

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201600026 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.08.31

(51) Int. Cl. C07K 14/315 (2006.01)
C12N 9/26 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.06.13

(54) БАКТЕРИАЛЬНАЯ ГИАЛУРОНИДАЗА И СПОСОБ ЕЕ ПРОИЗВОДСТВА

(31) MI2013A000992

(32) 2013.06.17

(33) IT

(86) PCT/IB2014/062193

(87) WO 2014/203133 2014.12.24

(71) Заявитель:
ФИДИА ФАРМАЧЕУТИЧИ С.п.А.
(IT)

(72) Изобретатель:
Мессина Лучиана, Музумечи Лука,
Ваккаро Сюзанна (IT)

(74) Представитель:
Тихонина О.В. (RU)

(57) Изобретение относится к гиалуронидазе, получаемой из *S. koganeiensis*, к ее применению и к способу ее производства.

A1

201600026

201600026

A1

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ГИАЛУРОНИДАЗА И СПОСОБ ЕЕ ПРОИЗВОДСТВА

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к гиалуронидазе, получаемой из бактерий *S. koganeiensis*, к ее применению и к способу ее производства.

Уровень техники

В настоящее время используемая в клинической практике гиалуронидаза имеет животное происхождение. Даже если продукт должным образом очищен, он содержит некоторое количество примесей, способных вызывать иммуногенные или аллергические реакции.

Гиалуроновая кислота является важным компонентом внеклеточного матрикса и количественно важной составляющей интерстициального барьера. Гиалуронидаза представляет собой гидролитический фермент, расщепляющий гиалуроновую кислоту на D-глюкуроновую кислоту и N-ацетилглюкозамин, увеличивая проницаемость интерстициального матрикса. Различным образом она также способна расщеплять другие кислотные мукополисахариды соединительной ткани. Высокие концентрации гиалуронидазы обнаруживаются, к примеру, в ротовой полости пиявок, в яде пчел, змей и скорпионов, а также в супернатанте культуры патогенных бактерий, таких как пневмококк, гемолитический стрептококк и золотистый стафилококк. В человеческом организме гиалуронидаза содержится в роговице, цилиарном теле, селезенке, коже и тестикулах. Высокое содержание гиалуронидазы также обнаруживается в сперматозоидах, которым фермент позволяет преодолевать барьер гиалуроновой кислоты, защищающий яйцеклетку.

Гиалуронидаза используется в медицине при лечении отеков, местного воспаления, геморроя и обморожений.

Кроме того, она используется в фармацевтической области для облегчения транспортировки и повышения дисперсии и диффузии определенных активных ингредиентов с высокой молекулярной массой (антитела, наночастицы носителя лекарственных средств, ДНК для генной терапии, рекомбинантные протеины), которые вводятся местно путем подкожной инъекции, что повышает их биодоступность до степени, сравнимой с внутривенным введением [1]. Предыдущие исследования показали, что наночастицы диаметром до 200 нм также способны значительно повышать способность к проникновению через интерстициальное пространство, если их вводят одновременно или после фермента гиалуронидазы [1]. Исследования, известные на настоящий момент, показывают, как наночастицы могут проявлять свои функции *in vitro*,

таким образом демонстрируя высокий потенциал в терапевтической и диагностической области. Однако же, *in vivo* следует учитывать способность наночастиц к распространению за пределы барьеров в зависимости от способа введения, используемого в клинической практике (подкожное или гастроинтестинальное введение или токсичность при внутривенном введении), их объем распространения и токсичность. Использование наночастиц в сочетании с гиалуронидазой может, таким образом, представлять собой прекрасную инновационную стартовую площадку для будущего терапии и диагностики, при этом в перспективе наночастицы-носители препарата смогут использоваться в обычной клинической практике для местного подкожного введения, например, в онкологии, офтальмологии и при остеоартрите.

Известно, что при некоторых видах рака, включая рак поджелудочной железы, груди, прямой кишки и предстательной железы, наблюдается накопление высокой концентрации гиалуроновой кислоты (ГК). Такое необычное накопление ГК формирует защитную сеть, которая окружает некоторые типы рака и поддерживает их. Такое патологическое накопление ГК и других компонентов матрикса также повышает давление интерстициальной жидкости опухоли, сужает сосуды опухоли, а также создает уникальную микросреду, которая способствует росту раковых клеток по сравнению с нормальными клетками. Эти механизмы создают препятствия для введения лекарственных средств, снижая потенциальную эффективность противораковых средств. Разрушая компонент ГК, который определяет архитектуру опухоли, гиалуронидаза разрушает микросреду опухоли, разблокируя ранее суженные сосуды и увеличивая приток крови к опухоли. Благодаря этому противораковые медицинские средства более эффективно доставляются к опухоли-мишени, что повышает их терапевтическую эффективность. Гиалуронидаза также используется в косметике для лечения гранулематозных реакций или коррекции неправильного, т.е. нежелательного, распределения гиалуроновой кислоты, вызванного введением филлеров, а также эффективно применяется для противодействия фиброзу при целлюлите.

Сегментируя фиброзный компонент целлюлита, гиалуронидаза размягчает его, уменьшая эффект апельсиновой корки, и тем самым придает более естественный и приятный вид участку кожи, к которому применяется лечение. На сегодняшний день гиалуронидаза является единственным реально помогающим средством, применяемым в терапевтических или иных целях, которое обеспечивает удовлетворительные результаты в борьбе с целлюлитом.

Предыдущие исследования показали эффективность гиалуронидазы в лечении сердечнососудистых заболеваний, таких как атеросклероз [2], однако потенциал влияния гиалуронидазы на давление до настоящего момента известен не был [3].

Клинические исследования с помощью электрокардиографических тестов показали, что такие способы использования основаны на научных данных и это привело к исследованию влияния сыворотки крови человека на активность видазы (Wydase), гиалуронидазы тестикул быка, которая широко используется во многих клинических исследованиях.

На основе данных клинических исследований были сделаны следующие заключения:

- только использование высокоочищенной гиалуронидазы имеет большое клиническое значение для снижения возможности инфаркта миокарда [4];
- многие группы продемонстрировали, что человеческая кровь содержит термолабильный ингибитор бычьей гиалуронидазы [5, 6].

Несмотря на то, что клинические исследования показали эффективность гиалуронидазы, эти заключения до сих пор не привели к разработке гиалуронидазы и/или новых терапевтических средств на основе гиалуронидазы, которые при внутривенном введении обеспечивали бы лечение сердечнососудистых заболеваний и нарушений мозгового кровообращения, и ее использование ограничивается лечением лишь некоторых сердечнососудистых заболеваний из-за высокого содержания примесей в препаратах, имеющих на рынке. В области ветеринарии гиалуронидаза используется в средствах, включающих в себя антибиотики, для лечения заболеваний животных, например, коровьего мастита. К настоящему времени производство бактериальной или животной гиалуронидазы в промышленных масштабах затруднено из-за низкой производительности и по причине того, что этот фермент становится нестабильным в водном растворе и теряет активность после очистки.

Кроме того, многие гиалуронидазы, производимые в промышленных масштабах, имеют животное происхождение (из тестикул крупного и мелкого рогатого скота) и несут высокий риск передачи животной губчатой энцефалопатии (так называемого «коровьего бешенства»). Другие промышленные предприятия производят гиалуронидазу (человеческую PH20) в растворимой рекомбинантной форме из клеток млекопитающих, улучшая чистоту и снижая риск вирусных инфекций [7]. Целью настоящего изобретения является обеспечение бактериальной рекомбинантной гиалуронидазы высокой чистоты для фармацевтических и/или косметических целей.

Целью настоящего изобретения является обеспечение энзима, который в течение долгого времени сохранял бы стабильность в водном растворе даже в присутствии протеолитических энзимов, который был бы полностью лишен риска передачи животной губчатой энцефалопатии и демонстрировал бы высокую активность гиалуронидазы в кровотоке без риска ингибирования, вирусного или бактериального заражения, что также позволило бы использовать его внутривенно. Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение способа получения гиалуронидазы, который бы являлся эффективным, обеспечивал бы высокую производительность и был бы применим в промышленных масштабах.

Раскрытие изобретения

Согласно настоящему изобретению, эти цели, а также другие, подробно описанные далее, достигаются в способе производства гиалуронидазы, полученной из бактерий *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 и содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, где способ включает в себя следующие шаги:

а) засевают среду бактериальной культуры в биореакторе инокулятом рекомбинантных клеток, содержащих, по меньшей мере, один вектор с последовательностью SEQ ID NO: 41;

б) содержимое биореактора с шага а) подвергают ферментации при pH от 6,7 до 7,1 в присутствии питательного раствора;

с) добавляют к смеси с шага б) индуктор лактозных генов;

д) смесь с шага с) подвергают индукции сроком от 8 до 24 часов;

е) подвергают центрифугированию бактериальные клетки, полученные на шаге д);

ф) выполняют повторное суспензирование сгустков, полученных на шаге е), и подвергают полученную суспензию осмотическому удару;

г) экстрагируют периплазматические протеины путем центрифугирования суспензии с шага ф);

h) очищают фракцию протеина с энзимной активностью гиалуронидазы, полученную на шаге г), с помощью следующей последовательности действий:

(i) выполняют сильную ионообменную хроматографию и изоляцию фракции с энзимной активностью гиалуронидазы;

(ii) выполняют слабую катионообменную хроматографию и изоляцию фракции с энзимной активностью гиалуронидазы; и

(iii) выполняют ароматическую гидрофобную хроматографию и изоляцию фракции с энзимной активностью гиалуронидазы.

Цели изобретения также достигаются с помощью гиалуронидазы, полученной из бактерий *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 и содержащей последовательность SEQ ID No: 21, производимой указанным способом.

Цели изобретения также достигаются с помощью гиалуронидазы, полученной из бактерий *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 в очищенной форме и содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

Кроме того, цели изобретения достигаются с помощью полинуклеотида, содержащего последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 17, кодирующего бактериальную гиалуронидазу, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 21.

Цели изобретения также достигаются с помощью генетически модифицированного рекомбинантного вектора, содержащего указанный полинуклеотид.

Цели изобретения достигаются с помощью клетки-хозяина, содержащей указанный генетически модифицированный рекомбинантный вектор.

Цели изобретения также достигаются с помощью композиции, пригодной для фармацевтического или косметического использования и содержащей гиалуронидазу, полученную из *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 в очищенной форме и содержащую N-терминальную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, при этом гиалуронидаза предназначена для использования при лечении и/или при предотвращении нарушения или заболевания, опционально в сочетании с, по меньшей мере, еще одним активным ингредиентом, а также для нетерапевтического использования с косметическими целями и/или для улучшения эстетического вида.

В рамках настоящего изобретения «композиция, пригодная для фармацевтического или косметического использования» подразумевает препарат в твердой, полужидкой или жидкой форме, например, в виде суспензии или раствора, содержащий, по меньшей мере, один активный ингредиент и, по меньшей мере, одно вспомогательное вещество, известное специалисту в данной области.

В рамках настоящего изобретения определение «последовательность полипептидов» или «последовательность полинуклеотидов» также включает в себя последовательности с высокой степенью сходства с указанной последовательностью. Примерами, не имеющими ограничительного характера, входящими в объем изобретения, являются полипептиды, идентичные, по меньшей мере, на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более последовательности SEQ ID NO: 21, полинуклеотиды, идентичные, по меньшей мере, на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более последовательности SEQ ID NO: 17, а также полинуклеотиды,

идентичные, по меньшей мере, на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более последовательности SEQ ID NO: 41.

В объеме настоящего изобретения «гиалуронидаза, полученная из *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394» подразумевает гиалуронидазу с высокой степенью сходства с гиалуронидазой, изначально изолированной из организма *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394, которую также возможно производить с помощью биотехнологических способов из других микроорганизмов, помимо *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 (например, *E. coli* или *B. subtilis*).

Если не указано иное, в объеме настоящего изобретения проценты относятся к массе компонента в общей массе композиции.

Краткое описание чертежей

Следующие фигуры приведены для лучшего понимания изобретения и не ограничивают его объем.

Фиг. 1: кривая производства гиалуронидазы из супернатанта культуры *Streptomyces koganeiensis* в отношении к временному интервалу (Т). Анализ профиля полной РНК и ДНК, полученных из клеток *S. koganeiensis* на этапе производства, выполнен в 1% агарозном геле.

Фиг. 2: последовательность ампликона длиной приблизительно 550 п.н., полученная с помощью внутренних праймеров MesFor2 и MesRev2 и компьютерного моделирования последовательности нуклеотидов, полученной из протеиновой последовательности.

Фиг. 3: диаграмма обратной полимеразной цепной реакции (ОПЦР) – способа, используемого для определения последовательностей, фланкирующих на 5' и 3' внутреннем участке гена *S. koganeiensis*, кодирующего гиалуронидазу.

Фиг. 4: идентификация полной нуклеотидной последовательности гена, кодирующего последовательность гиалуронидазы в *S. koganeiensis*.

Фиг. 5: последовательность полного гена, кодирующего последовательность гиалуронидазы в *S. koganeiensis*, клонированную в векторе ПЦР BluntII-MOUSE (Invitrogen).

Фиг. 6: (а) – анализ BLAST на сходство аминокислотной последовательности, определяемой гиалуронидазой из *S. koganeiensis* ATCC 31394, и аминокислотных последовательностей, имеющихся в электронной базе данных; последовательности, выделенные прямоугольником, описывают функциональную область семейства бактериальной гиалуронидазы; (b) – анализ BLAST на сходство нуклеотидной

последовательности, определяемой гиалуронидазой из *S. koganeiensis* ATCC 31394, и нуклеотидных последовательностей, имеющих в электронной базе данных.

Фиг. 7: (а) – функциональная характеристика протеиновой последовательности гиалуронидазы из *S. koganeiensis*; (b) – функциональная характеристика протеиновой последовательности гиалуронидазы из *Actinoplanes* sp. SE 50/110, *Streptomyces pristinaespiralis* ATCC 25486, *Streptomyces tsukubaensis* NRRL18488.

Фиг. 8: фрагмент ДНК, кодирующий гиалуронидазу и ее экспрессионные плазмиды, используемые для клонирования, которые были отделены с помощью установленных рестрикционных энзимов. Полученные фрагменты были проанализированы в 1% агарозном геле и окрашены бромидом этидия. После окрашивания изображение геля было получено с помощью лабораторного устройства захвата изображений ImageQuant 300 TL (GE Healthcare), а анализ (количественный и качественный) производился с помощью программного обеспечения для анализа изображений ImageQuant TL (GE Healthcare).

Фиг. 9: скрининг с помощью ПЦР и переваривание рестрикционными энзимами фрагмента ДНК, кодирующего гиалуронидазу, клонированную в экспрессионных плаزمиде. Полученные фрагменты были проанализированы в 1% агарозном геле с помощью программного обеспечения для анализа изображений ImageQuant TL (GE Healthcare) после их получения и окрашивания бромидом этидия.

Фиг. 10: показана карта плазмиды pHTsk_HYAL: промотор Pgrac, ген lacI (репрессор lacI), ген Amp^R резистентности ампициллину, ген Cm^R резистентности хлорамфениколу, ColE1 – точка начала репликации *E. coli*, SamyQ – сигнальная последовательность amyQ и гена гиалуронидазы, кодирующего гиалуронидазу, полученную из *S. koganeiensis*, BamHI и XbaI – уникальные сайты рестрикции, используемые для клонирования гиалуронидазы.

Фиг. 11: показана карта плазмиды pHyal_sk: ori – точка начала репликации *E. coli*, ген Ap резистентности ампициллину, промотор T7, ген lacI (репрессор lacI), сигнальная последовательность pelB, ген гиалуронидазы, кодирующий гиалуронидазу, полученную из *S. koganeiensis*, NcoI и EcoRI – уникальные сайты рестрикции, используемые для клонирования гиалуронидазы.

Фиг. 12: показана карта плазмиды pHyal_sk_SL: ori – точка начала репликации *E. coli*, ген Ap резистентности ампициллину, промотор T7, ген lacI (репрессор lacI), ген гиалуронидазы, кодирующий гиалуронидазу, полученную из *S. koganeiensis*, NdeI и EcoRI – уникальные сайты рестрикции, используемые для клонирования гиалуронидазы.

Фиг. 13: (a) – нуклеотидная последовательность открытой рамки считывания (ORF), кодирующая протеин гиалуронидазы из *S. koganeiensis*, клонированной в вектор pHT43 (MOBITEC); (b) – нуклеотидная последовательность ORF, кодирующая протеин гиалуронидазы *S. koganeiensis*, клонированной в вектор pET22b(+) (Novagen); (c) – нуклеотидная последовательность ORF, кодирующая протеин гиалуронидазы *S. koganeiensis*, клонированной в вектор pET21b(+) (Novagen).

Фиг. 14: оценка с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза при 12% экспрессирования рекомбинантной гиалуронидазы (*E. coli*, BL21 (DE3), содержащей плазмиду pHyal_sk) после индукции 1 ммоль изопропилтиогалактозида, по сравнению с белковым профилем предварительно индуцированного образца.

Фиг. 15: оценка с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза при 12% экспрессирования рекомбинантной гиалуронидазы (*E. coli*, BL21 (DE3), содержащей плазмиду pHyal_sk_SL) после индукции 1 ммоль изопропилтиогалактозида, по сравнению с белковым профилем предварительно индуцированного образца.

Фиг. 16: полученный с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза при 12% белковый профиль фракций, полученных после каждого этапа очистки в соответствии с изобретением.

Фиг. 17: (a) – сравнение спектров при круговом дихроизме аутологической и рекомбинантной гиалуронидазы; (b) – соответствующие УФ-спектры для очищенного рекомбинанта. УФ-спектры были проанализированы до (верхняя линия) и после (нижняя линия) центрифугирования для удаления присутствующих агрегатов.

Фиг. 18: определение с помощью масс-спектрометрии молекулярной массы рекомбинантной гиалуронидазы, полученной в соответствии с изобретением.

Фиг. 19: определение изоэлектрической точки рекомбинантной гиалуронидазы, полученной в соответствии с изобретением.

Фиг. 20: электрофореграмма, полученная с помощью капиллярного электрофореза образца очищенной рекомбинантной гиалуронидазы в соответствии с изобретением. Рассчитанная концентрация составила приблизительно 1 мг/мл со 100% чистотой.

Фиг. 21: анализ чистоты очищенной рекомбинантной гиалуронидазы в соответствии с изобретением с помощью (a) ВЭЖХ на колонке гель-хроматографии Bio-Sil SEC, (b) обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке с гидрофобной фазой (обратной колонке).

Фиг. 22: ДСН-ПААГ-электрофорез при 12%: рекомбинантная гиалуронидаза, произведенная и очищенная в соответствии с изобретением, была загружена в количестве 1000, 500, 250, 100 и 50 единиц на дорожку и сравнивалась с 50, 25 и 10 единицами на

дорожку гиалуронидазы, полученной из тестикул быка. Вестерн-блоттинг пробы из 25 единиц бычьей гиалуронидазы, проведенный с использованием поликлонального антитела анти-гиалуронидазы (Abnova), показал единственную иммуореактивную полосу гиалуронидазы.

Фиг. 23: электрофорез в 1% агарозном геле показывает деполимеризацию гиалуроновой кислоты, очищенной 1 единицей рекомбинантной гиалуронидазы, произведенной в соответствии с изобретением, в указанный период от 5 минут до 24 часов.

Фиг. 24: стабильность рекомбинантной гиалуронидазы, произведенной в соответствии с изобретением, а также гиалуронидазы из тестикул быка, по отношению к протеолитическим энзимам.

Фиг. 25: оценка *in vitro* ингибирующего действия, производимого человеческой и животной сывороткой на энзимную активность гиалуронидазы (рекомбинантной, произведенной в соответствии с настоящим изобретением, и бычьей гиалуронидазы).

Осуществление изобретения

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу производства гиалуронидазы, изолированной из *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 и содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, где способ содержит следующие шаги:

а) засевают среду бактериальной культуры в биореакторе инокулятом рекомбинантных клеток, содержащих, по меньшей мере, один вектор с последовательностью SEQ ID NO: 41;

б) содержимое биореактора с шага а) подвергают ферментации при pH от 6,7 до 7,1 в присутствии питательного раствора;

с) добавляют к смеси с шага б) индуктор лактозных генов;

д) смесь с шага с) подвергают индукции сроком от 8 до 24 часов;

е) подвергают центрифугированию бактериальные клетки, полученные на шаге д);

ф) выполняют повторное суспензирование сгустков, полученных на шаге е), и подвергают полученную суспензию осмотическому удару;

г) экстрагируют периплазматические протеины путем центрифугирования суспензии с шага ф);

h) очищают фракцию протеина с энзимной активностью гиалуронидазы, полученную на шаге г), с помощью следующей последовательности действий:

(i) выполняют сильную ионообменную хроматографию и изоляцию фракции с энзимной активностью гиалуронидазы;

(ii) выполняют слабую катионообменную хроматографию и изоляцию фракции с энзимной активностью гиалуронидазы; и

(iii) выполняют ароматическую гидрофобную хроматографию и изоляцию фракции с энзимной активностью гиалуронидазы.

Для полного исключения риска передачи животной губчатой энцефалопатии, а также вследствие ограниченности источников гиалуронидазы микробного происхождения, в предыдущих исследованиях был выделен и изолирован бактериальный штамм, обладающий способностью производить высокоактивный энзим гиалуронидазы [8].

Тот же штамм бактерий был успешно использован в [9] для производства гиалуронидазы, обладающей всеми характерными качествами энзимов, прежде всего, степенью чистоты (>98%), что намного выше, чем описано в [8]. Сравнительные исследования показали, что вещество, получаемое из [8], фактически представляет собой смесь 68 различных фракций, только одна из которых обладает активностью гиалуронидазы. Более высокая чистота [9] сопровождается большей энзимной активностью при оценке в той же концентрации и при тех же значениях Т и рН.

Кроме того, дополнительные сравнительные исследования показали, что гиалуронидаза, описанная в [9], в отличие от решения, описанного в [8], сохраняет стабильность до 24 месяцев даже при перепадах температур (5°C и -20°C) и на нее практически не влияет активность протеолитических энзимов, с которыми она контактирует после введения.

Для обеспечения большей безопасности использования такого бактериального энзима в фармацевтике, изолированная и характеризованная гиалуронидаза из оригинального штамма бактерий в [9] производилась в рекомбинантной форме с помощью непатогенного штамма бактерий в качестве клетки-хозяина, определяемой как «в целом безопасная» (ВЦБ). Произведенный из ВЦБ микроорганизма бактериальный рекомбинантный продукт обладает эффективностью, сравнимой с эффективностью аутологической гиалуронидазы, однако с большим количеством произведенной продукции на литр и со значительно лучшим профилем чистоты и безопасности, включая полное отсутствие риска передачи вируса.

Способ по настоящему изобретению позволяет получать большие объемы высококачественной рекомбинантной бактериальной гиалуронидазы для фармацевтического использования. Рекомбинантная гиалуронидаза, производимая в больших количествах непатогенными микроорганизмами, имеет такую же эффективность, как и традиционная гиалуронидаза, однако обладает значительно

большей безопасностью и лучшим профилем, включая полное отсутствие риска передачи животной губчатой энцефалопатии.

Настоящее изобретение описывает изоляцию целого гена, кодирующего гиалуронидазу, из грам-положительной бактерии *Streptomyces koganeiensis* с последующим клонированием и экспрессированием фрагмента кодирующей последовательности (кодирующая последовательность SEQ ID NO: 22). Кроме того, в настоящем изобретении описан способ приготовления в биореакторе, очистки и характеристики рекомбинантной гиалуронидазы, кодируемой и выделяемой в периплазматической части клетки в растворимой форме.

