁĪĒ pPR-IL2-19, ēīāëðòðūā ñēīðāç ēīòāðëāëëēīā-2 +āēīāāēā, ðāçīāðīī 3.85 ò.ī.ī., ñīāāð- æāūā BamHI-Bgfīī-ððāāīāīò āāëòīðīē īëāçīēāū pPR 124B ðāçīāðīī 3,4

TAAGGAGGTTG7A TGGCC
 ClaI
 PstI
 Aa
 SVcro
 f-met
 AccI

Штамм реципиент плазмиды	Биологическая активность интерлейкина-2, индуцирующая образование из 1 л бактериальной культуры (О.В. 7-10 ⁷)	Доля интерлейкина от общего содержания в клетках БЖ
E.coli C600		8
E.coli B1013/interleukina		9
E.coli B1013/interleukina	(6-8) · 10 ⁷	12
E.coli B1013/interleukina	(6-10) · 10 ⁷	



9 1703693 10
 держание белков в зонах определяют по-
 сле сканирования прокрашенного геля на
 автоматическом лазерном денситометре.
 Идентификацию зон, соответствующей
 синтезированной и в клетках зрелого интер-
 лейкина-2 человека, проводят на основе срав-
 нения с электрофоретической подвижностью
 маркерных белков, а также с помощью
 биотинизированных разделенных белков на нитро-
 целлюлозные фильтры с последующим про-
 явлением зон интерлейкина обработкой в
 растворах, содержащих мышиные монокло-
 нальные антитела против интерлейкина-2 и
 антимышинные кроличьи антитела, конъюги-
 рованные с пероксидазой из хрена. После
 соответствующей процедуры окрашивания
 зона интерлейкина проявляется в виде ко-
 лониметрической полосы на неокрашенном фоне
 нитроцеллюлозного фильтра.
 Биологическая активность интерлейки-
 на-2 человека в различных плазмидных
 штаммах E.coli - продуктах интерлейкина,
 а также доля синтезированного в клетках бел-
 кового продукта гена IL2 от суммарного бел-
 ка представлены в таблице.
 Таким образом, изобретение позволяет
 повысить продукцию интерлейкина-2 до 8-
 10 · 10⁷ международных ед. на 1 л бактери-
 альной культуры, что составляет 12% от
 суммарного клеточного белка.

Формула изобретения
 1. Рекombинантная плазмидная ДНК
 рРР-IL2-19, кодирующая синтез интерле-
 йкина-2 человека, размером 3.85 т.п.н., содер-
 жащая BamHI-BglII фрагмент векторной
 плазмиды рРР 124В размером 3.4 т.п.н.,
 Cfr 13 BglII-фрагмент размером 0.45 т.п.н.
 плазмиды рРА1213-23, модифицирован-
 ный введением BglII-линкера, ColEI ре-
 пликон, ген температурочувствительного
 репрессора с Its 857 фага λ, ген устойчи-
 вости к ампициллину, тандем р-независимых
 терминаторов транскрипции фага fd, регу-
 ляционную область рив, SD-последователь-
 ность, ATG-иницирующий кодон гена его
 фага λ, кодирующую последовательность
 зрелого интерлейкина-2 человека гибри-

15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 ный участок связывания рибосом, имеющий
 следующую нуклеотидную последователь-
 ность: 5'-TAACCACCTTCTATCCCC-3', где
 TAAGGAGGT и ATG - SD-последовательность
 и индуцирующий кодон гена его соответст-
 венно, GCC-первый (Ala) кодон интерлейки-
 на-2, а за терминирующим кодоном гена IL2
 расположен тандем р-независимых терми-
 наторов транскрипции fd, уникальные рас-
 стриктазы: ClaI, координата которого является началом от-
 счета -0. XbaI - 990 т.п.н., BglII - 1250 т.п.н.,
 PstI - 3070 т.п.н.
 2. Способ конструирования рекомби-
 нантной плазмидной ДНК рРР-IL2-19, за-
 ключающийся в том, что введение
 уникального участка расщепления BglII в 3'
 концевую не транслируемую часть гена IL2
 в составе плазмиды рРА1213-23 осуществ-
 ляют с помощью олигонуклеотидного линке-
 ра, полученную плазмиду расщепляют
 рестриктазой Cfr 13 и доэстраивают образ-
 ующиеся одонитетные концы молекул ДНК
 фрагментом Кленсва ДНК-полимеразы 1
 Escherichia coli, образованный фрагмент
 плазмиды рРА1213-23B с геном IL2 интегри-
 руют с помощью ДНК-лигазы фага T4 в со-
 ставе векторной молекулы рРР124В,
 предварительно расщепленной BamHI и об-
 работанной S1-эндонуклеазой. Затем пре-
 парат ДНК обрабатывают рестриктазой
 BglII и соединяют молекулу ДНК в кольце-
 вую форму ДНК-лигазой, полученной
 смесью трансформируют клетки E.coli C600,
 трансформанты высевают на среду с анти-
 циплином и культивируют при 28°C с после-
 дующей селекцией на пониженную
 скорость роста при температуре 42°C, из
 отобранных клонов выделяют плазмиду
 рРР-IL2-19, в которой точность воссоеди-
 нения фрагментов проверяют восстановлени-
 ем на стыке исходных участков ДНК, ранее
 отсутствовавшей последовательности узна-
 вания рестриктазы BspRI.
 3. Штамм бактерии Escherichia coli
 BКРМ В-3866 - продукт интерлейкина-2
 человека.