Полученный таким образом рекомбинантный протеин характеризуется высокой активностью гиалуронидазы и имеет высокую стабильность в присутствии протеолитических энзимов, способен обеспечивать полную активность при максимальной биодоступности в кровотоке без ингибирования и заражения вирусами и бактериями. В рекомбинантной растворимой форме он эффективен для использования не только при приготовлении медицинских средств для облегчения подкожного введения активных ингредиентов или инъекционных жидкостей, но также для терапевтических целей, например, при лечении таких патологий, как гипертензия, инфаркт миокарда, случаи тромбоза, сердечнососудистые заболевания, нарушения мозгового кровообращения и опухоли, поскольку описанные в данном изобретении свойства уникальны по отношению ко всем остальным гиалуронидазам, доступным на настоящий момент.

Производство известных гиалуронидаз основывается на животных источниках, имеющих высокий риск передачи животной губчатой энцефалопатии. Из-за этого риска, а также вследствие низкой стабильности гиалуронидазы, полученной из животных источников, был исследован, выделен и изолирован бактериальный штамм, способный обеспечить производство гиалуронидазы с высокой энзимной активностью.

В одном из аспектов настоящее изобретение связано с изоляцией полного гена (SEQ ID NO: 17), кодирующего бактериальную гиалуронидазу с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 21, полученную из грам-положительной бактерии *S. koganeiensis*, последующим клонированием и экспрессированием нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 22, кодирующей зрелый протеин с последовательностью SEQ ID NO: 21 в определенном бактериальном хозяине (например, *E. coli*), определенном в качестве организма, выбранного для экспрессии рекомбинантных протеинов, используемых для терапевтических, диагностических и промышленных целей. В изобретении описан способ производства протеина с применением способа с подпиткой в

биореакторе для получения больших объемов рекомбинантной гиалуронидазы, выделяемой в периплазматической части клетки в растворимой форме. Произведенная таким образом рекомбинантная гиалуронидаза подвергалась очистке с помощью трех воспроизводимых хроматографических шагов (два – путем ионного обмена и один – путем гидрофобного обмена). Энзим представляет собой инновационный, должным образом очищенный растворимый рекомбинантный бактериальный энзим с высокой активностью гиалуронидазы, производимый путем ферментации безопасных бактерий без использования клеток и сырья животного происхождения. Кроме того, согласно настоящему изобретению, энзим характеризуется последовательностью 217 аминокислот, изоэлектрической точкой (pI) $5,2 \pm 0,5$, высокой стабильностью в присутствии протеолитических энзимов, стабильностью *in vitro* при попадании в человеческую или животную кровь, высокой степенью чистоты и безопасности, а также полным отсутствием возможности вирусного заражения.

Гиалуронидазу согласно изобретению возможно получить следующим образом: вначале штамм *S. koganeiensis* подвергался ферментации и из бактериальных клеток получали внеклеточный материал, как описано ранее в [9]. Во время процесса ферментации клеточные фракции отбирались каждые 3–4 часа для оценки уровней ДНК и РНК, производимой стандартными методами (фиг. 1), а оставшаяся после анализа часть фракции хранилась при температуре -80°C в реагенте RNeasy Protect™ Bacteria Reagent (Qiagen). В конце ферментации супернатант, содержащий гиалуронидазу, был осветлен, сконцентрирован, диализирован, очищен и затем обогащен единственным компонентом гиалуронидазы, как описано ранее в [9].

Гиалуронидаза, изолированная таким образом из *S. koganeiensis*, переваривалась с помощью протеолитических энзимов (трипсин, химотрипсин, Glu-C), а полученные после переваривания фрагменты отделялись с помощью ВЭЖХ. Таким образом, информация, касающаяся первичной структуры изолированной гиалуронидазы, была получена путем секвенирования N-терминального участка фрагментов, полученных после переваривания с помощью энзимов.

В результате выполненного N-терминального секвенирования были получены следующие аминокислотные последовательности:

- AGENGATTTFDGPVA (SEQ ID NO: 1);
- RFSADTTIEAAFIKTTSETIHAATIYK (SEQ ID NO: 2);
- GYADGSDKDAAALSLDLR (SEQ ID NO: 3);
- AQVHIVQR (SEQ ID NO: 4);
- IGNAATVPTSVDSSGGG (SEQ ID NO: 5).

На основе исследования, выполненного с использованием базы данных, было выявлено сходство гиалуронидазы, полученной из *S. koganeiensis* ATCC 31394, с указанным выше протеином (protein_id = ZP_06911952.1) *Streptomyces pristinaespiralis* ATCC 25486. На основе N-терминальной последовательности пептидов, полученных из изолированного протеина в соответствии с настоящим изобретением, стало возможным синтезировать соответствующие олигонуклеотиды, послужившие для изолирования гена, кодирующего гиалуронидазу из генома *S. koganeiensis*.

Сгустки бактериальных клеток после ферментации [9] в период экспоненциальной выработки гиалуронидазы (фиг. 1) обрабатывались для экстракции и очистки ДНК и РНК. Полученная таким образом продукция анализировалась по качественному признаку с помощью спектрофотометра и по количественному признаку с помощью электрофореза в агарозном геле [12]. Идентифицированные и идентичные аминокислотные участки *S. koganeiensis* и *S. pristinaespiralis* применялись для определения олигонуклеотидов, используемых для изолирования внутреннего участка гена, кодирующего гиалуронидазу, из геномной ДНК, используемой в качестве образца, обеспечивая ПЦР продукта с единственной специфической полосой длиной приблизительно в 550 п.н. Нуклеотидная последовательность фрагмента представляла собой последовательность (SEQ ID NO: 8), показанную на фиг. 2.

Техника обратной ПЦР (ОПЦР) была разработана и использована для идентификации участков нуклеотидов, фланкирующих на определенную таким образом последовательность генов (фиг. 3). Метод ОПЦР с использованием пары праймеров SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12 позволил получить продукцию ПЦР длиной, соответственно, приблизительно 700 и 1400 п.н., которая после секвенирования дала корректную информацию о полном гене, кодирующем гиалуронидазу *S. koganeiensis*. На этом шаге идентификация интересующей нуклеотидной последовательности (SEQ ID NO: 13), показанной на фиг. 4, завершалась.

Пара праймеров, разработанных на основе некодирующих последовательностей (SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15), фланкирующих на полный ген, кодирующий гиалуронидазу, использовалась для амплификации полного гена (SEQ ID NO: 16) и продукт ПЦР (фиг. 5) был клонирован прямо в вектор pCR®-BluntII-TOPO® (Invitrogen) клеток *E. coli*. На основе результатов, полученных из биоинформационного анализа, было подтверждено, что полная длина гена, кодирующего гиалуронидазу, полученную из *S. koganeiensis*, составила 744 п.н. (SEQ ID NO: 17) и что длина пептидной последовательности, по оценкам, составила 247 аминокислот (SEQ ID NO: 18). Ген содержит предполагаемую область протеинов (SEQ ID NO: 19), принадлежащих к семье

гиалуронидазы (Hyaluronidase_1), что доказано поиском сходства в базе данных. Кроме того, анализ последовательности (SEQ ID NO: 18) с помощью специфического инструмента показал присутствие сигнальной последовательности (сигнального пептида) из 30 аминокислот (аминокислоты с 1 по 30 (SEQ ID NO: 47), с участком расщепления между аминокислотами 30 и 31). Зрелый протеин (SEQ ID NO: 21) содержит, таким образом, 217 аминокислот (соответствующая последовательность нуклеотидов имеет длину 651 п.н. (SEQ ID NO: 22)) и ее прогнозируемая молекулярная масса (http://web.expasy.org/compute_pi/) составляет 21679,96 Да.

Наконец, анализ BLAST на сходство последовательностей показал частичное сходство между определенной последовательностью аминокислот из гиалуронидазы, полученной из *S. koganeiensis* ATCC 31394 (SEQ ID NO: 18), с некоторыми последовательностями аминокислот гипотетических протеинов, принадлежащих бактериям *Actinobacteria phylum*, которые упоминаются в онлайн-базе данных.

Существует сходство между участком последовательности (SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 52) гиалуронидазы, полученной из *S. koganeiensis* (согласно изобретению) и одним из модулей, присутствующих на участке аминокислоты мышинового гликопротеина CD44, которая связывает гиалуроновую кислоту (фиг. 7 (a)).

кДНК, кодирующая гиалуронидазу, полученную из *S. koganeiensis* в соответствии с изобретением (SEQ ID NO: 41), была амплифицирована ПЦР из плазмиды pCR-BluntII-TOPO [sk_HYAL], и пришта после переваривания рестрикционными энзимами к различным плазмидам, используемым в соответствии с настоящим изобретением, например:

Вектор	Использованные праймеры	Рестрикционные энзимы	Длина нуклеотида, клонированного из (SEQ ID NO: 41)	Полученная плаزمид
pHT43	SEQ ID NO: 28 5'-gtaGGATCCGCCGGG GAAACGGCGCGACGACGA-3'	BamHI	672 п.н.	pHTsk_HYAL (фиг. 13 (a))
	SEQ ID NO: 29 5'-gacTCTAGATCACGCC GGTGCGATCGTCGTGACC-3'	XbaI		
pET22b	SEQ ID NO: 32	NcoI	671 п.н.	pHyal_sk

(+) (+)	5'-tggCCATGGCCGGGG AGAACGGCGCGACGACGA-3'			(фиг. 13 (b))
	SEQ ID NO: 33 5'-ctcGAATTCtcaCGCC GGTGCGATCGTCGTGACC-3'	EcoRI		
pET21b (+)	SEQ ID NO: 36 5'-ataCATATGGCCGGGGA GAACGGCGCGACGACGA-3'	NdeI	672 п.н.	pHyal_sk_SL (фиг. 13 (c))
	SEQ ID NO: 37 5'-ctcGAATTCtcaCGCCGG TGCGATCGTCGTGACC-3'	EcoRI		
pET24b (+)	SEQ ID NO: 36 5'-ataCATATGGCCGGGGA GAACGGCGCGACGACGA-3'	NdeI	672 п.н.	pRH_sk
	SEQ ID NO: 37 5'-ctcGAATTCtcaCGCCGG TGCGATCGTCGTGACC-3'	EcoRI		

После клонирования и амплификации в клетках *E. coli* штамма DH5α генетически модифицированные векторы извлекались и очищались для отдельной трансформации в клетки бактериальной экспрессии. Вектор pHTsk_HYAL трансформировался в компетентные клетки *Bacillus subtilis* (WB800N-MOBITEC), а векторы pHyal_sk, pHyal_sk_SL и pRH_sk трансформировались в компетентные клетки *E. coli*, штамм BL21 (DE3) и/или MG1655. Все трансформации были произведены с помощью химической обработки [13]. Клоны *B. subtilis* и *E. coli*, положительные на присутствие векторов, содержащих нуклеотидный фрагмент гиалуронидазы с генетически правильной клонированной последовательностью (SEQ ID NO: 41), тестировались на способность экспрессировать рекомбинантную гиалуронидазу в культурах объемом 500 мл (примеры 10, 11).

Предпочтительно в способе, соответствующем настоящему изобретению, рекомбинантная клетка на шаге (a) выбирается из клетки *Escherichia coli* и из клетки *Bacillus subtilis*.

На базе рекомбинантных штаммов продуцента были разработаны Главный банк клеток и Рабочий банк клеток и аликвоты данных клонов объемом 2 мл с 15% глицерина были введены в криогенные пробирки, которые сразу же были помещены на хранение при -80°C.

Гиалуронидазу согласно изобретению возможно производить в больших количествах, начиная с небольших биореакторов, с помощью способов отборно-доливной культуры (пример 13) и культуры с подпиткой (пример 14) как описано в настоящем изобретении (таблица 1).

Таблица 1. Плазмиды и стратегии клонирования, используемые в настоящем изобретении

Штамм	Плазмида	Описание плазмиды / стратегия клонирования	Расположение протеина	Выход растворимой гиалуронидазы (г/л)
<i>B. subtilis</i> WB800N	pHTsk_HYAL	pHT43(+)-SamyQ- (BamHI/XbaI)- гиалуронидаза	супернатант	н.д.
<i>E. Coli</i> BL21DE3	pHyal_sk	pET22b(+)-pelB- (NcoI/EcoRI)- гиалуронидаза	клеточная периплазма	~ 0,1
<i>E. Coli</i> BL21DE3	pHyal_sk_SL	pET21b(+)- (NdeI/EcoRI)- гиалуронидаза	клеточная периплазма	≥ 2
<i>E. Coli</i> BL21DE3	pETsk_Hyal	pET21b(+)- (BamHI/HindIII)- гиалуронидаза- His	тела включения	≤ 0,001
<i>E. Coli</i> BL21DE3	pET22_Hyal	pET22b(+)-pelB- (MscI/EcoRI)- гиалуронидаза	клеточная периплазма	~ 0,35
<i>E. Coli</i> MG1655	pHyal_sk	pET22b(+)-pelB- (NcoI/EcoRI)- гиалуронидаза	клеточная периплазма	н.д.

В том, что касается производства, стабильности и воспроизводимости, наилучшие результаты были получены при использовании ферментации и способа с подпиткой. Ампициллин, неомицин, канамицин или хлорамфеникол могут использоваться в качестве антибиотиков в соответствии с особенностями конкретных векторов.

Например, клон *E. coli* «BL21 (DE3)-pHyal_sk_SL» высевался из пробирки (взятой из рабочего банка клеток, который хранился при -80°C) в свежую культурную среду

Лурия-Бертани (Miller) (коэффициент 1/20 в отношении объема ферментации), содержащую 50 мкг/мл ампициллина, и инкубировался при 37°C при скорости 150 об/мин в течение 16–18 часов. Клон, полученный из засевного материала, выращивался в биореакторе в минимальной культурной среде при pH 6,8.

В качестве питательного раствора предпочтительным выбором был раствор глицерина. На протяжении процесса ферментации *E. coli* производит уксусную кислоту (ацетат) в качестве нежелательного побочного продукта, который оказывает значительное отрицательное воздействие на выработку рекомбинантных протеинов. Количество ацетата, сформировавшегося во время ферментации, напрямую связано с количеством глюкозы, потребленной растущими клетками *E. coli* [15]. В настоящем изобретении было обнаружено, что использование глицерина в качестве источника углерода (дешевого источника не поддающегося ферментации углерода) вместо глюкозы обеспечивает приблизительно трехкратное повышение производительности в процессе производства рекомбинантной гиалуронидазы способом с подпиткой. В качестве одного из примеров неограничивающего характера, питательный раствор можно вводить через 6 часов после засева и до 19-го часа (время индукции) при экспоненциально возрастающей дозе.

После индукции конечного раствора изопропилом β -D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) в количестве 1 ммоль конечного раствора, питательный раствор можно добавлять к культуре в течение 5 часов ежечасно в том же количестве, что и последняя добавка. Индукция происходит через 24 часа после засева и продолжается в течение 8–24 часов, как правило, в течение 12 часов. Бактериальные клетки собирались после периода индукции с помощью центрифугирования и хранились при –80°C. Клетки *E. coli* BL21 (DE3), трансформированные вектором pHyal_sk_SL, производили рекомбинантную форму в периплазме клетки с достижением максимальной концентрации приблизительно 2 г/л культуры и энзимной активности, превышающей 87000 ед/мл культуры ($7,5 \times 10^7$ – $8,7 \times 10^7$ МЕ/л культуры), получаемую через 12 часов индукции с помощью 1 ммоль ИПТГ при 37°C (таблица 2).

Таблица 2. Результат ферментации партий клона rHyal_Sk, выполненной для настоящего изобретения

Партия	5C11	7C11	9C11	10C11	11C12
Способ ферментации	Партия	Партия с подпиткой	Партия с подпиткой	Партия с подпиткой	Партия с подпиткой
Выход гиалуронидазы в	0,5	1	1,5	1,2	2,1

конце ферментации (г/л)					
Конечная биомасса (о.п. при 600 нм)	32,7	42	51,6	64	55
Ферментационный объем	8	10	10	10	10
Клеточные сгустки (г/л)	81,2	83	116	115	149
Засевной объем	0,4	0,5	0,5	0,5	1
Засевная биомасса (о.п. при 600 нм)	3	3	3	2	2,2
Объем подпитки (л)	0	1,5	1,5	1,5	2,5
Начало подпитки (ч)	–	6	6	6	6
Время индукции (ч)	16	12	12	12	12
Стабильность плазмиды в конце ферментации (%)	100	95	100	100	100
Полная продолжительность ферментации (ч)	~ 22	36	36	36	36

Количество гиалуронидазы, произведенной в соответствии с настоящим изобретением, в 670–750 раз превысило количество аутологической гиалуронидазы, произведенной в биореакторе, как описано в предыдущем патенте [9].

Рекомбинантный протеин с молекулярной массой 24 кДа, экспрессированный *E. coli* при различных параметрах ферментации, был проанализирован с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза (12%) после окрашивания кумасси бриллиантовым голубым G-250 (BIO-RAD, 161-0406), а его энзимная активность была проанализирована с помощью турбидиметрического анализа [16].

Рекомбинантная гиалуронидаза, произведенная в биореакторе способом с подпиткой, может очищаться с помощью процесса, включающего в себя, по меньшей мере, три хроматографических шага.

При подготовке первой очистки сгустки, хранящиеся при -80°C (сформированные в результате ферментации с подпиткой *E. coli* BL21 (DE3), трансформированные вектором pHyal_sk_SL), помещались в количестве, эквивалентном 0,6 литрам продукта ферментации (приблизительно эквивалентно диапазону 80–90 г клеточных сгустков, отражающих выработку приблизительно 1–1,2 г/л рекомбинантной гиалуронидазы) для балансировки в течение 45 минут при комнатной температуре.

После балансировки сгустки обработали свежим раствором (5°C) для дисперсии сгустков. Ресуспендированные сгустки обработали раствором для осмотического удара с целью стимуляции экстракции периплазматических протеинов. После осмотического удара полученный продукт центрифугировали, а полученный супернатант после гомогенизации доводился до pH 8 и фильтровался гравитационными фильтрами 0,65 мкм. Концентрация экстрагированной гиалуронидазы оценивалась ДСН-ПААГ-электрофорезом и составила приблизительно 750–900 мг (16–22% от общего количества периплазматических протеинов). Активность экстрагированной рекомбинантной гиалуронидазы была оценена с помощью турбидиметрического метода Дорфмана.

Фракция протеина с энзимной активностью гиалуронидазы, полученная таким образом, подвергалась сильной анионообменной хроматографии (пример: Q-sepharose[®] XL).

Фракция протеина с энзимной активностью гиалуронидазы, полученная таким образом, была сконцентрирована до 100 мл с помощью фильтров из полиэфирсульфона (ПЭС) с границей пропускания 5 кДа и 10-кратно разведена 50 ммоль буферного раствора натрия ацетата с pH 4.

Фракция протеина с энзимной активностью гиалуронидазы, полученная таким образом, подвергалась слабой катионообменной хроматографии (пример: CM-Sepharose[®] Fast Flow).

Фракция протеина с энзимной активностью гиалуронидазы, полученная таким образом, была сконцентрирована до 100 мл с помощью фильтров из полиэфирсульфона (ПЭС) с границей пропускания 5 кДа и 10-кратно разведена 50 ммоль буферного раствора натрия фосфата с 1,5 ммоль сульфата аммония, pH 7.

Фракция протеина с энзимной активностью гиалуронидазы, полученная таким образом, подвергалась ароматической гидрофобной хроматографии (пример: Phenyl-Sepharose[®] HP) и протеины, элюированные после финального хроматографического шага, были собраны в отдельную фракцию объемом приблизительно 730 мл, и затем подвергнуты анализу на активность гиалуронидазы. После анализа энзимной активности элюированная фракция была подвергнута ультрафильтрации и диализу 10 объемами

фосфатно-солевого буфера lx (Sigma-P4417), доведена до концентрации приблизительно 1 мг/мл и профильтрована с помощью фильтров 0,2 мкм, а концентрация протеина определялась с помощью набора реагентов для количественного определения белка (BCA Protein Assay Reagent Kit (PIERCE)).

По окончании процесса очистки, которой подвергся приблизительно 1 л ферментированного продукта, было получено приблизительно 600–650 мг рекомбинантной гиалуронидазы с энзимной активностью, превышающей $2,6 \times 10^7$ единиц на литр очищенного продукта, подвергшегося ферментации (таблица 3).

Таблица 3. Результаты для очищенной рекомбинантной гиалуронидазы в соответствии с изобретением

Образец		Гиалуронидаза (ед/мл)	Объем (мл)	Гиалуронидаза (всего единиц)	Выход (%)	Гиалуронидаза (всего мг)
Продукт ферментации	Загружено	48000	600	$4,8 \times 10^7$	100	1000
Периплазматическая экстракция	Элюировано	7600	5000	$3,8 \times 10^7$	80	800
Q-Sepharose® XL	Загружено	7600	5000	$3,8 \times 10^7$	100	800
	Элюировано	23100	950	$2,2 \times 10^7$	57,8	462
CM-Sepharose® Fast Flow	Загружено	23100	1000	$2,2 \times 10^7$	100	462
	Элюировано	57900	380	$2,2 \times 10^7$	100	462
Phenyl-Sepharose® HP	Загружено	22000	1000	$2,2 \times 10^7$	100	462
	Элюировано	26000	730	$1,9 \times 10^7$	88,8	410
Диафильтрация	Загружено	26000	730	$1,9 \times 10^7$	100	410
	Концентр. и диафильтр.	48570	350	$1,7 \times 10^7$	93	381
Диафильтрация 5кДа	Загружено	45300	375	$1,7 \times 10^7$	100	381
0,22 мкм фильтрация	Элюировано	45000	375	$1,69 \times 10^7$	99,5	378
Общая выработка на литр культуры (%)			35			
Общее количество на литр культуры (МЕ)			$2,8 \times 10^7$			
Общее количество на литр культуры (мг)			630			
Общее количество на грамм сгустков (МЕ)			$2,1 \times 10^7$			
Общее количество на грамм сгустков (мг)			4,8			

Во всех фракциях с активностью гиалуронидазы наблюдалась выраженная протеиновая полоса, соответствующая приблизительно 24 кДа (фиг. 16). Эта полоса была подвергнута ДСН-ПААГ-электрофорезу в 12% геле, а затем блоттингу на мембране из поливинилиденфторида (BIO-RAD) и окрашена в соответствии с инструкциями производителя. Полоса гиалуронидазы отсекалась скальпелем и загружалась в реактивную камеру секвенатора.

Секвенирование N-терминального участка, выполненное таким образом, позволило установить, что рекомбинантная гиалуронидаза, произведенная в соответствии с изобретением из образца *E. coli*, преобразованного с помощью вектора pHyal_sk_SL согласно изобретению, давала хроматограммы, где была заметно представлена единственная N-терминальная аминокислотная последовательность, что позволило реконструировать показанную ниже экспериментальную последовательность: AGENGA (SEQ ID NO: 42).

Энзимный потенциал гиалуронидазы, произведенной согласно изобретению (*E. coli*, трансформированная с помощью вектора pHyal_sk_SL) оценивался путем сравнения с энзимной активностью аутологической гиалуронидазы [9] с помощью описанного ферментного анализа [9] и показатель активности в обоих случаях превышал 4×10^4 МЕ/мг протеина.