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45

30

9 1703693 10
 держание белков в зонах определяют по-
 сле сканирования прокрашенного геля на
 автоматическом лазерном денситометре.
 Идентификацию зон, соответствующей
 синтезированной и в клетках зрелого интер-
 лейкина-2 человека, проводят на основе срав-
 нения с электрофоретической подвижностью
 маркерных белков, а также с помощью
 биотинизированных разделенных белков на нитро-
 целлюлозные фильтры с последующим про-
 явлением зон интерлейкина обработкой в
 растворах, содержащих мышиные монокло-
 нальные антитела против интерлейкина-2 и
 антимышинные кроличьи антитела, конъюги-
 рованные с пероксидазой из хрена. После
 соответствующей процедуры окрашивания
 зона интерлейкина проявляется в виде ко-
 лониметрической полосы на неокрашенном фоне
 нитроцеллюлозного фильтра.
 Биологическая активность интерлеки-
 на-2 человека в различных плазмидных
 штаммах E.coli - продуктах интерлейкина,
 а также доля синтезированного в клетках бел-
 кового продукта гена IL2 от суммарного бел-
 ка представлены в таблице.
 Таким образом, изобретение позволяет
 повысить продукцию интерлейкина-2 до 8-
 10 · 10⁷ международных ед. на 1 л бактери-
 альной культуры, что составляет 12% от
 суммарного клеточного белка.

Формула изобретения
 1. Рекombинантная плазмидная ДНК
 рРР-IL2-19, кодирующая синтез интерле-
 йкина-2 человека, размером 3.85 т.п.н., содер-
 жащая BamHI-BglII фрагмент векторной
 плазмиды рРР 124В размером 3.4 т.п.н.,
 Cfr 13 BglII-фрагмент размером 0.45 т.п.н.
 плазмиды рРА1213-23, модифицирован-
 ный введением BglII-линкера, ColEI ре-
 пликон, ген температурочувствительного
 репрессора с Its 857 фага λ, ген устойчи-
 вости к ампициллину, тандем р-независимых
 терминаторов транскрипции фага fd, регу-
 ляционную область рив, SD-последователь-
 ность, ATG-иницирующий кодон гена его
 фага λ, кодирующую последовательность
 зрелого интерлейкина-2 человека гибри-

15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 ный участок связывания рибосом, имеющий
 следующую нуклеотидную последователь-
 ность: 5'-TAACCACCTTCTATCCCC-3', где
 TAAGGAGGT и ATG - SD-последовательность
 и индуцирующий кодон гена его соответст-
 венно, GCC-первый (Ala) кодон интерлейки-
 на-2, а за терминирующим кодоном гена IL2
 расположен тандем р-независимых терми-
 наторов транскрипции fd, уникальные рас-
 стриктазы: ClaI, координата которого является началом от-
 счета -0. XbaI - 990 т.п.н., BglII - 1250 т.п.н.,
 PstI - 3070 т.п.н.
 2. Способ конструирования рекомби-
 нантной плазмидной ДНК рРР-IL2-19, за-
 ключающийся в том, что введение
 уникального участка расщепления BglII в 3'
 концевую не транслируемую часть гена IL2
 в составе плазмиды рРА1213-23 осуществ-
 ляют с помощью олигонуклеотидного линке-
 ра, полученную плазмиду расщепляют
 рестриктазой Cfr 13 и доэстраивают образ-
 ующиеся одонитетные концы молекул ДНК
 фрагментом Кленсва ДНК-полимеразы 1
 Escherichia coli, образованный фрагмент
 плазмиды рРА1213-23B с геном IL2 интегри-
 руют с помощью ДНК-лигазы фага T4 в со-
 ставе векторной молекулы рРР124В,
 предварительно расщепленной BamHI и об-
 работанной S1-эндонуклеазой. Затем пре-
 парат ДНК обрабатывают рестриктазой
 BglII и соединяют молекулу ДНК в кольце-
 вую форму ДНК-лигазой, полученной
 смесью трансформируют клетки E.coli C600,
 трансформанты высевают на среду с анти-
 циплином и культивируют при 28°C с после-
 дующей селекцией на пониженную
 скорость роста при температуре 42°C, из
 отобранных клонов выделяют плазмиду
 рРР-IL2-19, в которой точность воссоеди-
 нения фрагментов проверяют восстановлени-
 ем на стыке исходных участков ДНК, ранее
 отсутствовавшей последовательности узна-
 вания рестриктазы BspRI.
 3. Штамм бактерии Escherichia coli
 BКРМ В-3866 - продукт интерлейкина-2
 человека.

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45

SU 1703693 A1

SU 1703693 A1