Кроме того, в анализе, проведенном с помощью кругового дихроизма (КД), черная линия наложенных графиков (аутологическая гиалуронидаза [9]) и серая линия (гетерологическая гиалуронидаза, полученная в соответствии с изобретением) имеют сравнимые профили, что подтверждает сходность структуры протеина в обоих образцах (фиг. 17 (а)).

По сравнению с уровнем техники [9], способ, описанный в настоящем изобретении, позволяет:

- получить гиалуронидазу бактериального происхождения из штамма *E. coli*, известного как безопасный, а не из *Streptomyces koganeiensis*, с помощью рекомбинантной технологии (вместо экстрактивной), которая пригодна для производства в промышленных масштабах, с выработкой в периплазме (вместо внеклеточного матрикса);

- достичь неожиданно высокого максимума активности гиалуронидазы, свыше 80000 единиц на миллилитр культуры, в сравнении, например, с 130 единицами на миллилитр культуры в супернатанте для способа [9] что, в любом случае, намного выше, чем можно получить с помощью других известных способов;

- получение гиалуронидазы высокой степени чистоты (>99%) с использованием всего 3 хроматографических шагов (вместо 5), при значительном экономическом преимуществе и снижении времени обработки.

В другом аспекте настоящее изобретение также относится к гиалуронидазе, полученной из *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 в очищенной форме и содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

Протеин по настоящему изобретению может быть изолирован и произведен из *Streptomyces koganeiensis* или произведен рекомбинантным способом, например, из культур *E. coli* или *Bacillus subtilis*.

Неожиданно было обнаружено, что по сравнению с известным протеином, полученным из *Streptomyces koganeiensis* [9], энзим по настоящему изобретению имеет следующие свойства:

- более высокий уровень чистоты (99% по сравнению с 98%);
- меньший уровень эндотоксинов (<0,5 ед/мг по сравнению с >0,5 ед/мг);
- присутствие полной последовательности пептидов (и соответствующей нуклеотидной последовательности), не содержащей цистеина (таким образом снижается возможность образования агрегатов);
- высокая стабильность в растворе при 5°C (100% стабильность в течение 24 месяцев по сравнению с 94% в течение 24 месяцев для протеина [9]);
- отличная стабильность при 20°C (100% в течение 24 месяцев), при pH 3–11,5 (протестировано в пределах 24 часов);
- максимальная активность при физиологическом pH (приблизительно 7) и температуре тела (приблизительно 37°C);
- стабильность в крови, превышающая 90%.

Гиалуронидаза согласно настоящему изобретению – это продукт генной инженерии. До настоящего момента полный состав гена, кодирующего протеин, не был известен, поскольку отсутствовал геномный или протеиновый банк штамма *S. koganeiensis*. Нуклеотидная последовательность, кодирующая протеин, была идентифицирована и изолирована только с помощью способа, разработанного и описанного изобретателями. Данный фрагмент нуклеотида – это первая когда-либо изолированная и задокументированная последовательность ДНК указанного бактериального штамма. На промышленном уровне возможность получения полной последовательности гена, кодирующего данную гиалуронидазу с высокой энзимной активностью, позволяет использовать ее в различных системах, таких как векторы,

системы геномной интеграции, и в клетках, что позволяет производить и использовать энзим в фармацевтической промышленности.

Другим неожиданным результатом настоящего изобретения явилась заявленная в нем очень высокая производительность процесса, разработанного с применением комплексного отбора различных векторов экспрессии, различных типов вставки нуклеотидного фрагмента, кодирующего протеин в вектор экспрессии (т.е. вставки фрагмента с несколькими сайтами рестрикции в отношении других), и мониторинга выработки различными клеточными линиями. Работа усложнялась тем, что нуклеотидная последовательность, кодирующая протеин, не была доступна, что не позволяло применять знания специалиста, но в конечном счете позволила идентифицировать наиболее подходящий тип клонирования, тип вектора и клетки экспрессии для получения неожиданно высокой производительности. Модель экспрессии и выработки для рекомбинантного протеина в соответствии с изобретением позволяет по окончании процесса очистки получить чистый протеин с уровнем эндотоксинов $<0,5$ ед/мг протеина с использованием всего лишь трех хроматографических этапов вместо пяти, как в известном способе (эндотоксины $>0,5$ ед/мг протеина) [9].

Должным образом очищенный энзим характеризовался анализами, результаты которых представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результат характеризационных анализов рекомбинантной гиалуронидазы, полученной в соответствии с настоящим изобретением из клона :Hyal_Sk.

Анализ	Рекомбинантная гиалуронидаза
Анализ способом секвенирования N-терминальной области протеина (Lowry/BCA)	1 мг/мл AGENGA
1 ДСН-ПААГ-электрофорез	$>99\%$
Изоэлектрическое фокусирование Теоретический показатель I.P.5.5	$90\% (I.P.5.2 \pm 0.4)$
Эксклюзионная ВЭЖХ	100%
Обращенно-фазовая ВЭЖХ	$>99\%$
Пептидное картирование (с помощью ЖХ с МС) Степень идентичности контрольной аминокислотной последовательности	$94\% (<90\%)$

Проприетарные исследования белка клетки-хозяина для <i>E. coli</i> , лимит <100 млн ⁻¹	6,5–8,8 млн ⁻¹
Пороговая система (Проприетарные исследования ДНК для <i>E. coli</i>), лимит <300 пг/мг	19 пг/мг
Chromo-LAL	<0,5 ед/мг
Коэффициент молярной экстинкции	12383 л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹ ABS 280 (= 1 г/л) 0,570
Масс-спектрометрия протеинов, теоретический показатель MW 21679,96	21679,98±0,82
Капиллярный (зональный) электрофорез чистоты	100%
Молекулярные агрегаты (УФ-анализ при 250–350 нм)	отсутствие агрегатов
pH раствора в (1х ФСБ)	~ 7,5

Гиалуронидаза согласно настоящему изобретению обладает такой активностью и высокой чистотой, которые необходимы для ее использования в промышленных, диагностических и терапевтических целях. Кроме того, по сравнению с другими известными гиалуронидазами, гиалуронидаза, произведенная в соответствии с настоящим изобретением, показала себя как энзим, способный гидролизировать гиалуроновую кислоту, присутствующую в интерстициальном матриксе, повышая проницаемость соединительной ткани и стимулируя диффузию и дисперсию препарата, вводимого местно подкожно, в окружающие ткани с исключительной стабильностью, без переваривания протеолитическими энзимами, присутствующими в соединительной ткани, которые могли бы легко разлагать ее после введения, таким образом, нарушая ее действие (фиг. 24).

В настоящем изобретении, благодаря применению экспериментальной модели *in vitro* с использованием турбидиметрического метода, были подтверждены все предположения предыдущих клинических исследований, то есть, энзимная активность бычьей гиалуронидазы (бычья PH20) ингибируется человеческой и/или животной кровью, однако было обнаружено, что человеческая и/или животная кровь не ингибирует гиалуронидазу из рекомбинантного *S. koganeiensis* (фиг. 25).

Таким образом, на основе представленных здесь исследований было обнаружено, что рекомбинантная гиалуронидаза, полученная в соответствии с изобретением (описанным выше способом из *S. koganeiensis*) имеет высокую активность

гиалуронидазы, высокую стабильность в присутствии протеолитических энзимов и способна с максимальной биодоступностью обеспечивать полную активность в кровотоке без риска бактериальных и вирусных заражений. Поэтому ее можно использовать отдельно или в сочетании с другими активными веществами при приготовлении фармацевтических или ветеринарных препаратов для лечения патологий, когда необходимо или целесообразно подвергнуть разложению гиалуроновую кислоту, присутствующую в органе или ткани, где есть патология.

Благодаря высокой стабильности в водном растворе, гиалуронидазу по изобретению также возможно получать в форме препаратов на водной основе, таких как растворы, гидрофильные кремы, гидрогели, а также в форме липофильных продуктов, таких как мази или маслянистые кремы.

В одном из аспектов настоящее изобретение также связано с полинуклеотидом, содержащим последовательность нуклеотидов, показанную в SEQ ID NO: 17, и кодирующим бактериальную гиалуронидазу, полученную из *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 и содержащую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 21.

В другом аспекте настоящее изобретение также связано с генетически созданным рекомбинантным вектором, содержащим указанный полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 17.

Указанный вектор предпочтительно представляет собой плазмиду.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает клетку-хозяина, содержащую указанный вектор.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, пригодной для фармацевтического и косметического использования, включающей в себя гиалуронидазу, полученную из *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394, в очищенной форме и содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, получаемую с использованием описанного выше способа или экстракцией из *Streptomyces koganeiensis*.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к гиалуронидазе, полученной из *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394, в очищенной форме и содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, получаемой с использованием описанного выше способа или экстракцией из *Streptomyces koganeiensis*, для использования при лечении и/или предотвращении заболевания или нарушения, опционально в сочетании с, по меньшей мере, еще одним активным веществом.

Гиалуронидаза по настоящему изобретению применима как в медицине, так и в ветеринарии. Предпочтительно гиалуронидаза по настоящему изобретению предназначена для лечения и/или профилактики отеков, воспалительных состояний,

обморожений, твердых опухолей, аллергических реакций, опосредованных иммуноглобулином Е (IgE), заболеваний ротовой полости, внезапных кровоизлияний в стекловидное тело, артериосклероза, нарушений кровяного давления, сердечнососудистых заболеваний и нарушений мозгового кровообращения, таких как стеноз мозговых артерий или инсульт, или же коровий мастит.

Что касается использования для человека, гиалуронидаза по настоящему изобретению может использоваться для приготовления фармацевтических препаратов для лечения отеков, в частности, посттравматических отеков или воспалительных состояний, таких как геморроидальный синдром, кроме того, ее можно использовать для приготовления композиций, предназначенных для лечения обморожений, но не ограничиваясь этими применениями. Гиалуронидаза по настоящему изобретению также может использоваться в сочетании с другими препаратами, биодоступность которых необходимо или целесообразно увеличить.

Например, при лечении посттравматических отеков особенно целесообразно сочетание гиалуронидазы по настоящему изобретению с антикоагулянтами и/или фибринолитическими средствами. Такие препараты также могут содержать один или несколько стероидных или нестероидных противовоспалительных средств. Кроме того, данные препараты могут удачно сочетаться с сульфатной гиалуроновой кислотой, которая, как известно, в дополнение к противовоспалительным свойствам, также обладает противотромботическими и антикоагулянтными свойствами. Сочетание гиалуронидазы по настоящему изобретению с другими активными веществами также целесообразно в случае инъекционных форм, содержащих активные вещества с особенно высокой молекулярной массой, например, моноклональные антитела, цитокины, ферменты, ДНК и наночастицы-носители лекарственного средства, которые, как правило, вводятся внутривенно. Данная гиалуронидаза допускает их подкожное введение в соответствии с так называемой процедурой EASI (Enzymatically-Augmented Subcutaneous Infusion – подкожное введение, усиленное ферментами), которая в особенности используется для замещения жидкостей у больных в терминальной стадии, при ограничении или при невозможности обеспечения медицинского ухода.

Гиалуронидаза по настоящему изобретению также может использоваться при приготовлении фармацевтических средств для лечения резистентных твердых опухолей. Фактически, разлагая гиалуроновую кислоту, она снижает давление интерстициальных жидкостей на массу опухоли, таким образом увеличивая приток крови к опухоли и повышая эффективность транспортировки лекарственных средств к цели для более эффективного замедления или ингибирования роста опухоли. По тем же причинам она

также повышает эффективность активных противораковых средств, которые могут с ней сочетаться. Поэтому еще один аспект изобретения относится к лекарственным средствам, содержащим гиалуронидазу в сочетании с одним или несколькими активными противораковыми средствами, такими как алкалоиды барвинка (винбластин, винкристин, винорелбин) и таксаны (паклитаксел).

Еще одно терапевтическое использование гиалуронидазы по настоящему изобретению связано с ее использованием в лечении аллергических реакций, опосредованных IgE, с помощью способа EPD (Enzyme Potentiated Desensitization – десенсибилизация, стимулированная энзимами), который состоит во введении очень низких доз аллергенов для десенсибилизации пациентов, чувствительных к ним. С помощью соединения гиалуронидазы с аллергеном можно повысить эффективность лечения, поскольку аллергену проще добраться до места его действия. Поэтому еще один аспект изобретения связан с лекарственными средствами, содержащими гиалуронидазу в сочетании с одним или более аллергенами, вызывающими аллергические реакции, опосредованные IgE. Гиалуронидаза также используется как фактор диффузии стоматологических средств, используемых для лечения заболеваний ротовой полости, таких как местные анестетики и антибиотики. Поэтому в еще одном аспекте изобретение относится к фармацевтическим средствам, содержащим гиалуронидазу по настоящему изобретению в сочетании с одним или несколькими местными анестетиками или антибиотиками.

В офтальмологии гиалуронидаза позволяет значительно ускорить лечение внезапных кровоизлияний в стекловидное тело и может использоваться, отдельно или в сочетании с другими активными ингредиентами, при подготовке медицинских препаратов для офтальмологического использования, таких как растворы, суспензии, гели, кремы и мази для лечения таких кровоизлияний.

Предыдущие исследования показали эффективность гиалуронидазы в лечении сердечнососудистых заболеваний, таких как атеросклероз [2], и для контроля кровяного давления [3]. Более того, благодаря способности гиалуронидазы по настоящему изобретению обеспечивать высокую активность в кровотоке без ингибирования, ее также можно использовать для лечения сердечнососудистых заболеваний и нарушений мозгового кровообращения.

С другой стороны, в ветеринарии существует заболевание, которое эффективно поддается лечению гиалуронидазой по настоящему изобретению – коровий мастит; в этом случае гиалуронидазу возможно вводить в сочетании с антибиотиками, такими как пенициллин G, цефалоспорины I-IV поколений и улучшенный аминопенициллин.

Благодаря стабильности в водном растворе, гиалуронидаза по настоящему изобретению может выпускаться в виде продуктов на водной основе; выбор между препаратом на водной основе и на масляной основе делается специалистом на основе общих знаний в области фармацевтических технологий и с учетом других ингредиентов композиции.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к нетерапевтическому использованию гиалуронидазы в очищенной форме, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, получаемой из *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 или с помощью изложенного выше способа, для применения в косметической отрасли и/или для эстетического улучшения внешнего вида.

Гиалуронидаза также используется в косметике для лечения гранулематозных реакций или для коррекции ошибочного, нежелательного распределения гиалуроновой кислоты, вызванного введением филлеров.

Кроме того, на сегодняшний день, после проведения ряда исследований, разработано средство для инъекций на основе гиалуронидазы, которое способно заметно улучшить состояние при фиброзе в случае целлюлита. Сегментируя фиброзный компонент целлюлита, гиалуронидаза размягчает его, уменьшая эффект апельсиновой корки, тем самым придавая более естественный и приятный вид обработанному участку кожи. В этом случае гиалуронидаза применима в отношении пациентов, страдающих целлюлитом или имеющих небольшую жировую массу. До настоящего момента это единственная терапия, способная противостоять целлюлиту с удовлетворительными результатами с эстетической и/или терапевтической точки зрения.

Настоящее изобретение включает в себя гиалуронидазу, как описано выше, используемую в терапевтических и нетерапевтических целях для лечения и/или предотвращения целлюлита.

Наконец, гиалуронидаза по настоящему изобретению может быть использована в качестве реагента в биохимических анализах на количественное/качественное определение гиалуроновой кислоты.

Практическое применение настоящего изобретения описано ниже в примерах, данных в качестве иллюстрации, но не в качестве ограничения.

Пример 1. Бактериальный штамм и культурные условия.

Штамм *S. koganeiensis* был получен из Американской коллекции клеточных культур (ATCC 31394). Внеклеточный материал был получен из клеток бактерий описанным выше способом [9]. Вкратце, колония микроорганизмов была перенесена из среды ISP 2, из чашек с агаровой средой, и выращивалась в 500 мл культурной среды ((20 г/л экстракта дрожжей (Organotechnie) и 5 г/л соевого пептона (Solabia) при pH 6,9)) при

30°C, с перемешиванием при 150 об/мин в течение приблизительно 16 часов. После выращивания культуру использовали для засева в 20-литровый биореактор (Biostat U, B.BRAUN), содержащий 10 литров специальной почвы ((10 г/л дрожжевого экстракта (Organotechnie), 5 г/л соевого пептона (Solabia), 3 г/л экстракта солода (Constantine), 3 г/л декстрина типа I (Sigma), 0,2 г/л пеногасителя (Sigma)). До внесения инокулята pH довели до 7,0 с помощью NaOH; во время ферментации показатель pH отслеживали, но не регулировали, а температура поддерживалась на уровне 30°C на протяжении всей ферментации, перемешивание выполнялось со скоростью 300 об/мин с аэрацией 1,6 объемной доли в минуту (литров воздуха/литр ферментационной среды/мин). Ферментация продолжалась на протяжении 48 ч – периода, совпадавшего с максимумом выработки гиалуронидазы с энзимной активностью в супернатанте культуры. Образцы культуры брали ежедневно для оценки ее роста и жизнеспособности и концентрации гиалуронидазы, производимой в супернатанте культуры, путем определения энзимной активности методом Дорфмана [10]. На различных этапах плотность клеток определялась подсчетом под микроскопом с измерением оптической плотности при 600 нм и подсчетом колоний на агаровых чашках со средой ISP 2 (Difco).

Фракции клеток отбирались каждые 3–4 часа и часть их использовалась для оценки уровней РНК и ДНК (фиг. 1) с помощью стандартных методов с использованием спектрофотометра T60 UV-Vis (PG Instruments), остальная часть фракции хранилась при –80°C с применением RNeasy Protect Bacteria Reagent (Qiagen). По окончании ферментации культуру центрифугировали на скорости 5000 об/мин в течение 30 минут при 4°C (Sorvall Evolution RC) и фильтровали полиэфирсульфоновыми фильтрами с тангенциальным потоком, 0,2 мкм, для устранения биомассы *Streptomyces koganeiensis* (имеющей форму окатанных гифообразных агрегатов 1–4 мм в диаметре) и получения осветленного супернатанта, содержащего гиалуронидазу. Затем супернатант был сконцентрирован и подвергнут диализу с применением тангенциальной фильтрации описанным выше способом [9].

Пример 2. Изоляция аутологической гиалуронидазы с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения.

Концентрированный и диализованный супернатант был очищен и затем обогащен гиалуронидазой, как описывалось ранее в [9]. Вкратце, изолирование и характеристика протеина осуществлялись с применением протеомического подхода в сочетании с процессом, основанным на использовании комбинации ионообменных хроматографических колонок (GE Healthcare), в следующей последовательности: CM-Sepharose® FF, HiTrap Q XL и HiTrap SP FF, Resource Q. Отдельные фракции,

элюированные из хроматографических колонок, были протестированы на их высший показатель активности гиалуронидазы с помощью энзимной дозировки и параллельно проанализированы на содержание протеина с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза.

Определение активности гиалуронидазы.

Активность гиалуронидазы измерялась с помощью модифицированного метода Дорфмана [10]. Вкратце, продукт, полученный с помощью хроматографии, разводился в 0,03 моль фосфатного буфера, 0,82% NaCl, pH 6,3, и 1 мл полученного таким образом раствора смешивался с 1 мл субстратного буфера (0,03 моль фосфатного буфера, NaCl 10,82%, pH 6,3), содержащего 0,5 мг гиалуроновой кислоты. Энзимное переваривание проводилось при 37°C в течение 30 минут и в конце инкубационного процесса помутнение обеспечивалось добавлением 4 мл кислого раствора на основе лошадиной сыворотки (SIGMA). Оптическая плотность при 640 нм измерялась ровно через 30 минут после добавления кислого раствора на основе лошадиной сыворотки. Стандарт гиалуронидазы из тестикул млекопитающих (EDQM, гиалуронидаза FIP, H1115000), содержащий 328 ME/мг, использовался для построения стандартной кривой, с помощью которой рассчитывалась активность образцов (в единицах).

ДСН-ПААГ-электрофорез и анализ.

Электрофоретические анализы на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) проводились с помощью метода Лэмли [11] в 12% полиакриламидном геле с использованием продукта Mini-PROTEAN 3 (BIO-RAD) в соответствии с инструкциями производителя. Молекулярная масса очищенного протеина оценивалась сравнением со стандартными протеинами с низкой молекулярной массой (BIO-RAD). Изображение полиакриламидных гелей, окрашенных серебрянкой (Silver Stain Plus) (BIO-RAD) или кумасси (BIO-RAD) после электрофореза, было получено с помощью лабораторного устройства захвата изображений ImageQuant 300 TL (GE Healthcare), а анализы (количественные и качественные) производились с помощью программного обеспечения для анализа изображений ImageQuant TL (GE Healthcare).

Пример 3. N-терминальная последовательность внутренних фрагментов протеина

Секвенирование N-терминальной последовательности аминокислот было проведено в соответствии с методом Эдмана с помощью автоматического секвенатора протеина в импульсной жидкой фазе (ABI-Perkin Elmer Mod. 477A). Изучение гомологии проводилось с помощью программного обеспечения BLAST (Национальный центр биотехнологической информации в Национальной медицинской библиотеке (Bethesda, MD) [28]), поискового сервера института Broad Institute (<http://www.broadinstitute.org/>) и программного обеспечения ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Программы SignalP

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>) и Interproscan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) использовались для анализа участка расщепления сигнального пептида и домена протеина, соответственно.

Информация, касающаяся первичной структуры изолированной гиалуронидазы, была получена путем секвенирования N-терминального участка целого протеина и фрагментов, полученных после переваривания с помощью трипсина, химотрипсина, Glu-C и отделения фрагментов, произведенного ВЭЖХ.

После проведения N-терминального секвенирования были определены N-терминальная аминокислотная последовательность и аминокислотная последовательность внутренних фрагментов, они представлены в приведенной далее последовательности:

- AGENGATTTFDGPVA (SEQ ID NO: 1);
- RFSADTTIEAAFIKTTSETIHAATYK (SEQ ID NO: 2);
- GYADGSDKDAAALSLDLR (SEQ ID NO: 3);
- AQVHIVQR (SEQ ID NO: 4);
- IGNAATVPTSVDSSGGG (SEQ ID NO: 5).

На основе поиска в базе данных по этим определенным последовательностям было выявлено сходство гиалуронидазы, полученной из *S. koganeiensis* ATCC 31394, с предсказанным протеином (protein_id = ZP_06911952.1) *Streptomyces pristinaespiralis* ATCC 25486. На основе N-терминальной последовательности пептидов, полученной из изолированного протеина в соответствии с настоящим изобретением, стало возможным синтезировать соответствующие олигонуклеотиды, послужившие для изолирования гена, кодирующего гиалуронидазу из генома *S. koganeiensis*.

Пример 4. Идентификация нового гена гиалуронидазы.

Ген, кодирующий гиалуронидазу, был изолирован из ДНК бактериальных клеток *Streptomyces koganeiensis*. Вкратце, сгустки бактериальных клеток после ферментации в период экспоненциальной выработки гиалуронидазы (фиг. 1) обрабатывались для экстракции и очистки геномной ДНК с помощью набора DNeasy Tissue Kit (Qiagen), а РНК извлекалась с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen). Библиотека кДНК была получена из полной РНК, с использованием наборов MICROBExpress kit и Poly (A) Tailing kit (Applied Biosystems) для изолирования иРНК (информационной РНК) от общей РНК, а также набора SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) в соответствии с инструкциями производителя. Полученная таким образом продукция анализировалась по количественному признаку с помощью спектрофотометра T60 UV-Vis (PG Instruments) и по качественному признаку с помощью электрофореза в агарозном геле [12].

Как описано в предыдущем абзаце, были обнаружены одинаковые аминокислотные участки *S. koganeiensis* и *S. pristinaespiralis* и следующие олигонуклеотиды были синтезированы на нуклеотидных участках, кодирующих эти идентичные остатки аминокислот, с помощью онлайн инструментов и стандартных кодонов бактериального использования: MesFor2 (5'-GGAGAACGGGGCGACGACGACGTTTCG-3' (SEQ ID NO: 6)), соответствующего пептиду, присутствующему в N-терминальной зоне (ENGATTTTF), антисмыслового MesRev2 (5'-GTCGGCACCGTCGCCGCGTTCCCGAT-3' (SEQ ID NO: 7)), соответствующего пептиду, присутствующему в C-терминальной зоне (IGNAATVP).

С использованием этих двух олигонуклеотидов и геномной ДНК в качестве шаблона было выполнено несколько реакций ПЦР с полимеразой KOD (Toyobo), экспериментируя с различными температурными условиями, с использованием ДМСО в концентрации 4% или без него. По окончании различных технологических стадий был получен конкретный продукт ПЦР (условия: первичная денатурация при 95°C в течение 5 мин, при 96°C в течение 40 сек., 40 циклов отжига при 55°C в течение 30 сек. и удлинения при 72°C в течение 1 мин, и при 72°C – 10 мин); фактически, ПЦР только расширяет специфическую полосу длиной приблизительно 550 п.н. Слитное проведение двух процессов секвенирования фрагмента дало в результате последовательность (SEQ ID NO: 8), показанную на фиг. 2. Продукты ПЦР были проанализированы с помощью электрофореза в агарозном геле. Принимая во внимание сходство между нуклеотидными последовательностями *S. koganeiensis* и *S. pristinaespiralis*, внимание было сконцентрировано на некодирующих участках, фланкирующих анализируемый ген.

С помощью онлайн-ресурса http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/streptomyces_group/GenomeDescriptions.html были определены фланкирующие участки гена *S. pristinaespiralis*, на которых были созданы два олигонуклеотида (MesExrF: 5'-cgggagaagggtgaacgc-3' (SEQ ID NO: 9) и MesExtR: 5'-ctccgcgaccagttcttcg-3' (SEQ ID NO: 10)) для использования в ПЦР на образце геномной ДНК *S. koganeiensis*. Условия ПЦР были определены на основании предыдущего шага при поддержании более высокой температуры денатурации (96°C) из-за высокого содержания GC бактериальных геномов.

Принимая во внимание неспецифические результаты, было принято решение попытаться использовать данные олигонуклеотиды в сочетании с MesFor2 (SEQ ID NO: 6) и MesRev2 (SEQ ID NO: 7), используемыми до этого, которые обеспечили ожидаемый ПЦР продукт. Было обнаружено, что только амплификация с участием олигонуклеотидов MesFor2 и MesExtR обеспечивает чистый продукт ожидаемого размера; его

секвенирование с помощью двух праймеров, используемых в амплификации, помогло определить участок 3' анализируемого гена. Техника обратной ПЦР (ОПЦР) была разработана и использована для идентификации участков нуклеотидов, расположенных выше последовательности генов, обнаруженной на сегодняшний день (фиг. 3).

Способ ОПЦР включал в себя следующие технологические стадии:

а) переваривание геномной ДНК с помощью рестрикционных энзимов; были установлены три различные реакции энзимного переваривания с помощью энзимов KpnI, NarI и NotI приблизительно 100 нг геномной ДНК *S. koganeiensis*;

б) лигирование переваренной ДНК;

с) амплификация ПЦР с использованием реакций лигирования в качестве шаблона, с олигонуклеотидами, которые подвергают отжигу участок, который, как известно на настоящий момент, кодирует гиалуронидазу *S. koganeiensis*.

Использовались следующие олигонуклеотиды: MesINTf (5'-GGCATCTACGTCACGGCGACGAAC-3' (SEQ ID NO: 11)) и антисмысловой MesINTr (5'-CGTACCCGCGGTGGGTGATCTTCAG-3' (SEQ ID NO: 12)).

Вещества, переваренные энзимами KpnI и NarI, обеспечили продукцию ПЦР длиной соответственно 700 и 1400 п.н., которая после секвенирования дала точную информацию об участке 5', фланкирующем на ген гиалуронидазы *S. koganeiensis*. На этом шаге идентификация интересующей нуклеотидной последовательности (SEQ ID NO: 13), показанной на фиг. 4, завершалась.

Пара праймеров, разработанных на основе некодирующих последовательностей (в направлении вперед: 5'-accattcgagtgatcggtg-3' (SEQ ID NO: 14), в обратном направлении: 5'-gtcaactgcactgttctctcc-3' (SEQ ID NO: 15)), фланкирующих на полный ген, кодирующий гиалуронидазу, использовались для амплификации полного гена. Полученный продукт ПЦР, последовательность которого, полученная после секвенирования (SEQ ID NO: 16) и показанная на фиг. 5, отделялась от геля после сеанса электрофореза, очищалась с помощью геля Wizard SV Gel и системы очистки ПЦР (Promega), и клонировалась непосредственно в вектор pCR®-BluntII-TOPO® (Invitrogen) в клетках *E. coli*. Далее клоны (pCR-BluntII-TOPO [sk_HYAL]), которые при ПЦР показали присутствие плазмид, содержащих ген гиалуронидазы, были проанализированы с помощью секвенирования.

Анализ полученной последовательности протеина.

Для исследования гомологии с помощью базы данных GenBank использовалось программное обеспечение BLAST. Кроме того, использовалось программное обеспечение ExPASy Translate Tool, доступное онлайн, для компьютерного моделирования последовательности нуклеотидов изолированного гена, кодирующего гиалуронидазу,

полученную из *S. koganeiensis* в протеиновой последовательности. В конечном итоге, область, консервативная в отношении активности гиалуронидазы, была проверена с помощью программного обеспечения InterProScan, доступного по адресу <http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/> (фиг. 7 (а)). На основе полученных результатов было подтверждено, что полная длина гена, кодирующего гиалуронидазу, полученную из *S. koganeiensis*, составила 744 п.н. (SEQ ID NO: 17), и что длина пептидной последовательности, по оценке, составила 247 аминокислот (SEQ ID NO: 18). Ген содержит предполагаемую область протеинов (SEQ ID NO: 19), принадлежащих к семье гиалуронидазы (Hyaluronidase_1), что доказано поиском сходства в базе данных Pfam. Кроме того, анализ последовательности (SEQ ID NO: 18) с помощью специфического инструмента <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-1.1/> показал присутствие сигнальной последовательности (сигнального пептида) из 30 аминокислот (аминокислоты с 1 по 30 (SEQ ID NO: 47), с участком расщепления между аминокислотами 30 и 31). Зрелый протеин (SEQ ID NO: 21) имеет, таким образом, длину 217 аминокислот (соответствующая последовательность нуклеотидов имеет длину 651 п.н. (SEQ ID NO: 22)), а его молекулярная масса, предсказанная с помощью инструментов, доступных на сайте http://web.expasy.org/compute_pi/, составила 21679,96 Да. Наконец, анализ BLAST на сходство последовательностей показал сходство между последовательностью аминокислот для гиалуронидазы, полученной из *S. koganeiensis* ATCC 31394 (SEQ ID NO: 18) и аминокислотными последовательностями, имеющимися в базе данных онлайн: сходство с аминокислотной последовательностью протеина гиалуроноглюкозаминидазы (предсказанной на основе анализа открытых рамок считывания из локуса генома, описанного онлайн с кодом YP_006266806.1), полученного из *Actinoplanes* sp., который демонстрирует 68% идентичности и 78% сходства, сходство с аминокислотной последовательностью предсказанного протеина ZP_06911952.1 (с помощью анализа открытых рамок считывания из локуса генома, описанного онлайн с кодом ZP_06911952.1), полученного из *Streptomyces pristinaespiralis* ATCC 25486 с 66% идентичности и 77% сходства (SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 48), и сходство с аминокислотной последовательностью гипотетического протеина STSU_30255 (предсказанного на основе анализа открытых рамок считывания из локуса генома, описанного онлайн с кодом ZP_10072726.1), полученного из *Streptomyces tsukubaensis* NRRL18488 (SEQ ID NO: 24 и SEQ ID NO: 49) с 66% идентичности и 80% сходства (фиг. 6 (а), (б)). Принимая во внимание значительное сходство функциональной области (SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 51), наблюдающееся у гиалуронидазы, описанной в настоящем изобретении (SEQ ID NO: 19), полная

нуклеотидная последовательность, кодирующая данные протеины, которая в интернете обозначается терминами «гипотетическая» или «предсказанная», была изолирована из первоначального геномного локуса и характеризуется, что позволило впервые определить ее как гиалуронидазу в настоящем изобретении (фиг. 7 (b)). Тем не менее, ни один из данных анализов не определил полную и точную нуклеотидную последовательность и аминокислотную последовательность гиалуронидазы, изолированную в соответствии с патентом, указанным в литературе.

Было выявлено сходство между участком последовательности (SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 52) гиалуронидазы, полученной из *S. koganeiensis* (согласно изобретению), и одним из модулей, присутствующих на участке аминокислоты мышинового гликопротеина CD44, которая связывает гиалуроновую кислоту (фиг. 7 (a)).

Пример 5. Клонирование гена, кодирующего гиалуронидазу в рНТ43 (+).

кДНК, кодирующая гиалуронидазу, полученную из *S. koganeiensis* (SEQ ID NO: 41) была амплифицирована ПЦР из плазида pCR-BluntII-TOPO [sk_HYAL], экстрагированного и очищенного из клеток *E. coli* с помощью системы очистки ДНК Wizard Plus SV Minipreps, и следующих праймеров: смыслового (5'-gtaGGATCCGCCGGGAGAACGGCGCGACGACGA-3' SEQ ID NO: 28) и антисмыслового (5'-gacTCTAGATCACGCCGGTGCGATCGTCGTGACC-3' SEQ ID NO: 29). Для амплификации были выполнены следующие циклы ПЦР: первоначальная денатурация при 96°C в течение 5 минут, 30 циклов отжига при 55°C в течение 30 секунд и удлинения при 72°C в течение 1 минуты, и затем денатурация при 96°C в течение 40 секунд. В качестве ДНК-полимеразы Taq, используемой для амплификации, применялась ДНК-полимераза DyNAzyme II (Finnzymes) (фиг. 8). Амплифицированный продукт (672 п.н.) был очищен с помощью геля Kit Wizard SV Gel и Системы очистки ПЦР (Promega), переварен с использованием BamHI (BioLabs) и XbaI (BioLabs), и лигирован с помощью лигазы T4 (Ambion) и вектора рНТ43 (+), предварительно переваренного с использованием BamHI и XbaI (фиг. 8). После лигирования вектор трансформировался внутри клеток DH5α штамма *E. coli* (код Invitrogen 12297-016) путем химической обработки. После трансформации клетки засеивались на агар Лурия-Бертани, содержащий ампициллин (50 мкг/мл) и инкубировались при 37°C в течение 16 ч. Полученные колонии были проанализированы для проверки правильности сшивания между фрагментом гена гиалуронидазы и вектором с помощью ПЦР (первоначальная денатурация при 94°C в течение 5 минут, 30 циклов отжига при 55°C в течение 30 секунд и удлинения при 72°C в течение 60 секунд, и последующая денатурация при 94°C в течение 1 минуты) с помощью вектор-специфичных праймеров (в направлении вперед: 5'-

TGTGGAATTGTGAGCGGATA-3' (SEQ ID NO: 30), в обратном направлении: 5'-TTTCAACCAATTTGTTCCAGGT-3' (SEQ ID NO: 31)). Полученный продукт ПЦР (927 п.н.) вместе с продукцией, полученной путем переваривания вектора pHTsk_HYAL (вектор со вставкой) (фиг. 10) рестрикционными энзимами (BamHI, XbaI), был проанализирован электрофорезом в 1% агарозном геле (фиг. 9) с использованием эталонных стандартов молекулярной массы (ФХ174 DNA и λ DNA/HindIII производства Fermentas). Для анализа правильной рамки гена, кодирующего гиалуронидазу после сшивания с вектором, последовательность продукта ПЦР секвенировалась. Полученная нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 38) после секвенирования (фиг. 13 (a)) анализировалась с помощью инструментов биоинформатики, таких как ClustalW, Translate (ExPASy) и Chromas life.

Пример 6. Клонирование гена, кодирующего гиалуронидазу в pET22b(+).

кДНК, кодирующая гиалуронидазу, полученную из *S. koganeiensis* (SEQ ID NO: 41) была амплифицирована ПЦР из плазмиды pCR-BluntII-TOPO [sk_HYAL], экстрагированной из клеток *E. coli*, и затем очищена с помощью системы очистки ДНК Wizard Plus SV Minipreps и следующих праймеров: смыслового (5'-tggCCATGGCCGGGAGAACGGCGCGACGACGA-3' (SEQ ID NO: 32)) и антисмыслового (5'-ctcGAATTcTcaCGCCGGTGCGATCGTCGTGACC-3' (SEQ ID NO: 33)). Для амплификации были выполнены следующие циклы ПЦР: первоначальная денатурация при 96°C в течение 5 минут, 30 циклов отжига при 55°C в течение 30 секунд и удлинения при 72°C в течение 1 минуты, затем денатурация при 96°C в течение 40 секунд. В качестве ДНК-полимеразы Taq для амплификации использовалась ДНК-полимераза DyNAzyme II (Finnzymes) (фиг. 8). Амплифицированный продукт (671 п.н.) был очищен с помощью геля Kit Wizard SV Gel и Системы очистки ПЦР (Promega), переварен с помощью NcoI (BioLabs) и EcoRI (BioLabs) и лигирован с помощью лигазы T4 (Ambion) к вектору pET22b (+), предварительно переваренному NcoI и EcoRI (фиг. 8). После пришивания вектор трансформировался внутри клеток штамма *E. coli* DH5 α (код Invitrogen 12297-016) путем химической обработки. После трансформации клетки засеивались на агар Лурия-Бертани, содержащий ампициллин (50 мкг/мл), и инкубировались при 37°C в течение 16 ч. Полученные колонии были проанализированы для проверки правильности сшивания между фрагментом гена гиалуронидазы и вектором с помощью ПЦР (первоначальная денатурация при 94°C в течение 5 минут, 30 циклов отжига при 55°C в течение 30 секунд и удлинения при 72°C в течение 60 секунд, последующая денатурация при 94°C в течение 1 минуты) с помощью вектор-специфичных праймеров (промотор T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO:

34), терминатор T7: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' (SEQ ID NO: 35)). Полученный продукт ПЦР (940 п.н.) вместе с продукцией, полученной путем переваривания вектора pHyal_sk (вектор со вставкой) (фиг. 11) рестрикционными энзимами (NcoI, EcoRI), был проанализирован электрофорезом в 1% агарозном геле (фиг. 9) с использованием эталонных стандартов молекулярной массы (ФХ174 DNA и λDNA/HindIII производства Fermentas). Для анализа правильной рамки гена, кодирующего гиалуронидазу после сшивания с вектором, последовательность продукта ПЦР секвенировалась. Полученная нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 39) после секвенирования (фиг. 13 (b)) анализировалась с помощью инструментов биоинформатики, таких как ClustalW, Translate (ExPASy) и Chromas life.

Пример 7. Клонирование гена, кодирующего гиалуронидазу в pET21b(+).

кДНК, кодирующая гиалуронидазу, полученную из *S. koganeiensis* (SEQ ID NO: 41) была амплифицирована ПЦР из плазмиды pCR-BluntII-TOPO [sk_HYAL], экстрагирована из клеток *E. coli* и очищена с помощью системы очистки ДНК Wizard Plus SV Minipreps и следующих праймеров: смыслового (5'-tgGCCATGGCCGGGAGAACGGCGCGACGACGA-3' (SEQ ID NO: 36)) и антисмыслового (5'-ctcGAATTCtcaCGCCGGTGCGATCGTCGTGACC-3' (SEQ ID NO: 37)). Для амплификации были выполнены следующие циклы ПЦР: первоначальная денатурация при 96°C в течение 5 минут, 30 циклов отжига при 55°C в течение 30 секунд и удлинения при 72°C в течение 1 минуты, и затем денатурация при 96°C в течение 40 секунд. В качестве ДНК-полимеразы Taq для амплификации использовалась ДНК-полимераза DyNAzyme™ II (FINNZYME) (фиг. 8). Амплифицированный продукт (672 п.н.) был очищен с помощью геля Kit Wizard SV Gel и системы очистки ПЦР (Promega), переварен с помощью NdeI (BioLabs) и EcoRI (BioLabs) и лигирован с помощью лигазы T4 (Ambion) к вектору pET21b(+) (Novagen), предварительно переваренному с NdeI и EcoRI (фиг. 8). После пришивания вектор трансформировался внутри клеток штамма *E. coli* DH5α (код Invitrogen 12297-016) путем химической обработки. После трансформации клетки засеивались на агар Лурия-Бертани, содержащий ампициллин (50 мкг/мл), и инкубировались при 37°C в течение 16 ч. Полученные колонии были проанализированы для проверки правильности сшивания между фрагментом гена гиалуронидазы и вектором с помощью ПЦР (первоначальная денатурация при 94°C в течение 5 минут, 30 циклов отжига при 55°C в течение 30 секунд и удлинения при 72°C в течение 60 секунд, последующая денатурация при 94°C в течение 1 минуты) с использованием вектор-специфичных праймеров (промотор T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO: 34), терминатор T7: 5'-

GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' (SEQ ID NO: 35)). Полученный продукт ПЦР (874 п.н.) вместе с продукцией, полученной путем переваривания вектора pHyal_sk_SL (вектор со вставкой) (фиг. 12) с рестрикционными энзимами (NdeI, EcoRI), был проанализирован электрофорезом в 1% агарозном геле (фиг. 9) с использованием эталонных стандартов молекулярной массы (ФХ174 DNA и λ DNA/HindIII производства Fermentas). Для анализа правильной рамки гена, кодирующего гиалуронидазу после сшивания с вектором, последовательность продукта ПЦР секвенировалась. Полученная нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 40) после секвенирования (фиг. 13 (с)) анализировалась с помощью инструментов биоинформатики, таких как ClustalW, Traslate (ExPASy) и Chromas life.

Пример 8. Бактериальные штаммы-хозяева, использованные для клонирования и экспрессии гена гиалуронидазы из *S. koganeiensis*.

Штамм *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen, генотип: F- ϕ 801acZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA (обеспечивающий резистентность к бактериофагу T1)) [22], использовался в качестве хозяина для амплификации плазмид системы клонирования. Данный штамм был предоставлен компанией Invitrogen (единовременно, максимальная эффективность, DH5 α -T1R химически компетентной культуры *E. coli*, 12297-016). Клетки размораживались и культивировались в твердой среде агара Лурия-Бертани (10 г/л пептон из казеина, 5 г/л экстракт дрожжей, 10 г/л NaCl, 15 г/л бактериологический агар), содержащей 10 ммоль MgSO₄, и выращивались в течение 18 ч при 37°C. Из полученной культуры извлекалась одна колония, которая выращивалась в жидкой среде ТУМ (триптон 20 г/л, экстракт дрожжей 5 г/л, 20 мл 5 моль NaCl, 1 ммоль MgSO₄) при 37°C. Полученные клетки культуры химически обрабатывались для получения химически компетентных клеток. Далее полученные клетки разделялись на порции и хранились при -80°C в соответствующем буфере хранения, содержащем 15% глицерина. Трансформации выполнялись с данным набором аликвот.

B. subtilis WB800N (генотип: nprE aprE epr bpr mpr :: ble nprB :: bsr .vpr wprA :: hyg cm :: neo; NeoR [23]), предоставленный MOBITEC, это – грам-положительный бактериальный штамм, характеризующийся дефицитом восьми протеаз, в результате чего этот бактериальный штамм используется при производстве секретируемых гетерологических протеинов. В данный ген также был вставлен ген резистентности к неомицину с учетом номенклатуры WB800N. После соответствующего производства была обеспечена компетентность клеток данного бактериального штамма, их разделили

на порции и хранили при -80°C в соответствующем буфере хранения, содержащем 15% глицерина. Трансформации выполнялись с данным набором аликутов.

Штамм *Escherichia coli* MG1655 (ATCC номер: 12297-016, генотип: F-lambda- [24], [25]) использовался как хозяин в экспрессионной системе гена гиалуронидазы из *S. koganeiensis*. Бактериальный штамм предоставлен Американской коллекцией клеточных культур (ATCC). Лиофилизированные клетки сначала культивировались в нескольких мл жидкой среды, затем в твердой среде агара Лурия-Бертани (10 г/л пептон из казеина, 5 г/л экстракт дрожжей, 10 г/л NaCl), содержащей 10 ммоль MgSO_4 , и выращивались в течение 18 ч при 37°C . Из полученной культуры извлекалась одна колония, которая выращивалась в жидкой среде ТУМ при 37°C . Полученные клетки культуры химически обрабатывались для получения химически компетентных клеток. Далее полученные клетки разделялись на порции и хранились при -80°C в соответствующем буфере хранения, содержащем 15% глицерина. Трансформации выполнялись с данным набором аликутов.

Штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3) (*E. coli* BF-dcm ompT HSDS (rB - mB-) gal λ (DE3) [26, 27]) использовался в качестве хозяина для системы экспрессии гена, кодирующего гиалуронидазу, полученную из *S. koganeiensis*. Бактериальный штамм предоставлен компанией Novagen, код 69450-3. Клетки сначала культивировались в нескольких мл жидкой среды, затем в твердой среде агара Лурия-Бертани (10 г/л пептон из казеина, 5 г/л экстракт дрожжей, 10 г/л NaCl), содержащей 10 ммоль MgSO_4 , и выращивались в течение 18 ч при 37°C . Из полученной культуры извлекалась одна колония, которая выращивалась в жидкой среде ТУМ при 37°C . Полученные клетки культуры химически обрабатывались для получения химически компетентных клеток. Далее полученные клетки разделялись на порции и хранились при -80°C в соответствующем буфере хранения, содержащем 15% глицерина. Трансформации выполнялись с данным набором аликутов.

Пример 9. Трансформация плазмид pHTsk_HYAL, pHyal_sk и pHyal_sk_SL в клетках экспрессии.

Клетки DH5 α , соответственно, содержащие векторы pHTsk_HYAL, pHyal_sk и pHyal_sk_SL, были помещены в культуру, приблизительно в 6 мл среды Лурия-Бертани с ампициллином (50 мкг/мл) и выращивались в течение 16–18 ч. После выращивания полученных клеток, соответствующие культуры центрифугировались приблизительно при 5000g в течение 10 минут. Соответствующие плазмиды pHTsk_HYAL, pHyal_sk и pHyal_sk_SL были извлечены из полученного сгустка и очищены с помощью набора системы очистки ДНК Wizard Plus SV Minipreps (Promega). Очищенные векторы pHTsk_HYAL, pHyal_sk и pHyal_sk_SL отдельно трансформировались в клетках

экспрессии. Первый вектор трансформировался в компетентные клетки *Bacillus subtilis* (WB800N-MOBITEC), а остальные два вектора трансформировались в компетентные клетки *E. coli*, штамм BL21 (DE3) и/или MG1655. Все трансформации были произведены с помощью химической обработки [13]. После трансформации клетки *B. subtilis* и *E. coli*, соответственно, помещались в агар Лурия-Бертани, содержащий хлорамфеникол (10 мкмоль) плюс неомицин (10 мкмоль), а также в агар Лурия-Бертани, содержащий ампициллин (50 мкг/мл), для развития резистентности к антибиотику, и инкубировались при 37°C в течение 16 ч. Колонии, полученные после соответствующих трансформаций, были проанализированы для проверки наличия правильных плазмид внутри клеток экспрессии с помощью ПЦР (первоначальная денатурация при 94°C в течение 5 минут, 30 циклов отжига при 55°C в течение 30 секунд и удлинения при 72°C в течение 60 секунд, последующая денатурация при 94°C в течение 1 минуты) с использованием вектор-специфичных праймеров (а направлении вперед: 5'-TGTGGAATTGTGAGCGGATA-3' (SEQ ID NO: 30), в обратном направлении: 5'-TTTCAACCATTTGTTCCAGGT-3' (SEQ ID NO: 31)) для анализа успешной трансформации в *B. subtilis* и проверки успешной трансформации в *E. coli* (промотор T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO: 34), терминатор T7: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' (SEQ ID NO: 35)). Полученный продукт ПЦР для трансформированных клеток с pH_{Tsk}_HYAL (927 п.н.), pH_{yal}_sk (940 п.н.) и pH_{yal}_sk_SL (874 п.н.) был проанализирован электрофорезом в 1% агарозном геле с использованием эталонных стандартов молекулярной массы (ФХ174 DNA и λ DNA/HindIII производства Fermentas). Для анализа правильной рамки гена, кодирующего гиалуронидазу после связывания с вектором, последовательность продуктов ПЦР секвенировалась. Нуклеотидная последовательность, полученная после секвенирования, анализировалась с помощью инструментов биоинформатики, таких как Vector NTI Advance 9 (Invitrogen), ClustalW, Traslate (ExPASy) и Chromas life (фиг. 13 (a), (b), (c)).

Пример 10. Оценка уровня экспрессии рекомбинантной гиалуронидазы.

Клоны *B. subtilis*, положительные на присутствие векторов, содержащих нуклеотидный фрагмент гиалуронидазы, обнаруженный генетически с последовательностью рамки для правильной экспрессии (SEQ ID NO: 41), тестировались на уровень экспрессии, а затем произведенные таким образом клетки засеивались в пробирки, содержащие 500 мл среды Лурия-Бертани с хлорамфениколом (10 мкмоль, Sigma) и неомицином (10 мкмоль, Sigma), и инкубировались при 37°C на скорости 250 об/мин. Когда показатель роста клеток достигал показателя оптической плотности 0,8 при 600 нм, они с помощью ИПТГ (Sigma, 16758) доводились до окончательной

концентрации в 1 ммоль. После 12 часов индукции бактериальная культура центрифугировалась на скорости 7500 об/мин в течение 10 минут и супернатант культуры собирался для оценки экспрессии в *B. subtilis*.

Затем супернатант из проб на экспрессию в *B. subtilis* был сконцентрирован (в 20 раз) и подвергнут диализу в фосфатном буфере 1х с помощью ультрафильтрации с использованием специальных фильтров из полиэфирсульфона с границей пропускания 5 кДа.

При ДСН-ПААГ-электрофорезе экспрессированный рекомбинант имел молекулярную массу приблизительно 24 кДа с максимальной экспрессией после индукции 1 ммоль ИПТГ при показателе оптической плотности 0,8 при 600 нм через 12 часов при 37°C.

Экспрессия и локализация экспрессии гиалуронидазы в клетках *B. subtilis* (SEQ ID NO: 21) в различных проанализированных клонах определялись с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза (12%) после окрашивания кумасси бриллиантовым голубым G-250 (BIO-RAD, 161-0406) и соответствующего энзимного анализа, в частности, анализа Дорфмана.

Пример 11. Оценка уровня экспрессии рекомбинантной гиалуронидазы в *E. coli*.

Клоны *E. coli*, положительные в отношении присутствия соответствующих векторов, содержащих нуклеотидный фрагмент гиалуронидазы, обнаруженный генетически с последовательностью рамки (SEQ ID NO: 41) для правильной экспрессии (SEQ ID NO: 21), тестировались на уровень экспрессии, а затем засеивались в пробирки, содержащие 500 мл среды Лурия-Бертани с ампициллином (50 мкг/мл, Sigma) и инкубировались при 37°C на скорости 250 об/мин. Когда показатель роста клеток достигал показателя оптической плотности 0,8 при 600 нм, они с помощью ИПТГ (Sigma, 16758) доводились до окончательной концентрации в 1 ммоль. Бактериальные клетки отбирались через 3–4 часа после индукции путем центрифугирования на скорости 7500 об/мин в течение 10 минут. После центрифугирования бактериальный сгусток отбирался для оценки экспрессии полученных клеток *E. coli* и проверки, в какой части клетки производится рекомбинант.

Затем сгустки, полученные из клеток *E. coli*, индуцированных ИПТГ, были обработаны бактериальным протеином B-PER (PIERCE) в соответствии с предоставленными поставщиком инструкциями для оценки экспрессии гиалуронидазы в периплазматической и/или цитоплазмической части и/или формирования тел включения. Оба клона *E. coli*, соответственно, содержащие плазмиды pHyal_sk и pHyal_sk_SL, экспрессировали рекомбинант в растворимой форме в периплазматической части.

E. coli BL21 (DE3) с содержанием рHyal_sk. При ДСН-ПААГ-электрофорезе экспрессированный рекомбинант имел молекулярную массу приблизительно 24 кДа, составляя приблизительно 40% от общего количества бактериальных протеинов после индукции 1 ммоль ИПТГ в течение 3–4 часов при 37°C при показателе оптической плотности 0,8 при 600 нм. При этом из общего количества экспрессированного рекомбинанта всего 18% (7,2% в целом) присутствовало в растворимой форме в периплазме, а оставшиеся 82% содержали тела включения (32,8% в целом). Периплазматическая растворимая часть присутствовала в максимальной концентрации 52 мкг/мл культуры, с энзимной активностью, равной приблизительно 2100 ед/мл культуры.

E. coli BL21 (DE3) с содержанием рHyal_sk_SL. При ДСН-ПААГ-электрофорезе экспрессированный рекомбинант имел молекулярную массу приблизительно 24 кДа, составляя приблизительно 15% от общего количества бактериальных протеинов после индукции 1 ммоль ИПТГ в течение 3–4 часов при 37°C при показателе оптической плотности 0,8 при 600 нм. Более того, весь экспрессированный протеин присутствовал в растворимой форме в периплазме. Периплазматическая растворимая часть присутствовала в концентрации приблизительно 125 мкг/мл культуры, с энзимной активностью, превышающей 5000 ед/мл культуры.

Экспрессия и локализация экспрессии гиалуронидазы в клетках *E. coli* в различных проанализированных клонах определялись с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза (12%) после окрашивания кумасси бриллиантовым голубым G-250 (BIO-RAD, 161-0406) и соответствующего ферментного анализа, в частности, анализа Дорфмана.

Пример 12. Разработка Главного банка клеток и Рабочего банка клеток рекомбинантных штаммов

Главный банк клеток (ГБК).

В стерильных условиях одна колония была отобрана из колоний, принадлежащих штамму-продуценту, и ресуспензирована в стерильной пробирке, содержащей 10 мл жидкой среды (среда Лурия-Бертани с хлорамфениколом (10 мкмоль, Sigma) и неомицином (10 мкмоль, Sigma) для рекомбинантных клеток *B. subtilis* и среда Лурия-Бертани с ампициллином (50 мкг/мл, Sigma) для рекомбинантных клеток *E. coli*), а затем инкубирована на скорости 200 об/мин при 37°C в течение приблизительно 16 часов. После инкубационного периода и соответствующих проверок стерильности культуры, по 10 мл каждой культуры было, соответственно, перенесено в 100 мл жидкой среды (среда Лурия-Бертани с хлорамфениколом (10 мкмоль, Sigma) и неомицином (10 мкмоль, Sigma) для рекомбинантных клеток *B. subtilis* и среда Лурия-Бертани с ампициллином (50

мкг/мл, Sigma) для рекомбинантных клеток *E. coli*), а затем инкубировано на скорости 200 об/мин при 37 °С в течение 5-6 часов. После инкубационного периода и соответствующих проверок стерильности культуры некоторое количество холодного стерильного глицерина добавлялось к каждой культуре до достижения окончательной концентрации глицерина в 15%. Смесь размешивалась, и аликвоты объемом 2 мл вводились в криопробирки (CORNING, 430659), которые немедленно помещались в условия температуры –80°С.

Главный банк клеток формировался в стерильных условиях для следующих штаммов: *B. subtilis* (WB800N-MoBitec), содержащий плазмиду, полученную с помощью pHTsk_HYAL (клон 105), штамм *E. coli* (DH5α), содержащий плазмиду, полученную с помощью pHTsk_HYAL (клон 105), штамм *E. coli* (DH5α) и *E. coli* (BL21 (DE3)), содержащий плазмиду, полученную с помощью pHyal_sk (клон 413), штамм *E. coli* (DH5α) и *E. coli* (BL21 (DE3)), содержащий плазмиду, полученную с помощью pHyal_sk_SL (клон 225), и штамм *E. coli* (DH5α) и *E. coli* (BL21 (DE3)), содержащий плазмиду, полученную с помощью pRH_sk (клон 600).

Рабочий банк клеток (РБК).

В стерильных условиях была отобрана аликвота из пробирки из Главного банка клеток и протестирована в твердой среде Лурия-Бертани с хлорамфениколом (10мкмоль, Sigma) и неомицином (10 мкмоль, Sigma) для рекомбинантных клеток *B. subtilis* и в среде Лурия-Бертани с ампициллином (50 мкг/мл, Sigma) или канамицином (30 мкг/мл, Sigma) для рекомбинантных клеток *E. coli*, а затем инкубирована на скорости 200 об/мин при 37 °С в течение приблизительно 18 часов. Под стерильным колпаком одна колония была отобрана из колоний, принадлежащих штамму-продуценту, и ресуспензирована в стерильной пробирке, содержащей 10 мл среды (жидкая среда Лурия-Бертани с хлорамфениколом (10 мкмоль, Sigma) и неомицином (10 мкмоль, Sigma) для рекомбинантных клеток *B. subtilis* и жидкая среда Лурия-Бертани с ампициллином (50 мкг/мл, Sigma) или канамицином (30 мкг/мл, Sigma) для рекомбинантных клеток *E. coli*), а затем инкубирована на скорости 200 об/мин при 37°С в течение приблизительно 16 часов. После инкубационного периода и соответствующих проверок стерильности культуры, по 10 мл каждой культуры было перенесено в 100 мл жидкой среды (соответственно, среда Лурия-Бертани с хлорамфениколом (10 мкмоль, Sigma) и неомицином (10 мкмоль, Sigma) для рекомбинантных клеток *B. subtilis* и среда Лурия-Бертани с ампициллином (50 мкг/мл, Sigma) или канамицином (30 мкг/мл, Sigma) для рекомбинантных клеток *E. coli*), а затем инкубировано на скорости 200 об/мин при 37°С в

течение 5–6 часов. После инкубационного периода и соответствующих проверок стерильности культуры некоторое количество холодного стерильного глицерина добавлялось к каждой культуре до достижения окончательной концентрации глицерина в 15%. Смесь перемешивалась и аликвоты объемом 2 мл вводились в криопробирки (CORNING, 430659), которые немедленно помещались в условия температуры -80°C .

Рабочий банк клеток формировался в условиях максимальной стерильности для следующих штаммов: штамм *B. subtilis* (WB800N-MoBitec), содержащий плазмиду, полученную с помощью pHTsk_HYAL (клон гиалуронидазы 105), *E. coli* (BL21 (DE3)), содержащий плазмиду, полученную с помощью pHyal_sk (клон гиалуронидазы 413), штамм *E. coli* (BL21 (DE3)), содержащий плазмиду, полученную с помощью pHyal_sk_SL (clone rHyal_Sk), и штамм *E. coli* (BL21 (DE3)), содержащий плазмиду, полученную с помощью pRH_sk (клон rH_sk).

Следующие анализы выполнялись как с ГБК, так и с РБК для оценки их чистоты: оценка количества копий плазмиды из клеток ГБК и РБК, анализ плазмиды с помощью рестрикционных энзимов и отделения переваренных фрагментов с помощью агарозного геля 1%, оценка сохранности глицерина в клетках, содержащих экспрессионную плазмиду, в ГБК и РБК, оценка стабильности клеток, содержащих экспрессионную плазмиду, в ГБК и РБК, жизнеспособность рекомбинантных клеток в чашках со средой Лурия-Бертани, идентификация штаммов *E. coli*, чистота культуры, проба на бактериофаги *Coli*, оценка продукта экспрессии с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза, секвенирование участка, кодирующего рекомбинантный протеин.

Пример 13. Периодическая ферментация рекомбинантной гиалуронидазы.

Способность клонов *E. coli* BL21 (DE3) - pHyal_sk и BL21 (DE3) - pHyal_sk_SL производить рекомбинантную гиалуронидазу оценивалась выращиванием периодических культур в биореакторах.

Инокулят готовился путем засева в пробирку (из рабочего банка клеток, который хранился при -80°C) в 400 мл свежей культурной среды Лурия-Бертани (коэффициент 1/20 в отношении объема ферментации), содержащую 50 мкг/мл ампициллина, и инкубировался при 37°C на скорости 150 об/мин в течение 16–18 часов. Клоны соответствующих инокулятов (*E. coli* BL21 (DE3) - pHyal_sk и BL21 (DE3) - pHyal_sk_SL) раздельно выращивались в биореакторе в минимальной культурной среде со следующим составом на литр жидкости: 2г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2г KH_2PO_4 , 4г K_2HPO_4 , 3,8 г лимонной кислоты, 3,3 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 40 мл глицерина, 0,6 мл пеногасителя PPG 2000 (код Fluka 81380). Показатель pH был скорректирован после стерилизации при 121°C до 6,8 с помощью 25% раствора гидроксида аммония (SIGMA) и выполнена стерилизация

фильтрацией через фильтры 0,2 мкм после добавления следующих компонентов на литр среды: 0,49 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0147 г CaCl_2 , 1 мл FeCl_2 (0,2 моль), 2 мл микропримесей (микропримесей на литр: 0,96 г лимонной кислоты, 0,25 г $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,5 г $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,15 г $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,5 г H_3BO_3 , 0,25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,3 г $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,01 г тиамина, 5 г глюкозы, 3 г экстракта дрожжей.

Индукция изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) происходила через 4–6 часов после засева и продолжалась в течение 16–18 часов. Были разработаны следующие параметры ферментации: температура 37°C, перемешивание на скорости 600 об/мин, поток воздуха – 5–10 литров воздуха в минуту, давление на выходе приблизительно 0,8 бар.

Бактериальные клетки отбирались после периода индукции в течение приблизительно 16 часов путем центрифугирования на скорости 7500 об/мин в течение 25 минут. После отбора бактериальные клетки хранились при –80°C, готовые к использованию для экстракции и очистки рекомбинантной гиалуронидазы. Рекомбинантный протеин, экспрессированный *E. coli* при различных параметрах ферментации, анализировался с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза (12%) после окрашивания кумасси бриллиантовым голубым G-250 (BIO-RAD, 161-0406), а энзимная активность анализировалась с помощью турбидиметрического метода [16]. Клетки *E. coli* BL21 (DE3), трансформированные с помощью вектора pHyal_sk, для экспрессирования растворимого гетерологического протеина в периплазме индуцировались в биореакторе, содержащем 8 л среды. При ДСН-ПААГ-электрофорезе экспрессированный рекомбинант имел молекулярную массу приблизительно 24 кДа, а количество протеина, экспрессированного в периплазме клетки, составило приблизительно 0,1–0,15 г/л культуры, с максимальной экспрессией, наблюдаемой через 16 часов после индукции 1 ммоль ИПТГ при 37°C.

Клетки *E. coli* BL21 (DE3), трансформированные с помощью вектора pHyal_sk_SL, для экспрессирования растворимого гетерологического протеина в периплазме индуцировались в биореакторе, содержащем 8 л среды. Периплазматическая растворимая часть присутствовала в концентрации приблизительно 0,35–0,5 г/л культуры, с энзимной активностью, превышающей 15050–21495 ед/мл культуры. При ДСН-ПААГ-электрофорезе экспрессированный рекомбинант имел молекулярную массу приблизительно 24 кДа, составляя приблизительно 18% всех бактериальных протеинов, после индукции 1 ммоль ИПТГ на шестнадцатый час при 37°C.

Для обоих клонов стабильность плазмиды во время ферментации составила 100% (таблица 2). Стабильность плазмиды отслеживалась до окончания ферментации путем

скрининга с помощью метода чашечных отпечатков [29], который обеспечивает репликацию колоний в чашках, содержащих антибиотик.

Пример 14. Периодическая ферментация рекомбинантной гиалуронидазы с добавлением субстрата.

Способность клонов *E. coli* BL21 (DE3) - pHyal_sk и BL21 (DE3) - pHyal_sk_SL производить рекомбинантную гиалуронидазу оценивалась выращиванием в биореакторах культур с подпиткой.

Инокулят готовился путем засева в пробирку (из рабочего банка клеток, который хранился при -80°C) в 500 мл свежей культурной среды Лурия-Бертани (коэффициент 1/20 в отношении объема ферментации), содержащую 50 мкг/мл ампициллина, и инкубировался при 37°C на скорости 150 об/мин в течение 16–18 часов. Клоны соответствующих инокулятов (*E. coli* BL21 (DE3) - pHyal_sk и BL21 (DE3) - pHyal_sk_SL) раздельно выращивались в биореакторе в минимальной культурной среде со следующим составом на литр жидкости: 2 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 г KH_2PO_4 , 4 г K_2HPO_4 , 3,8 г лимонной кислоты, 3,3 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,6 мл пеногасителя PPG 2000 (код Fluka 81380). Показатель pH был скорректирован после стерилизации при 121°C до 6,8 с помощью 25% раствора гидроксида аммония (SIGMA) и выполнена стерилизация фильтрацией через фильтры 0,2 мкм после добавления следующих компонентов на литр среды: 0,49 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0147 г CaCl_2 , 1 мл FeCl_2 (0,2 моль), 2 мл микропримесей (микропримеси на литр: 0,96 г лимонной кислоты, 0,25 г $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,5 г $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,15 г $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,5 г H_3BO_3 , 0,25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,3 г $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,01 г тиамина, 5 г глюкозы, 3 г экстракта дрожжей.

Раствор глицерина (приблизительно 1,2 кг на 10 л ферментации), стерилизованный в автоклаве, был использован в качестве питательной среды, а затем следующие компоненты, предварительно профильтрованные через фильтры 0,2 мкм, добавлялись на один литр питательной среды: 2 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 г KH_2PO_4 , 5,4 г K_2HPO_4 , 3,8 г лимонной кислоты, 4 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 9 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,047 г CaCl_2 , 1 мл FeCl_2 (раствор 0,2 моль), 2 мл микроэлементов (микроэлементы на литр: 0,96 г лимонной кислоты, 0,25 г $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,5 г $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,15 г $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,5 г H_3BO_3 , 0,25 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,3 г $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,01 г тиамина. Питательная среда добавлялась через 6 часов после засева до девятнадцатого часа, с экспоненциальным коэффициентом добавления. Использование глицерина в качестве источника углерода выбрано из-за того, что используемые клетки экспрессии *E. coli* производят уксусную кислоту (ацетат) как нежелательный побочный продукт, который оказывает значительное негативное воздействие на выработку рекомбинантных протеинов [14]. В частности, клетки *E. coli*

вырабатывают уксусную кислоту как внеклеточный побочный продукт аэробной ферментации и скорость формирования ацетата напрямую связана со скоростью, с которой растут клетки или со скоростью, с которой они поглощают твердый субстрат – глюкозу – как источник углерода. В обычных системах ферментации с добавлением субстрата, скорость роста культуры определяется скоростью подачи ограничивающего вещества – глюкозы – что приводит к росту клеток выше порога, приводящего к последующему производству ацетата и, таким образом, к снижению экспрессии рекомбинантных протеинов.

В настоящем изобретении были разработаны различные стратегии для ограничения накопления ацетата с целью снижения его негативного влияния и повышения выработки рекомбинантного протеина. Стратегия, позволившая получить прекрасные результаты, заключалась в использовании глицерина в качестве источника углерода. В отличие от глюкозы, глицерин не ферментируется в уксусную кислоту. Полученные результаты показали, что использование глицерина вместо глюкозы в процессе ферментации с добавлением субстрата, согласно настоящему изобретению, повысило выход растворимого рекомбинантного протеина гиалуронидазы в 2–3 раза [15]. Более того, в отличие от глюкозы, которая оказывает ингибирующее действие на промотор, регулирующий синтез рекомбинантного протеина по настоящему изобретению, глицерин может быть подвергнут ферментации уже после индукции ИПТГ, что обеспечивает не только снижение выработки ацетата, но также повышение количества растворимой рекомбинантной гиалуронидазы. Кроме того, низкая стоимость глицерина по сравнению с глюкозой делает его более предпочтительным источником углерода для ферментации *E. coli* в промышленной сфере.

После индукции конечного раствора изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) в количестве 1 ммоль, питательный раствор добавлялся к культуре в течение 5 часов ежечасно в том же количестве, что и последняя добавка. Индукция началась через 24 часа после засева и продолжалась в течение 12 часов. Были разработаны следующие параметры ферментации: температура 37°C, перемешивание на скорости 600 об/мин, поток воздуха 5–10 литров воздуха в минуту, давление на выходе приблизительно 0,8 бар.

Бактериальные клетки отбирались после периода индукции в течение 12 часов путем центрифугирования на скорости 7500 об/мин в течение 25 минут. После отбора бактериальные клетки хранились при –80°C, готовые к использованию для экстракции и очистки рекомбинантной гиалуронидазы. Рекомбинантный протеин, экспрессированный *E. coli* при различных параметрах ферментации, анализировался с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза (12%) после окрашивания кумасси бриллиантовым голубым G-250 (ВЮ-

RAD, 161-0406), а энзимная активность анализировалась с помощью турбидиметрического метода [16].

Клетки *E. coli* BL21 (DE3), трансформированные с помощью вектора pHyal_sk, для экспрессирования растворимого гетерологического протеина в периплазме индуцировались в биореакторе, содержащем 10 л среды. При ДСН-ПААГ-электрофорезе экспрессированный рекомбинант имел молекулярную массу приблизительно 24 кДа, а количество протеина, экспрессированного в периплазме клетки, составило приблизительно 0,4 г/л культуры, с максимальной экспрессией, достигаемой через 6 часов после индукции 1 ммоль ИПТГ при 37°C (фиг. 14).

Клетки *E. coli* BL21 (DE3), трансформированные с помощью вектора pHyal_sk_SL, индуцировались для экспрессирования растворимого гетерологического протеина в периплазме, в биореакторе, содержащем 10 л среды. Периплазматическая растворимая часть присутствовала в концентрации приблизительно 1,2 г/л культуры, с энзимной активностью, превышающей 48000 ед/мл культуры. При ДСН-ПААГ-электрофорезе экспрессированный рекомбинант имел молекулярную массу приблизительно 24 кДа, составляя приблизительно 16–18% всех бактериальных протеинов, после индукции 1 ммоль ИПТГ на двенадцатый час при 37°C (фиг. 15).

Пример 15. Периодическая ферментация с добавлением субстрата *E. coli* BL21 (DE3), трансформированного с помощью вектора pHyal_sk_SL, в 20 л среды.

Вкратце, клетки *E. coli* BL21 (DE3), трансформированные с помощью вектора pHyal_sk_SL, для экспрессирования растворимого гетерологического протеина в периплазме индуцировались в биореакторе, содержащем 20 л среды. Периплазматическая растворимая часть была обнаружена в концентрации приблизительно 2 г/л культуры (таблица 2) с энзимной активностью, превышающей 87000 ед/мл культуры ($7,5 \times 10^7$ – $8,7 \times 10^7$ МЕ/л культуры), что приблизительно в 670–750 раз выше по сравнению с аутологической гиалуронидазой, произведенной в биореакторе как описано в упомянутом выше патенте [9]. При ДСН-ПААГ-электрофорезе экспрессированный рекомбинант имел молекулярную массу приблизительно 24 кДа, составляя приблизительно 16–18% всех бактериальных протеинов, после индукции 1 ммоль ИПТГ на двенадцатый час при 37°C.

Для всех клонов, проверенных методом с добавлением субстрата, стабильность плазмиды во время ферментации составила 100% (таблица 2). Стабильность плазмиды отслеживалась до окончания ферментации путем скрининга с применением метода чашечных отпечатков [29], который обеспечивает репликацию колоний в чашках, содержащих антибиотик.

В конечном итоге, клоны, созданные иными методами генной инженерии, были проверены на способность производить в биореакторе рекомбинантную гиалуронидазу, закодированную геном, изолированным в соответствии с настоящим изобретением. Результаты кратко изложены в таблице 1.

Пример 16. Анализ активности рекомбинантной гиалуронидазы в ферментативном бульоне

Сгусток был получен из 0,1 мл культуры при определенном времени индукции или из конечного продукта, после центрифугирования на скорости 7500 об/мин (центрифуга Eppendorf 5402, ротор F-45-18-11) в течение 10 минут. Клеточный сгусток был ресуспендирован в 500 мкл реагента экстракции бактериального протеина B-PER (PIERCE) и перемешан с помощью вортекса (Heidolph Reax top) на максимальной скорости в течение приблизительно 1 минуты или до полного ресуспендирования массы. Должным образом ресуспендированный сгусток центрифугировался на скорости 13000 об/мин в течение 10 минут для отделения растворимых протеинов от нерастворимых. Собранный супернатант (растворимые протеины) был проанализирован на присутствие активности гиалуронидазы с помощью турбидиметрического метода, описанного Ди Ферранте [16], модифицированного для анализа на планшете с 96 лунками. Для одной лунки была изготовлена следующая субстанция: 31 мкл инкубационного буфера [17], 8 мкл БСА (0,2 мг/мл), 8 мкл гиалуроновой кислоты (2 мг/мл), 13 мкл H₂O и 10 мкл супернатанта (растворимые протеины), разведенные в 10, 100 и 1000 раз с помощью 1х ФСБ (Sigma-P4417). Планшет инкубировался при 37°C в течение часа. Через час инкубации в каждую лунку было добавлено 200 мкл щелочного раствора ЦТАБ (2,5% (масса/объем) в 0,5 моль NaOH) для осаждения непереваренной гиалуроновой кислоты, и планшет инкубировался в течение 20 минут при комнатной температуре. Степень осаждения измерялась по оптической плотности при 640 нм.

Затем измерялась активность на мл рекомбинантного протеина в культурной жидкости с помощью следующих расчетов: активность одного мл, полученного в результате анализа / $2 \times$ коэффициент разведения $\times 10$ = активность на мл продукта, полученного в результате ферментации.

Стандарт гиалуронидазы (FIP) использовался для построения стандартной кривой, с помощью которой рассчитывалась активность рекомбинантной гиалуронидазы в периплазматической части.

Пример 17. Масштабная экстракция растворимой части.

Из сгустка, хранящегося при -80°C (сформированного в результате ферментации *E. coli* BL21 (DE3), трансформированного вектором pHyal_sk_SL), было взято

количество, эквивалентное 0,6 литрам продукта ферментации (приблизительно эквивалентно диапазону в 80–90 г сгустков клеток, отражающих выработку приблизительно 1–1,2 г/л рекомбинантной гиалуронидазы), для балансировки в течение 45 минут при комнатной температуре.

Первый способ: после балансировки сгусток обработали 210 мл свежего раствора (5°C) для дисперсии сгустка (205,2 г/л глюкозы, 5,6 г/л ЭДТК). Сгусток ресуспендировали дисперсионным раствором с помощью магнитного перемешивания в течение 15 минут при комнатной температуре и в дальнейшем в течение приблизительно 1 часа при 5°C с использованием магнитной мешалки Heidolph type MR2002 на скорости 500 об/мин. После приблизительно 1 часа ресуспендированный сгусток в холодном виде добавили в 4,5л раствора для осмотического удара (1,2 г/л Tris, 4 мл/л HC_1_2N , 0,1 г/л MgCl_2) для экстракции периплазматического протеина. Полученная смесь перемешивалась в течение 4 часов при 4°C с использованием магнитной мешалки Heidolph type MR2002 на скорости 500 об/мин.

После этапа осмотического удара полученный продукт с содержанием диспергированных клеток *E. coli* центрифугировался при 5°C в течение 45 минут на скорости приблизительно 7500 об/мин с помощью центрифуги Sorval Evolution Rc с ротором SLC-6000. После центрифугирования супернатант собрали, а сгусток удалили. На этом этапе супернатант гомогенизировали с помощью системы «Ultra Turrax» на скорости 2 в течение 15 секунд.

После обработки системой «Ultra Turrax» супернатант доводился до pH 8 и фильтровался гравитационным способом с помощью фильтров 0,65 мкм. После фильтрации концентрация триметамола (Tris) в фильтрате доводилась с 10 ммоль до 50 ммоль раствором Tris-HCl (3M), и показатель pH доводился до 8. Концентрация экстрагированной гиалуронидазы оценивалась ДСН-ПААГ-электрофорезом и составила приблизительно 750–850 мг (22–24% от общего количества периплазматических протеинов). Активность экстрагированной рекомбинантной гиалуронидазы оценивалась с помощью турбидиметрического метода Дорфмана.

Второй способ: после балансировки сгусток обрабатывался 500 мл раствора реагента экстракции бактериального протеина B-PER (PIERCE) для сброса периплазматических протеинов в среду. Сгусток ресуспендировался раствором B-PER с помощью магнитного перемешивания в течение 30 минут при комнатной температуре и в дальнейшем в течение приблизительно 30 минут при 5°C с использованием магнитной мешалки Heidolph type MR2002 на скорости 1000 об/мин. Приблизительно через час ресуспендированный сгусток центрифугировался при 5°C в течение 45 минут на скорости

приблизительно 11000 об/мин с помощью центрифуги Sorval Rc-5B с ротором Sorvall. После центрифугирования полученный супернатант в холодном виде добавлялся в 5 л раствора 50 ммоль Tris-HCl, pH 8. Полученный раствор перемешивался в течение 10 минут при 4°C с использованием магнитной мешалки Heidolph type MR2002 на скорости 200 об/мин. После перемешивания раствор гомогенизировался с помощью системы «Ultra Turrax» на скорости 2 в течение 15 секунд. После обработки системой «Ultra Turrax» супернатант доводился до pH 8 и фильтровался гравитационным способом с помощью фильтров 0,65 мкм. Концентрация экстрагированной гиалуронидазы оценивалась ДСН-ПААГ-электрофорезом и составила приблизительно 0,9–1,1 г на все количество (16–18% от общего количества периплазматических протеинов). Активность экстрагированной рекомбинантной гиалуронидазы оценивалась с помощью турбидиметрического метода Дорфмана.

Пример 18. Рекомбинантная очистка.

Смолы и хроматографические колонки были закуплены у GE Healthcare Life Sciences, их техническое обслуживание осуществлялось в соответствии со спецификациями производителя. Этапы балансировки и элюирования выполнялись с помощью системы жидкостной быстрой хроматографии (ЖХБР; АКТА explorer 100, GE Healthcare) при скорости потока 40–50 мл/мин на протяжении всех 3 хроматографий. По окончании каждого этапа хроматографии активность гиалуронидазы контролировалась с помощью описанного модифицированного метода Дорфмана [9]. После извлечения растворимой фракции из периплазматической части она загружалась в емкость для первой сильной ионообменной хроматографии.

Сильная ионообменная хроматография (Q-Sepharose® XL).

Отфильтрованный экстракт, доведенный до 50 ммоль Tris-HCl и pH 8, был загружен в 500–600 мл смолы Q-sepharose® XL (GE Healthcare) в колонке XK-50 (GE Healthcare) и сбалансирован 8 объемами слоя (ОС) буфера Tris-HCl при pH 8. После загрузки колонку промыли, сначала тремя ОС того же буфера, затем восемью ОС буфера Tris-HCl при pH 8 с 40 ммоль NaCl, а затем связанные протеины были элюированы 5 ОС раствора буфера Tris-HCl при pH 8 с 110 ммоль NaCl. Элюированные протеины были собраны в отдельную фракцию объемом приблизительно 950 мл и затем подвергнуты анализу на активность гиалуронидазы.

Диафильтрация и слабая ионообменная хроматография (CM-Sepharose® Fast Flow).

Полученная фракция подвергалась концентрации до 100 мл с помощью системы для тангенциальной ультрафильтрации Labscale TFF System (Millipore) и фильтров из полиэфирсульфона (ПЭС) с границей пропускания в промежутке между 3 и 8 кДа,

предпочтительно 5 кДа. После концентрации образец десятикратно разводился в 50 ммоль буферного раствора ацетата натрия при pH 4. Полученная таким образом фракция была загружена в 300–400 мл смолы CM-Sepharose® Fast Flow (GE Healthcare) в колонке XK-50 (GE Healthcare) и сбалансирована 6 объемами слоя (ОС) 50 ммоль буфера ацетата натрия при pH 4,0. После загрузки (предпочтительно при температуре 4–5°C) колонку промыли тремя ОС того же буфера, а затем связанные протеины были элюированы восемью ОС 50 ммоль буфера ацетата натрия при pH 4,5. Элюированные протеины были собраны в отдельную фракцию объемом приблизительно 380 мл, а затем подвергнуты анализу на активность гиалуронидазы.

Диафильтрация и ароматическая гидрофобная хроматография (Phenyl-Sepharose® HP).

Полученная фракция, положительная к энзимной дозировке, подвергалась концентрации до 100 мл с помощью системы для тангенциальной ультрафильтрации Labscale TFF System (Millipore) и фильтров из полиэфирсульфона (ПЭС) с границей пропускания в промежутке между 3 и 8 кДа, предпочтительно 5 кДа. После концентрации образец десятикратно разводился в 50 ммоль буфера фосфата натрия и 1,5 моль сульфата аммония при pH 7. Полученная таким образом фракция была загружена в 300–400 мл смолы Phenyl-Sepharose® HP (GE Healthcare) в колонке XK-50 (GE Healthcare) и сбалансирована 8 объемами слоя (ОС) 50 ммоль буфера фосфата натрия и 1,5 моль сульфата аммония при pH 7. После загрузки колонку промыли тремя ОС того же буфера, а затем связанные протеины были элюированы пятью ОС 50 ммоль буфера фосфата натрия и 0,8 моль сульфата аммония при pH 7. Элюированные протеины были собраны в отдельную фракцию объемом приблизительно 730 мл, а затем подвергнуты анализу на активность гиалуронидазы. После анализа энзимной активности элюируемая фракция была подвергнута ультрафильтрации и диализу 10 объемами фосфатно-солевого буфера 1x (Sigma-P4417) с помощью фильтров из полиэфирсульфона (ПЭС) с границей пропускания в промежутке между 3 и 8 кДа, предпочтительно 5 кДа, доведена до концентрации приблизительно 1 мг/мл и профильтрована с помощью фильтров 0,2 мкм (концентрация протеина определялась с помощью набора реагентов для количественного определения белка (PIERCE). Во время этапов очистки для получения достаточного объема очищенного продукта на выходе рекомбинантная порция загружалась в хроматографические колонки с максимальной дозировкой 1,5 мг гиалуронидазы на мл смолы. Все элюированные фракции протеина, как энзимно-активные, так и неактивные или со слабой активностью, были проанализированы с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза 12%, а затем окрашены серебрянкой в соответствии с инструкциями

производителя; во всех фракциях с активностью гиалуронидазы наблюдалась ярко выраженная полоса протеина, соответствующая приблизительно 24 кДа (фиг. 16). На различных этапах очистки концентрация протеина рекомбинантной части оценивалась, как описано ранее, путем ДСН-ПААГ-электрофореза (12%) и общее количество составило 0,45–0,5 г/л при первой хроматографии (Q-sepharose® XL), 0,45–0,50 г/л при второй хроматографии (CM-Sepharose® Fast Flow), 0,4–0,45 г/л при третьей хроматографии (Phenyl-Sepharose® HP) и в конечном итоге 0,35–0,4 г/л после диафильтрации. По окончании процесса очистки, которому подвергся приблизительно 1 л ферментированного продукта, было получено приблизительно 600–650 мг рекомбинантной гиалуронидазы с энзимной активностью, превышающей $2,6 \times 10^7$ ед/л очищенного продукта, подвергнувшегося ферментации (таблица 3).

Пример 19. Анализ и характеристика.

Определение активности гиалуронидазы.

Активность гиалуронидазы измерялась с помощью модифицированного метода Дорфмана [10]. Вкратце, продукт, полученный на различных этапах процесса, разводился в 0,03 моль фосфатного буфера, 0,82% NaCl, pH 6,3, и 1 мл полученного таким образом раствора смешивался с 1 мл субстратного буфера (0,03 моль фосфатного буфера, NaCl 10,82%, pH 6,3), содержащего 0,5 мг гиалуроновой кислоты. Энзимное переваривание было проведено при 37°C в течение 30 минут в конце инкубационного процесса, а помутнение обеспечивалось добавлением 4 мл кислого раствора на основе лошадиной сыворотки (SIGMA). Оптическая плотность при 640 нм измерялась ровно через 30 минут после добавления кислого раствора на основе лошадиной сыворотки. Стандарт гиалуронидазы из тестикул млекопитающих (EDQM, гиалуронидаза FIP, H1115000), содержащий 328 ME/мг, использовался для построения стандартной кривой, с помощью которой рассчитывалась активность образцов (в единицах).

ДСН-ПААГ-электрофорез.

Электрофоретические анализы на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) проводились с помощью метода Лэмли [11] в 12% полиакриламидном геле с использованием Mini-PROTEAN 3 (BIO-RAD) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрация и молекулярная масса гиалуронидазы в продукте ферментации и на различных этапах очистки оценивались сравнением со стандартными протеинами с низкой молекулярной массой (GE Healthcare).

Изображение полиакриламидных гелей, окрашенных кумасси (BIO-RAD) после электрофореза, было получено с помощью лабораторного устройства захвата изображений ImageQuant 300 TL (GE Healthcare), а анализы (количественные и

качественные) производились с помощью программного обеспечения для анализа изображений ImageQuant TL (GE Healthcare).

Секвенирование N-терминальной части.

Секвенирование N-терминальной последовательности аминокислот было проведено в соответствии с методом Эдмана с помощью автоматического секвенатора протеина в импульсной жидкой фазе (ABI-Perkin Elmer Mod. 477A). Программное обеспечение BLAST [18] использовалось для проведения гомологического исследования в базе данных GenBank и в базе данных видов *Streptomyces* Проекта человеческого генома, доступных в Интернете. Фракции, полученные путем очистки штамма *E. coli*, трансформированного с помощью вектора pHyal_sk, а также штамма *E. coli*, трансформированного с помощью вектора pHyal_sk_SL в соответствии с изобретением, были подвергнуты ДСН-ПААГ-электрофорезу в 12% геле, как описано выше, а затем блоттингу на мембране из поливинилиденфторида (BIO-RAD) и окрашены в соответствии с инструкциями производителя. Полоса, связанная с гиалуронидазой, для обоих способов производства была отделена скальпелем для получения как можно меньшего участка (3 мм × 10 мм) и была загружена в реактивную камеру секвенатора.

Секвенирование N-терминального участка, проведенное как описано выше, позволило определить, что две рекомбинантные гиалуронидазы, полученные из двух различных систем генной инженерии и экспрессии, имеют различия в N-терминальной аминокислотной последовательности. В случае образца *E. coli*, трансформированного с помощью вектора pHyal_sk_SL в соответствии с изобретением, в рамках анализа были получены хроматограммы, в которых была заметно представлена единственная N-терминальная аминокислотная последовательность, позволяющая реконструировать последовательность, описанную далее в анализе: AGENGA (SEQ ID NO: 42). Вышеупомянутая экспериментально определенная последовательность соответствует N-терминальной части протеина, изолированного в аутологической форме, описанной в [9], свободной от метионина в позиции 1.

В случае образца *E. coli*, трансформированного с помощью вектора pHyal_sk в соответствии с изобретением, анализ выявил наличие, по меньшей мере, двух N-терминальных аминокислотных последовательностей; далее приведена расшифровка N-терминальных аминокислотных последовательностей, определенных путем секвенирования. Наиболее заметная последовательность MAGENGA (SEQ ID NO: 43) соответствует N-терминальной части зрелого протеина с метионином в позиции 1, а менее заметная последовательность AQPAMAMAGENGA (SEQ ID NO: 44) соответствует частично зрелому протеину (содержит последовательность AQPAMAM (SEQ ID NO: 45),

принадлежащему сигнальному пептиду, который, судя по всему, не полностью лишен протеина клеточной системой).

Сравнение активности гиалуронидазы в гетерологической и аутологической форме.

Энзимный потенциал гиалуронидазы, произведенной согласно изобретению (*E. coli*, трансформированная с помощью вектора pHyal_sk_SL) оценивался путем сравнения энзимной активности аутологической гиалуронидазы [9] с помощью описанного энзимного анализа [9], и показатель активности в обоих случаях превышал 4×10^4 ME/мг протеина (концентрация протеина определялась с помощью набора реагентов для количественного определения белка, PIERCE).

Результат данного анализа показывает, что гиалуронидаза, полученная в соответствии с настоящим изобретением, в частности, форма, полученная из штамма *E. coli* путем генной инженерии с использованием плазмиды pHyal_sk_SL, имеет ту же активность, что и аутологическая форма. При этом с помощью способов производства и очистки, описанных в изобретении, стало возможным точно оценить значение энзимной активности рекомбинантной гиалуронидазы согласно изобретению, которое превысило 40000 ед/мг протеина.

Анализ спектра УФ и сравнение спектров кругового дихроизма гетерологической и аутологической форм.

Эксперименты с круговым дихроизмом (КД).

Спектры дальнего УФ-излучения при круговом дихроизме оценивались при комнатной температуре с помощью спектрополяриметра Jasco J-715 с кварцевой кюветой, имеющей длину оптического пути 1 миллиметр. Другие параметры теста: скорость сканирования 10 нм/мин, чувствительность 50 MDEG, временная константа 16 с, ширина спектра 3 нм. Измерения кругового дихроизма были проведены на растворах протеина (аутологическая гиалуронидаза, рекомбинантная гиалуронидаза по изобретению) в концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ моль. Все образцы разводились в окончательной концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ моль с помощью ультраочищенной воды. Спектры КД считывались при 260–195 нм и были проверены контрольной пробой и скорректированы с учетом разведения.

Спектры кругового дихроизма показаны на фиг. 17. Соответствие наложенных графиков: нижняя линия соответствует аутологической гиалуронидазе [9], верхняя – гетерологической гиалуронидазе по изобретению. Оба спектра имеют сопоставимые профили, что подтверждает одинаковость структуры обоих образцов (фиг. 17 (а)). Небольшую разницу можно отнести на счет не абсолютного совпадения концентраций растворов.

УФ-спектр образца рекомбинантной гиалуронидазы не указывает на агрегирование. Из настоящего исследования можно вывести, что препарат, полученный в соответствии с изобретением, имеет вторичную структуру, очень похожую на аутологическую гиалуронидазу [9], и что протеин, произведенный в соответствии с настоящим изобретением, не склонен к агрегированию (фиг. 17 (b)).

Масс-спектрометрия.

Масс-спектрометрические анализы для определения молекулярной массы проводились с помощью микро-масс-спектрометра Quattro (Waters), а пептидное картирование для подтверждения идентичности первичной структуры рекомбинантного участка производилось с помощью точных значений массы пептидов, определяемых с помощью системы MALDI-MS Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, Фирмингам, Массачусетс, США) после сепарации в обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Фракция, полученная после очистки рекомбинантной гиалуронидазы в соответствии с изобретением, была подвергнута перевариванию трипсином и после отделения в обращенно-фазовой ВЭЖХ смесь пептидов, произведенная для каждого образца, была проанализирована с помощью MALDI-MS в режиме рефлектора. Исследование и интерпретация полученных спектров MALDI позволили подтвердить, соответственно, 97% идентичность первичной структуры контрольной аминокислотной последовательности [9] и более чем 94% идентичность первичной структуры теоретической аминокислотной последовательности в соответствии с изобретением (последовательность пептидов, предсказанная с помощью <http://web.expasy.org/translate/>) аминокислотной последовательности образца, произведенного в соответствии с изобретением (SEQ ID NO: 21).

Кроме того, у фракции, полученной после очистки рекомбинантной гиалуронидазы в соответствии с изобретением, была определена молекулярная масса протеина с помощью масс-спектрометрии, результат анализа показан на фиг. 18.

Изоэлектрическое фокусирование.

Фракция протеина для анализа (рекомбинантная гиалуронидаза, полученная в соответствии с изобретением) перемешивалась в подходящем загрузочном буфере и загружалась на полоски IPG при pH 3–10 (ReadyStrips 7 см, BIO-RAD); инкубирование проводилось при 25°C до поглощения образца и полоска загружалась на клетку PROTEAN IEF Cell (BIO-RAD) для изоэлектрического фокусирования (ИЭФ). По окончании изоэлектрического фокусирования полоска окрашивалась раствором для окрашивания геля при ИЭФ (BIO-RAD) на 45 минут, затем краска удалялась с помощью обесцвечивающего раствора (BIO-RAD). После обесцвечивания изображение полосок

IPG было получено с помощью лабораторного устройства захвата изображений ImageQuant 300 TL (GE Healthcare), а анализы (количественные и качественные) производились с помощью программного обеспечения для анализа изображений ImageQuant TL (GE Healthcare).

Изоэлектрическая точка пробы определялась путем сравнения с изоэлектрическими точками стандартных контрольных проб (Маркер ИЭФ рН 3-10, SERVA). Результаты анализа показаны на фиг. 19.

Характеризация рекомбинантной гиалуронидазы с применением капиллярного электрофореза и определение молярного коэффициента экстинкции.

Количественный и качественный анализ исследуемой фракции протеина (рекомбинантной гиалуронидазы, полученной согласно изобретению) осуществлялся с помощью BIOTEKNET (Наполи, Италия) капиллярным электрофорезом с использованием инструмента P/ACE MDQ Beckman-Coulter, оснащенного детектором на диодной матрице и УФ-лампой, а также капилляра из плавленого кварца (50 см фактической длины, 60,2 см общей длины, внутренний диаметр 50 мкм) и 20 ммоль буфера натрия цитрата при рН 2,5, с применением электрофорезного осаждения при 25 кВ (что обеспечивает более высокую стабильность электрофоретического процесса отделения и используемого тока) в течение 15 мин и определением поглощения при 200 нм. Перед дальнейшим анализом образца БСА (альбумин бычьей сыворотки) был должным образом проанализирован в трех различных концентрациях (1 мг/мл; 0,8 мг/мл; 0,4 мг/мл) с помощью вышеупомянутого способа, что позволило получить прямую линию калибровки. Анализ проводился на том же образце, разведенном в два раза (фиг. 20). В обеих электрофореграммах можно определить присутствие одного пика (чистота 100%) с временем миграции $7,7 \pm 0,9$ мин, а количественное определение протеина, хотя и зависит от калибровки внешним стандартом (БСА), то есть, другим протеином, показывает высокую чистоту и это количественное определение сопоставимо с ожидаемым результатом (приблизительно 1 мг/мл). Исследовательскую работу по определению коэффициента молярной экстинкции рекомбинантной гиалуронидазы можно разделить на четыре экспериментальных момента: 1) денситометрический анализ образцов гиалуронидазы по изобретению, 2) спектрофотометрический анализ образцов гиалуронидазы по изобретению, 3) определение теоретического поглощения, 4) определение коэффициента молярной экстинкции.

На этом этапе, после сбора информации с предыдущих этапов, был применен закон Бэра-Ламберта: $A = \epsilon l \times C$, где ϵ – молярный коэффициент поглощения, C – молярная концентрация раствора, l – оптический путь. На основе данной формулы и

полученной информации величина коэффициента молярного коэффициента поглощения при длине волны 280 нм была следующей: $12383 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$. Abs 0,1% (= 1 г/л) 0,570 (коэффициент молярной экстинкции гиалуронидазы, произведенной по настоящему изобретению).

ВЭЖХ способом гель-фильтрации.

Для анализов с помощью гель-фильтрации применялся инструмент ВЭЖХ LC-10AD (SHIMADZU) с колонкой Bio-Sil SEC (BIO-RAD), элюируемой 0,05 моль NaH_2PO_4 , 0,05 моль Na_2HPO_4 , 0,15 моль NaCl , pH 6,6, на скорости 1 мл/мин. Использовалась длина волны поглощения 214 нм (SPD-10A, SHIMADZU). Чистота протеина определялась с помощью программного обеспечения LC solution 1:21 SP1. Фракция, полученная после очистки рекомбинантной гиалуронидазы, полученной как описано в изобретении, подверглась гель-фильтрации с помощью колонки ВЭЖХ, как описано выше. Результат анализа на чистоту порции рекомбинанта приведен в виде хроматограммы на фиг. 21 (а) и составляет 100%.

Определение уровня чистоты с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Для анализа чистоты с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ применялся инструмент ВЭЖХ LC-10AD (SHIMADZU) с колонкой Vydac 214ATP54 C4 (Grace Davison Discovery Sciences), элюированной 50 ммоль Tris pH 7,5 с 1-пропанолом на скорости 0,5 мл/мин. Использовалась длина волны поглощения 220 нм (SPD-10A, SHIMADZU). Чистота протеина определялась с помощью программного обеспечения LC solution 1:21 SP1. Фракция, полученная после очистки рекомбинантной гиалуронидазы, произведенной, как описано в изобретении, подверглась обращенно-фазовой ВЭЖХ с помощью обращенной (гидрофобной) колонки, как описано выше. Результат анализа на чистоту порции рекомбинанта приведен в виде хроматограммы на фиг. 21 (b) и очень близок к 100%.

Характеризация бактериальной рекомбинантной гиалуронидазы с применением электрофореза на полиакриламидном геле.

Электрофоретические анализы на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ) проводились с помощью метода Лэмли [11] в 12% полиакриламидном геле с использованием Mini-PROTEAN 3 (BIO-RAD) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрация и молекулярная масса гиалуронидазы в продукте ферментации на различных этапах очистки оценивались сравнением со стандартными протеинами с низкой молекулярной массой (GE Healthcare).

Изображение полиакриламидных гелей, окрашенных кумасси (BIO-RAD) после электрофореза, было получено с помощью лабораторного устройства захвата

изображений ImageQuant 300 TL (GE Healthcare), а анализы (количественные и качественные) производились с помощью программного обеспечения для анализа изображений ImageQuant TL (GE Healthcare).

Для вестерн-блоттинга протеины были разделены на фракции ДСН-ПААГ-электрофорезом при 12% и перенесены на нитроцеллюлозные мембраны. Затем соответствующие протеины были идентифицированы с помощью инкубации с анти-гиалуронидазным антителом (Abnova), разведенным 1:2000 в 10% сухом молоке/ФСБ, в течение 12 часов и специфическая реакция была зафиксирована путем добавления на 1 час вторичных антител мыши анти-IgG, конъюгированных с щелочной фосфатазой, а затем обнаружения с использованием субстрата BCIP/NBT (BUF045A, SEROTEC).

Производство рекомбинантной гиалуронидазы в соответствии со способом по изобретению из полученных клеток *E. coli* BL21(DE3) и, таким образом, без использования животных компонентов, сделало возможным производство протеина с высокой специфической энзимной активностью (>40000 ед/мг протеина). Рекомбинантный протеин, произведенный в соответствии с изобретением, имел уровень чистоты, в 100 раз превышающий уровень стандарта гиалуронидазы, полученной из тестикул млекопитающих (EDQM, гиалуронидаза FIP, H1115000), как показано на фиг. 22. В то же время рекомбинантная гиалуронидаза, очищенная по изобретению, после миграции на 12% гель ДСН-ПААГ-электрофореза и окрашивания кумасси GelMate Blue (EuroClone) давала единственную полосу, а бычья гиалуронидаза, имеющаяся в наличии на рынке, содержала несколько примесей. Меньшая полоса (соответствующая приблизительно 75–80 кДа) в шмере при вестерн-блоттинге протеинов бычьей гиалуронидазы, прореагировавшей с анти-гиалуронидазным поликлональным антителом (Abnova), подтверждает, что энзимная гиалуронидаза – это меньший компонент препаратов гиалуронидазы животного происхождения (фиг. 22).

Определение эндотоксинов.

Реакция с лизатом амебоцитов мечехвоста (LAL тест), в которой используется реактив, изготовленный из крови мечехвоста, оказался наиболее чувствительным и специфичным тестом для определения и измерения уровня бактериальных эндотоксинов в сырье, используемом в производстве, а также для наблюдения за уровнями эндотоксинов в процессе производства. Эндотоксины, также известные как пирогены, приводят к различным последствиям, от жара до необратимого шока, от трудностей замены крови и тканей до летального исхода.

В случае рекомбинантной гиалуронидазы, произведенной согласно изобретению в клетках *E. coli*, было важно оценить уровень эндотоксинов в конечном продукте. Для

этого использовался метод «Chromo-LAL», кинетический хромогенный тест для количественного определения эндотоксинов, произведенных грам-отрицательными бактериями.

Вкратце, при проведении анализа «Chromo LAL (art 32427, PBI S.p.A, Италия)», лиофилизированный лизат и субстрат хромогенного реактива, подвергшийся одновременной холодной сушке, были смешаны с образцом гиалуронидазы (произведенной в соответствии с изобретением) в микропланшете с множеством лунок (96 лунки) и инкубированы при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в подходящем ридере (ELX 808 IU, BioTek). Полученные показатели поглощения были проанализированы специальным программным обеспечением. Было рассчитано время, необходимое для достижения образцом гиалуронидазы конкретного показателя поглощения (оптической плотности). Кроме того, была построена стандартная кривая калибровки (CSE, lot.104, art.17078, PBI S.p.A, Италия), демонстрирующая линейную зависимость между логарифмом «начального времени» и логарифмом стандартной концентрации эндотоксинов. Максимальный диапазон концентраций эндотоксинов стандартной кривой составляет 0,005–50 ед/мл. Чувствительность [19] теста определялась, начиная с самых низких концентраций эндотоксинов, используемых для построения стандартной кривой. Максимальная чувствительность данного теста составляет 0,005 ед/мл.

Концентрация эндотоксинов для соответствующего «начального времени» образца гиалуронидазы была определена на основе стандартной кривой, представляющей собой диаграмму в логарифмических осях, построенной на данных, полученных при подсчете «начального времени» в сравнении со стандартными концентрациями.

В конце оцененный показатель эндотоксинов в образце гиалуронидазы, полученной в соответствии с изобретением, был рассчитан с помощью программного обеспечения Gen5 (BioTek) и оказался очень низким, ниже 0,5 единиц эндотоксинов на миллиграмм рекомбинантной гиалуронидазы (таблица 4).

Определение протеинов и ДНК, полученных из клеток-хозяев.

Что касается определения протеинов, полученных из клеток-хозяев *E. coli*, используемых для гетерологической экспрессии рекомбинантной гиалуронидазы (согласно описанию в настоящем изобретении), использовался метод ИФА, в частности, набор для иммуно-ферментного анализа «E. coli НСР» производства Cygnus Technologies (F010). Метод основывается на чередующемся использовании аффинно-очищенных антител, введенных в смесь 6 штаммов *E. coli*, обычно используемых для клонирования и экспрессирования рекомбинантных протеинов.

Анализ выполнялся в соответствии с инструкциями производителя с использованием очищенного образца рекомбинантной гиалуронидазы, при этом концентрация протеинов, полученных из *E. coli* (штамм-хозяин), прямо пропорциональна интенсивности окраски в результате энзимной реакции щелочной фосфатазы, конъюгированной с антителом.

Концентрация протеинов, полученных из штаммов-хозяев, по сравнению со стандартными концентрациями (подсчеты и калибровка кривой выполнялись с помощью программного обеспечения GEN 5, BioTek) на образце гиалуронидазы, произведенном в соответствии с изобретением, оказалась ниже 10 млн^{-1} , как показано в таблице 4 (предел, утвержденный соответствующими организациями, ниже 100 млн^{-1}).

С другой стороны, определение количества ДНК, полученной из штамма-хозяина *E. coli*, производилось с использованием образца рекомбинантной гиалуронидазы (произведенной по изобретению) с помощью метода порога ДНК (DNA Threshold).

Данный анализ был проведен в лабораториях Charles River Biopharmaceutical Services GmbH, Германия. Исследования, помеченные кодом M1/F07/12 и M2/F07/12, в качестве окончательного результата показали очень низкий уровень ДНК, полученной из клетки-хозяина, в количестве менее 20 мкг (предел, утвержденный компетентными органами, ниже или равен 300 пг/мг протеина) на миллиграмм рекомбинантной гиалуронидазы (таблица 4).

Пример 20. Деполимеризация гиалуроновой кислоты на агарозном геле.

Для оценки *in vitro* свойств рекомбинантной гиалуронидазы, произведенной в соответствии с настоящим изобретением, по деполимеризации гиалуроновой кислоты (Hyalgan®; Fidia S.p.A., Италия) в ее первичных компонентах, N-ацетилглюкозамине и глюкуроновой кислоте, метод электрофоретического исследования в агарозном геле [20] использовался после переваривания гиалуроновой кислоты 1 единицей рекомбинантной гиалуронидазы в указанных временных пределах от 5 минут до 24 часов.

Вкратце, образцы гиалуроновой кислоты (500–730 кДа) после реакции с рекомбинантной гиалуронидазой в указанные временные промежутки (от 5 минут до 24 часов) были отделены с помощью системы электрофореза Sub-CellGT (BIO-RAD) и 1% агарозных гелей (длиной 25 см). Образцы были перенесены в электрофорез приблизительно на 12 часов при температуре приблизительно 16°C с постоянным напряжением 50 вольт. Окрашивание выполнялось согласно описанию в предыдущих исследованиях [20].

Результаты, представленные на фиг. 23, показали, что рекомбинантная гиалуронидаза, произведенная по изобретению, способна полностью переварить субстрат до достижения не определяемых уровней гиалуроновой кислоты до истечения 24 часов.

Пример 21. Стабильность в присутствии протеолитических энзимов.

Гиалуронидаза – это энзим, гидролизующий гиалуроновую кислоту, что усиливает проницаемость соединительной ткани и улучшает диффузию и дисперсию препарата, вводимого местно подкожно, в окружающих тканях.

При некоторых видах лечения гиалуронидаза вводится в малых дозах (обычно используется доза 15 единиц) для снижения вреда, причиненного утечкой антибиотиков, гиперосмотических растворов, кислотных или щелочных растворов, или для коррекции филлеров на основе гиалуроновой кислоты во избежание аллергических и анафилактических реакций. Таким образом, для гиалуронидазы очень важна стабильность в указанных дозировках в присутствии протеолитических энзимов, имеющихся в соединительной ткани, которые способны с легкостью подвергнуть гиалуронидазу разложению после введения, подавляя ее действие. Для тестирования резистентности рекомбинантной гиалуронидазы протеолитическим энзимам и сравнения ее с бычьей гиалуронидазой, используемой на рынке в настоящее время, была предоставлена турбидиметрическая модель для анализов *in vitro*. Вкратце, рекомбинантная гиалуронидаза (полученная согласно изобретению) в концентрации 10 единиц (<250 нг) и бычья гиалуронидаза, 100 единиц (300 мкг) были отдельно обработаны двумя различными дозами проназы Е (200 мкг и 500 мкг) в растворе фосфатного буфера (рН 7,0) при 37°C в течение 1 часа, 24 часов и 48 часов. Остаточная энзимная активность (выраженная в процентах) двух концентраций энзимов, обработанных и не обработанных проназой Е, измерялась в соответствии с методом Дорфмана согласно описанию, данному в патенте. Полученные результаты в виде диаграммы представлены на фиг. 24.

Пример 22. Воздействие человеческой и животной сыворотки на активность гиалуронидазы.

В настоящем изобретении, благодаря модели теста *in vitro* с помощью турбидиметрической модели, были подтверждены все предположения предыдущих клинических исследований, то есть, энзимная активность бычьей гиалуронидазы (бычья РН20) ингибируется человеческой и/или животной кровью, однако было обнаружено, что человеческая и/или животная кровь не ингибирует гиалуронидазу из рекомбинантного *S. koganeiensis* (фиг. 25). Метод, используемый в настоящем изобретении для оценки подавления активности гиалуронидазы (животной/человеческой) кровью, был ранее

описан Альбертом Дорфманом и др. в [21]. Вкратце, две концентрации рекомбинантной гиалуронидазы, произведенной в соответствии с настоящим изобретением (40 единиц, 400 единиц), а также бычьей гиалуронидазы (40 единиц, 400 единиц), были отдельно обработаны сывороткой, полученной из крови животных, и сывороткой, полученной из человеческой крови, в растворе сульфатного буфера (рН 7,0) в смеси с буфером-субстратом, содержащим 0,5 мг гиалуроновой кислоты. Полученная таким образом смесь помещалась в условия температуры 37°C на 30 минут, 1 час и 6 часов. Относительная энзимная активность этих двух концентраций энзимов, обработанных сыворотками, измерялась в конце каждого установленного интервала времени после обеспечения помутнения жидкости путем добавления 4 мл кислотного раствора на основе лошадиной сыворотки, и затем выполнения шагов по описанному ранее методу Дорфмана. Обеспечение помутнения из-за добавления сыворотки корректировалось контрольной пробой, содержащей все реактивы, за исключением гиалуронидазы.

Таким образом, последние исследования показывают, что рекомбинантная гиалуронидаза, произведенная в соответствии с изобретением, имеет высокую активность гиалуронидазы и высокую стабильность в присутствии протеолитических энзимов, способна с максимальной биодоступностью обеспечивать общую активность в кровотоке без риска бактериальных или вирусных инфекций, что также эффективно для лечения сердечнососудистых заболеваний и нарушений мозгового кровообращения.

Список литературы

- [1] L.H. Bookbinder, et al, Journal of Control Release. 2006 Aug 28; 114(2) : 230-41. Epub 2006 Jun 7.
- [2] Bratisl Lek Listy 2009; 110(1).
- [3] US 2008/0124316 A1.
- [4] Acta Med Scand. 1984 ; 216 (2) : 209-13.
- [5] Dorfman A, Ott ML, Whitney R: The hyaluronidase inhibitor of human blood. J Biol Chem 174: 621, 1948.
- [6] McClean D: The in-vivo decapsulation of streptococci by hyaluronidase. J Pathol Bacteriol 54: 284, 1942.
- [7] US 2011/0053247 A1.
- [8] US 4,258,134.
- [9] WO 2010/130810 A1.
- [10] Dorfman A. 1955.

- [11] Laemmli, U.K. 1970.
- [12] Sambrook J, Russel DW (2001).
- [13] Peter B. Kaufman, William Wu, Donghern Kim, Leland Cseke 1995; Sambrook and Russell (2001).
- [14] Sørensen, H.P. and Mortensen, K.K. (2005). Advanced strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. J. Biotechnol. 115, 113-128.
- [15] Luo, Q. et al. (2006) Optimization of culture on the overproduction of TRAIL in high-cell-density culture by recombinant *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 71, 184-191.
- [16] Di Ferrante 1956.
- [17] McIlvaine's buffer, McIlvaine 1921.
- [18] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.
- [19] Ebner, C., D.Kraft, F. Prasch, R. Steiner, and H. Ebner. Type 1 allergy induced by LYMULUS Amebocyte Lysate (LAL). Clinical and Experimental Allergy 22:417-419 (1992).
- [20] Lee, H. G., and Cowman, M. K. (1994) Anal. Biochem. 219, 278-287.
- [21] Albert DORFMAN, MELVIN L. OTT, e Richard WHITNEY, Febbraio 20, 1948.
- [22] Killmann, H., Benz, R., and Braun, V. (1996). Properties of the FhuA channel in the *Escherichia coli* outer membrane after deletion of FhuA portions within and outside the predicted gating loop. J Bacteriol 178, 6913-20.
- [23] The Bacillus subtilis centred wiki SubtiWiki: A community curated consensual annotation that is continuously updated. SubtiPathways is a model of *B. subtilis* metabolism and regulation in SBML/SBGN (Systems Biology Markup Language/ Graphical Notation).
- [24] Perkins JD, et al. XbaI and BlnI genomic cleavage maps of *Escherichia coli* K-12 strain MG1655 and comparative analysis of other strains. J. Mol. Biol. 232: 419-445, 1993.
- [25] Heath JD, et al. NotI genomic cleavage map of *Escherichia coli* K-12 strain MG1655. J. Bacteriol. 174 : 558-567, 1992.
- [26] Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [27] Weiner, M. P., Anderson, C. Jerpseth, B., Wells, S., Johnson-Browne, B. et al. (1994) Strategies 7(2) :41-43.
- [28] Altschul et al., 1997.
- [29] Lederberg, J and Lederberg, EM (1952) Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J Bacteriol. 63: 399-406.

P04568 PCTENGL_ST25_RU
ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Фидиа Фармасьютичи С.П.А. (ИТ)

<120> БАКТЕРИАЛЬНАЯ ГИАЛУРОНИДАЗА И СПОСОБ ЕЕ ПРОИЗВОДСТВА

<130> P04568

<160> 52

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 1

Ala Gly Glu Asn Gly Ala Thr Thr Thr Phe Asp Gly Pro Val Ala
1 5 10 15

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 2

Arg Phe Ser Ala Asp Thr Thr Ile Glu Ala Ala Phe Ile Lys Thr Thr
1 5 10 15

Ser Glu Thr Ile His Ala Ala Thr Ile Tyr Lys
20 25

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 3

Gly Tyr Ala Asp Gly Ser Asp Lys Asp Ala Ala Ala Leu Ser Leu Asp
1 5 10 15

Leu Arg

P04568 PCTENGL_ST25_RU

<210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 4

Ala Gln Val His Ile Val Gln Arg
 1 5

<210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 5

Ile Gly Asn Ala Ala Thr Val Pro Thr Ser Val Asp Ser Ser Gly Gly
 1 5 10 15

Gly

<210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 6

ggagaacggg gcgacgacga cgttcg 26

<210> 7
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 7

gtcggcaccg tcgccgcgtt cccgat 26

<210> 8
 <211> 546
 <212> DNA
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 8

gagaacgggg cgacgacgac gttcgacggc ccggtggccg ccgagagggt cagcgcggaс 60

P04568 PCTENGL_ST25_RU

accacactgg aggccgcctt cctcaagacg acctcggaga cgaaccacgc ggcgaccatc	120
taccaggccg gtacgtcggg cgacggcgcg gcgctgaacg tgatctccga caaccggggc	180
acctcggcca tgtacctctc cggcaccgag accgcgcgcg gcaccctgaa gatcacccac	240
cgcggggtacg ccgacggctc cgacaaggac gccgccgccc tgctcgctcga cctccgcgtg	300
gccggcaccg ccgcccaggg catctacgtc acggcgacga acggcccgac caagggaac	360
ctgatcgccc tgcgcaacaa cacgggcctg gacgacttcg tcgtcaaggg caccggccgc	420
atcggcgctcg gcatcgaccg cgcgggccacg ccccgcgccc aggtccacat cgtccagcgg	480
ggcgacgccc tcgccgcgct cctggtggag ggctcggtac gcatcgggaa cgccgcgacg	540
gtgccg	546

<210> 9
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 9	
cgggagaagg gtgaacgc	18

<210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 10	
ctccgcgacc agttcttcg	19

<210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 11	
ggcatctacg tcacggcgac gaac	24

<210> 12
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Streptomyces koganeiensis

P04568 PCTENGL_ST25_RU

<400> 12
cgtaccgcgc gtgggtgac ttcag 25

<210> 13
<211> 930
<212> DNA
<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 13
ggtacctgtg acggctacac cccgccccaa cctccgtaca accattcgga gttgatcgtt 60
gtcgttgtcc cgggggactc atgcgactca tgcgtccctc cgttcacagc agacacgaga 120
gagtggggga cgacgcatgc cgggtggcacg cagactgttt ctggggagct tcaccgcggg 180
cgcggtgacc gtggcgacgg ccgccgcgac gggtagggcc tcggcggccg gggagaacgg 240
cgcgacgacg accttcgacg gcccgggtggc cgccgagagg ttcagcgcg acaccacact 300
ggaggccgcc ttcctcaaga cgacctcgga gacgaaccac gcggcgacca tctaccaggc 360
cggtagctcg ggcgacggcg cggcgctgaa cgtgatctcc gacaaccgg gcacctcggc 420
catgtacctc tccggcaccg agaccgcgcg cggcaccttg aagatcacc accgcgggta 480
cgccgacggc tccgacaagg acgccgccgc cctgtcgctc gacctccgcg tggccggcac 540
cgccgcccag ggcatctacg tcacggcgac gaacggcccg accaaggga acctgatcgc 600
cctgcgcaac aacacgggccc tggacgactt cgctgtcaag ggcaccggcc gcatcggcgt 660
cggcatcgac cgcgcgggcca cgccccgcgc ccagggtccac atcgtccagc ggggcgacgc 720
cctcgccgcg ctctgtgtgg agggctcggg acgcatcggg aacgccgcga cggtagcgac 780
gtcgggtggac agctcgggcg gcggcgccct gtacgcgtcg ggcggcgccc tgctgtggcg 840
cggctccaac ggcacgggtca cgacgatcgc accggcgtga agtacaggag agaacagtgc 900
agttgacgcc cgaagaactg tttcgcgga 930

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 14
accattcgga gttgatcgtt g 21

P04568 PCTENGL_ST25_RU

<210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 15
 gtcaactgca ctgttctctc c 21

<210> 16
 <211> 867
 <212> DNA
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 16
 accattcgga gttgatcgtt gtcgttgtcc cgggggactc atgcgactca tgcgtccctc 60
 cgttcacagc agacacgaga gagtggggga cgacgcatgc cgggtggcacg cagactgttt 120
 ctggggagct tcaccgcggg cgcggtgacc gtggcgacgg ccgccgcgac gggtacggcc 180
 tcggcggccg gggagaacgg cgcgacgacg accttcgacg gcccgggtggc cgccgagagg 240
 ttcagcgcgg acaccacact ggaggccgcc ttcctcaaga cgacctcgga gacgaaccac 300
 gcggcgacca tctaccaggc cggtagctcg ggcgacggcg cggcgctgaa cgtgatctcc 360
 gacaaccggg gcacctcggc catgtacctc tccggcaccg agaccgcgcg cggcacccctg 420
 aagatcacc accgcgggta cgccgacggc tccgacaagg acgccgccgc cctgtcgctc 480
 gacctccgcg tggccggcac cgccgccag ggcattctacg tcacggcgac gaacggccccg 540
 accaagggca acctgatcgc cctgcgcaac aacacgggccc tggacgactt cgtcgtcaag 600
 ggcaaccggc gcatcggcgt cggcatcgac cgcgcggcca cgccccgcgc ccaggtccac 660
 atcgtccagc ggggcgacgc cctcgccgcg ctcttggtgg agggctcggg acgcatcggg 720
 aacgccgcga cggtagcgac gtcggtggac agctcgggcg gcggcgccct gtacgcgtcg 780
 ggcgggcccc tgctgtggcg cggctccaac ggcacgggtca cgacgatcgc accggcgtga 840
 agtacaggag agaacagtgc agttgac 867

<210> 17
 <211> 744
 <212> DNA
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 17

P04568 PCTENGL_ST25_RU

atgccggtgg cacgcagact gtttctgggg agcttcaccg cgggcgcggt gaccgtggcg 60
acggccgccg cgacgggtac ggcctcggcg gccggggaga acggcgcgac gacgaccttc 120
gacggcccgg tggccgccga gaggttcagc gcggacacca cactggaggc cgccttcctc 180
aagacgacct cggagacgaa ccacgcggcg accatctacc aggccggtac gtcgggcgac 240
ggcgcggcgc tgaacgtgat ctccgacaac ccgggcacct cgcccatgta cctctccggc 300
accgagaccg cgcgcggcac cctgaagatc acccaccgcg ggtacgccga cggctccgac 360
aaggacgccg ccgccctgtc gctcgacctc cgcgtggccg gcaccgccgc ccagggcacg 420
tacgtcacgg cgacgaacgg cccgaccaag ggcaacctga tcgccctgcg caacaacacg 480
ggcctggacg acttcgtcgt caagggcacc ggccgcatcg gcgtcggcat cgaccgcgcg 540
gccacgcccc gcgcccaggt ccacatcgtc cagcggggcg acgccctcgc cgcgctcctg 600
gtggagggct cggtagcat cgggaacgcc gcgacggtag cgacgtcggg ggacagctcg 660
ggcggcggcg ccctgtacgc gtcgggcggc gccctgctgt ggcgcggtc caacggcacg 720
gtcacgacga tcgcaccggc gtga 744

<210> 18
<211> 247
<212> PRT
<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 18

Met Pro Val Ala Arg Arg Leu Phe Leu Gly Ser Phe Thr Ala Gly Ala
1 5 10 15

Val Thr Val Ala Thr Ala Ala Ala Thr Gly Thr Ala Ser Ala Ala Gly
20 25 30

Glu Asn Gly Ala Thr Thr Thr Phe Asp Gly Pro Val Ala Ala Glu Arg
35 40 45

Phe Ser Ala Asp Thr Thr Leu Glu Ala Ala Phe Leu Lys Thr Thr Ser
50 55 60

Glu Thr Asn His Ala Ala Thr Ile Tyr Gln Ala Gly Thr Ser Gly Asp
65 70 75 80

P04568 PCTENGL_ST25_RU

Gly Ala Ala Leu Asn Val Ile Ser Asp Asn Pro Gly Thr Ser Ala Met
85 90 95

Tyr Leu Ser Gly Thr Glu Thr Ala Arg Gly Thr Leu Lys Ile Thr His
100 105 110

Arg Gly Tyr Ala Asp Gly Ser Asp Lys Asp Ala Ala Ala Leu Ser Leu
115 120 125

Asp Leu Arg Val Ala Gly Thr Ala Ala Gln Gly Ile Tyr Val Thr Ala
130 135 140

Thr Asn Gly Pro Thr Lys Gly Asn Leu Ile Ala Leu Arg Asn Asn Thr
145 150 155 160

Gly Leu Asp Asp Phe Val Val Lys Gly Thr Gly Arg Ile Gly Val Gly
165 170 175

Ile Asp Arg Ala Ala Thr Pro Arg Ala Gln Val His Ile Val Gln Arg
180 185 190

Gly Asp Ala Leu Ala Ala Leu Leu Val Glu Gly Ser Val Arg Ile Gly
195 200 205

Asn Ala Ala Thr Val Pro Thr Ser Val Asp Ser Ser Gly Gly Gly Ala
210 215 220

Leu Tyr Ala Ser Gly Gly Ala Leu Leu Trp Arg Gly Ser Asn Gly Thr
225 230 235 240

Val Thr Thr Ile Ala Pro Ala
245

<210> 19

<211> 387

<212> DNA

<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 19

P04568 PCTENGL_ST25_RU

ttcgacggcc cggtggccgc cgagagggtc agcgcgggaca ccacactgga ggccgccttc	60
ctcaagacga cctcggagac gaaccacgcg gcgaccatct accaggccgg tacgtcgggc	120
gacggcgcgg cgctgaacgt gatctccgac aaccgggca cctcggccat gtacctctcc	180
ggcaccgaga ccgcgcgcgg caccctgaag atcaccacc gcgggtacgc cgacggctcc	240
gacaaggacg ccgccgccct gtcgctcgac ctccgcgtgg ccggcaccgc cgcccagggc	300
atctacgtca cggcgacgaa cggcccgacc aagggaacc tgatcgccct gcgcaacaac	360
acgggcctgg acgacttcgt cgtcaag	387

<210> 20
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 20	
atgccggtgg cacgcagact gtttctgggg agcttcaccg cgggcgcggt gaccgtggcg	60
acggccgccg cgacgggtac ggcctcggcg	90

<210> 21
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 21

Ala	Gly	Glu	Asn	Gly	Ala	Thr	Thr	Thr	Phe	Asp	Gly	Pro	Val	Ala	Ala
1				5					10					15	

Glu	Arg	Phe	Ser	Ala	Asp	Thr	Thr	Leu	Glu	Ala	Ala	Phe	Leu	Lys	Thr
			20					25					30		

Thr	Ser	Glu	Thr	Asn	His	Ala	Ala	Thr	Ile	Tyr	Gln	Ala	Gly	Thr	Ser
		35					40					45			

Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu	Asn	Val	Ile	Ser	Asp	Asn	Pro	Gly	Thr	Ser
	50					55					60				

Ala	Met	Tyr	Leu	Ser	Gly	Thr	Glu	Thr	Ala	Arg	Gly	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75				80	

P04568 PCTENGL_ST25_RU

Thr His Arg Gly Tyr Ala Asp Gly Ser Asp Lys Asp Ala Ala Ala Leu
85 90 95

Ser Leu Asp Leu Arg Val Ala Gly Thr Ala Ala Gln Gly Ile Tyr Val
100 105 110

Thr Ala Thr Asn Gly Pro Thr Lys Gly Asn Leu Ile Ala Leu Arg Asn
115 120 125

Asn Thr Gly Leu Asp Asp Phe Val Val Lys Gly Thr Gly Arg Ile Gly
130 135 140

Val Gly Ile Asp Arg Ala Ala Thr Pro Arg Ala Gln Val His Ile Val
145 150 155 160

Gln Arg Gly Asp Ala Leu Ala Ala Leu Leu Val Glu Gly Ser Val Arg
165 170 175

Ile Gly Asn Ala Ala Thr Val Pro Thr Ser Val Asp Ser Ser Gly Gly
180 185 190

Gly Ala Leu Tyr Ala Ser Gly Gly Ala Leu Leu Trp Arg Gly Ser Asn
195 200 205

Gly Thr Val Thr Thr Ile Ala Pro Ala
210 215

<210> 22
<211> 651
<212> DNA
<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 22
gccggggaga acggcgcgac gacgaccttc gacggcccgg tggccgccga gaggttcagc 60
gcggacacca cactggaggc cgccttcctc aagacgacct cggagacgaa ccacgcggcg 120
accatctacc aggccgttac gtcgggcgac ggcgcggcgc tgaacgtgat ctccgacaac 180
ccgggcacct cggccatgta cctctccggc accgagaccg cgcgcggcac cctgaagatc 240
accacccgcg ggtacgccga cggctccgac aaggacgccg ccgccctgtc gctcgacctc 300

P04568 PCTENGL_ST25_RU

cgcggtggccg gcaccgccgc ccagggcatc tacgtcacgg cgacgaacgg cccgaccaag	360
ggcaacctga tcgccctgcg caacaacacg ggcctggacg acttcgtcgt caagggcacc	420
ggccgcatcg gcgtcggcat cgaccgcgcg gccacgcccc gcgcccaggt ccacatcgtc	480
cagcggggcg acgccctcgc cgcgctcctg gtggagggct cggtacgcat cgggaacgcc	540
gcgacggtac cgacgtcggg ggacagctcg ggcggcggcg ccctgtacgc gtcgggcggc	600
gccctgctgt ggcgcggctc caacggcacg gtcacgacga tcgcaccggc g	651

<210> 23
 <211> 741
 <212> DNA
 <213> Streptomyces pristinaespiralis

<400> 23	
atgagcgtgt cgcgagggtt gttcctcgga gggttcacgg cgggggcggg gaccgtggcg	60
gcgggcgccc ccgcgacgcc ggcggcggcc gcggaggcgg acggcccgac gacgacgttc	120
gacgggtccg tggtggcgga gggtttcagg acggactcca ccgtcaagtc cgccttcttc	180
aagacgacgt cgacgaccga gcacgcggtg acggcctatc aggccggcac gtccggcagc	240
ggcgtggccc tgaacgtcgt atcgaagaac ccgggtgact cggccatgta tctcagtggc	300
acggagaagg cgcacggcac gctgaagatc tcgcacacgg gccacgcgga cggctcggac	360
gagaaggcgt ccgctctgtc gatcgacctg ctgacggcgg ggacggcagc ccagggcatc	420
ttcgtgaagg cgggcaacgg gccaccacc ggcaacctga tctgcctgcg caacaacgcc	480
cgagacgact tcgtcgtcaa gggcagcggg cgggtcggta tcggcatggg cgtgggcggc	540
aaccctggt cgacgtcca tgtcgtgcag cagccgggca ccgactcggc gctgatggtc	600
gagggcacgg tgcgggtcgt cgacgtggcc tccgcgcca cgggcgtcga ctgcgcggc	660
ggcggcgtgc tgtacgcgga gaacggtgcg ctgaagtggc gcggctccga caacacggtc	720
accaccatcg ccccgccctg a	741

<210> 24
 <211> 738
 <212> DNA
 <213> Streptomyces tsukubaensis

P04568 PCTENGL_ST25_RU

<400> 24

atggctgtga accggagact cttcctgggc ggattcaccg cgggggcggt gaccgtggcg	60
gcgggcactg cgacgcccgc tgcggccgcg gcggcccagg ggccgacgac gacgttcgac	120
gggcccgtgg tcgccgagcg cttcagcacg aactcgacgg tcaactccgc cttcctgaag	180
acgacgtcca cgaccgagca cgccgcgacc gtctaccagg ccgggacctc gggcagcggg	240
gtcgccctga acatcgtgtc ggacaacccg gacaactcgg cggctctacct caccggccgg	300
gagaagaccc gcggcacccct gaagatctcg cacatcggcc atgcggacgg gtccgacgcg	360
gacgccgccc ccgtgtccat cgacctgaag acggccggaa ccgccacgca gggcatcttc	420
ctgaccgcca cggacggtgc cacgacgggc aatctgatct gtctgcgcaa caacggccgc	480
gacgatttcg tcgtcaaggg cagcggacgc gtcggcatcg gtctggcggt gggctccgcc	540
ccctggtccc agctccatgt cgtccagcgg ccgggggccc actccgcgct gatggtcgag	600
ggagcggtag ggatcgtcga cgccgcgacc gtaccgacgg cggtcgactc caagggcggc	660
ggcacgtctt acgcacaggg cggcgagctg atgtggcgca gcgcgaacgg caacgtcacc	720
cgtatcgcct cggcctga	738

<210> 25

<211> 375

<212> DNA

<213> Streptomyces pristinaespiralis

<400> 25

ttcgacggtc cggtggtggc ggagggtttc aggacggact ccaccgtcaa gtccgccttc	60
ttcaagacga cgtcgacgac cgagcacgcg gtgacggcct atcaggccgg cacgtccggc	120
agcggcgtgg ccctgaacgt cgtatcgaag aaccgggtg actcggccat gtatctcagt	180
ggcacggaga aggcgcacgg cacgctgaag atctcgaca cgggccacgc ggacggctcg	240
gacgagaagg cgtccgctct gtcgatcgac ctgctgacgg cggggacggc agcccagggc	300
atcttcgtga aggcgggcaa cggggcccacc accggcaacc tgatctgcct gcgcaacaac	360
gcccagacg acttc	375

<210> 26

<211> 393

<212> DNA

P04568 PCTENGL_ST25_RU

<213> Streptomyces tsukubaensis

<400> 26

ttcgacgggc ccgtggtcgc cgagcgcttc agcacgaact cgacggtcaa ctccgccttc	60
ctgaagacga cgtccacgac cgagcacgcc gcgaccgtct accaggccgg gacctcgggc	120
agcgggggtcg ccctgaacat cgtgtcggac aaccgggaca actcggcggt ctacctcacc	180
ggccgggaga agacccgcgg caccctgaag atctgcaca tcggccatgc ggacgggtcc	240
gacgcggacg ccgccgccgt gtccatcgac ctgaagacgg ccggaaccgc cacgcagggc	300
atcttcctga ccgccacgga cggtgccacg acgggcaatc tgatctgtct gcgcaacaac	360
ggccgcgacg atttcgtcgt caagggcagc gga	393

<210> 27

<211> 15

<212> DNA

<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 27

ttcgacggcc cgggtg	15
-------------------	----

<210> 28

<211> 34

<212> DNA

<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 28

gtaggatccg ccggggagaa cggcgcgacg acga	34
---------------------------------------	----

<210> 29

<211> 34

<212> DNA

<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 29

gactctagat cacgccggtg cgatcgtcgt gacc	34
---------------------------------------	----

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 30

tgtggaattg tgagcggata	20
-----------------------	----

P04568 PCTENGL_ST25_RU

<210> 31
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 31
 tttcaaccat ttgttccagg t 21

<210> 32
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 32
 tggccatggc cggggagaac ggcgcgacga cga 33

<210> 33
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 33
 ctcgaattct cacgccggtg cgatcgtcgt gacc 34

<210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> T7-promoter

<400> 34
 taatcagact cactataggg 20

<210> 35
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> T7-terminator

<400> 35
 gctagttatt gctcagcgg 19

P04568 PCTENGL_ST25_RU

<210> 36
<211> 34
<212> DNA
<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 36
atacatatgg ccggggagaa cggcgcgacg acga 34

<210> 37
<211> 34
<212> DNA
<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 37
ctcgaattct cacgccggtg cgatcgctgt gacc 34

<210> 38
<211> 8711
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sequence of vector pHTsk_HYAL

<400> 38
ttaagttatt ggtatgactg gttttaagcg caaaaaaagt tgctttttcg tacctattaa 60
tgtatcgttt tagaaaaccg actgtaaaaa gtacagtcgg cattatctca tattataaaa 120
gccagtcatt aggccatatct gacaattcct gaatagagtt cataaacaat cctgcatgat 180
aaccatcaca aacagaatga tgtacctgta aagatagcgg taaatatatt gaattacctt 240
tattaatgaa ttttcctgct gtaataatgg gtagaaggta attactatta ttattgatat 300
ttaagttaaa cccagtaaat gaagtcctatg gaataataga aagagaaaaa gcattttcag 360
gtataggtgt tttgggaaac aatttccccg aaccattata tttctctaca tcagaaaggt 420
ataaatcata aaactctttg aagtcattct ttacaggagt ccaaatacca gagaatgttt 480
tagatacacc atcaaaaatt gtataaagtg gctctaactt atcccaataa cctaactctc 540
cgtcgctatt gtaaccagtt ctaaaagctg tatttgagtt taccacctt gtcactaaga 600
aaaataaatgc agggtaaaat ttatatcctt cttgttttat gtttcggtat aaaacactaa 660
tatcaatttc tgtggttata ctaaaagctg tttgttggtt caaataatga ttaaatatct 720

P04568 PCTENGL_ST25_RU

cttttctctt ccaattgtct aaatcaattt tattaaagtt catttgatat gcctcctaaa	780
tttttatcta aagtgaattt aggaggctta cttgtctgct ttcttcatta gaatcaatcc	840
ttttttaaaa gtcaatatta ctgtaacata aatatatatt ttaaaaatat cccactttat	900
ccaattttcg tttgttgaac taatgggtgc tttagttgaa gaataaagac cacattaata	960
aatgtggtct tttgtgtttt tttaaaggat ttgagcgtag cgaaaaatcc ttttctttct	1020
tatcttgata ataagggtaa ctattgccga tcgtccattc cgacagcatc gccagtcact	1080
atggcggtgct gctagcgcca ttcgccattc aggctgcgca actgttggaagg agggcgatcg	1140
gtgcgggcct cttcgctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc aaggcgatta	1200
agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtcg cgacgttgta aaacgacggc cagtgaattc	1260
gagctcaggc cttaaactcac attaatgtcg ttgcgctcac tgcccgtttt ccagtcggga	1320
aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt	1380
attgggcgcc aggggtggtt ttcttttcac cagtgcgacg ggcaacagct gattgccctt	1440
caccgcctgg ccctgagaga gttgcagcaa gcggtccacg ctggtttgcc ccagcaggcg	1500
aaaatcctgt ttgatgggtg ttgacggcgg gatataacat gagctgtctt cggtatcgtc	1560
gtatccact accgagatat ccgcaccaac gcgcagcccg gactcggtaa tggcgcgcac	1620
tgcgcccagc gccatctgat cgttggcaac cagcatcgca gtgggaacga tgccctcatt	1680
cagcatttgc atggtttgtt gaaaaccgga catggcactc cagtcgcctt cccgttccgc	1740
tatcggctga atttgattgc gagtgagata tttatgccag ccagccagac gcagacgcgc	1800
cgagacagaa cttaatgggc ccgctaacag cgcgatttgc tgggtgacca atgcgaccag	1860
atgctccacg cccagtcgcg taccgtcttc atgggagaaa ataatactgt tgatgggtgt	1920
ctggtcagag acatcaagaa ataacgccg aacattagtg caggcagctt ccacagcaat	1980
ggcatcctgg tcatccagcg gatagttaat gatcagccca ctgacgcgtt gcgcgagaag	2040
attgtgcacc gccgctttac aggttcgac gccgttcgt tctaccatcg acaccaccac	2100
gctggcacc agttgatcgg cgcgagattt aatcgccgcg acaatttgcg acggcgcgtg	2160
caggccaga ctggaggtgg caacgccaat cagcaacgac tgtttgcccg ccagttgttg	2220
tgcacgcgg ttgggaatgt aattcagctc cgccatcgcc gcttccactt tttcccgct	2280

P04568 PCTENGL_ST25_RU

tttcgcagaa acgtggctgg cctggttcac cacgcgggaa acggtctgat aagagacacc	2340
ggcatactct gcgacatcgt ataacgttac tggtttcac aaatcgtct ccctccgttt	2400
gaatatttga ttgatcgtaa ccagatgaag cactctttcc actatcccta cagtgttatg	2460
gcttgaacaa tcacgaaaca ataattggta cgtacgatct ttcagccgac tcaaacaatca	2520
aatcttacia atgtagtctt tgaaagtatt acatatgtaa gatttaaatg caaccgtttt	2580
ttcggaagga aatgatgacc tcgtttccac cggaattagc ttggtaccag ctattgtaac	2640
ataatcggtc cgggggtgaa aaagctaacg gaaaaggag cgaaaagaa tgatgtaagc	2700
gtgaaaaatt ttttatctta tcacttgaat ttggaaggga gattctttat tataagaatt	2760
gtggaattgt gagcggataa caattcccaa ttaaaggagg aaggatcaat gattcaaaaa	2820
cgaaagcgga cagtttcgtt cagacttggt cttatgtgca cgctgttatt tgtcagtttg	2880
ccgattacaa aaacatcagc cgtaggatcc gccggggaga acggcgcgac gacgacctc	2940
gacggcccgg tggccgccga gaggttcagc gcggacacca cactggaggc cgccttcctc	3000
aagacgacct cggagacgaa ccacgcggcg accatctacc aggccggtac gtcgggcgac	3060
ggcgcggcgc tgaacgtgat ctccgacaac ccgggcacct cggccatgta cctctccggc	3120
accgagaccg cgcgcggcac cctgaagatc acccaccgcg ggtacgccga cggctccgac	3180
aagzacgccg ccgccctgtc gctcgacctc cgcgtggccg gcaccgccgc ccagggcac	3240
tacgtcacgg cgacgaacgg cccgaccaag ggcaacctga tcgccctgcg caacaacacg	3300
ggcctggacg acttcgtcgt caagggcacc ggccgcatcg gcgtcggcat cgaccgcgcg	3360
gccacgcccc gcgcccaggt ccacatcgtc cagcggggcg acgccctcgc cgcgtcctg	3420
gtgaggggct cggtagcat cggaacgcc gcgacgttac cgacgtcggg ggacagctcg	3480
ggcggcggcg ccctgtacgc gtcgggcggc gccctgtgtt ggcgcggtc caacggcacg	3540
gtcacgacga tcgcaccggc gtgatctaga gtcgacgtcc ccggggcagc ccgcctaattg	3600
agcgggcttt tttcacgtca cgcgtccatg gagatctttg tctgcaactg aaaagtttat	3660
accttacctg gaacaaatgg ttgaaacata cgaggctaatt atcggcttat taggaatagt	3720
ccctgtacta ataaaatcag gtggatcagt tgatcagtat attttgacg aagctcggaa	3780
agaatttgga gatgacttgc ttaattccac aattaaatta agggaaagaa taaagcgatt	3840

P04568 PCTENGL_ST25_RU

tgatgttcaa ggaatcacgg aagaagatac tcatgataaa gaagctctaa aactattcaa	3900
taaccttaca atggaattga tcgaaagggt ggaagggttaa tggtagcaaa attaggggat	3960
ctacctagaa agccacaagg cgatagggtca agcttaaaga acccttacat ggatcttaca	4020
gattctgaaa gtaaagaaac aacagagggt aaacaaacag aacccaaaag aaaaaaagca	4080
ttgttgaaaa caatgaaagt tgatgtttca atccataata agattaaatc gctgcacgaa	4140
attctggcag catccgaagg gaattcatat tacttagagg atactattga gagagctatt	4200
gataagatgg ttgagacatt acctgagagc caaaaaactt tttatgaata tgaattaaaa	4260
aaaagaacca acaaaggctg agacagactc caaacgagtc tgttttttta aaaaaaatat	4320
taggagcatt gaatatatat tagagaatta agaaagacat gggaataaaa atattttaaa	4380
tccagtaaaa atatgataag attatttcag aatatgaaga actctgtttg tttttgatga	4440
aaaaacaaac aaaaaaaatc cacctaacgg aatctcaatt taactaacag cggccaaact	4500
gagaagttaa atttgagaag gggaaaaggc ggatttatac ttgtatttaa ctatctccat	4560
tttaacattt tattaaaccc catacaagtg aaaatcctct tttacactgt tcctttaggt	4620
gatcgcgag ggacattatg agtgaagtaa acctaaaagg aaatacagat gaattagtgt	4680
attatcgaca gcaaaccact ggaaataaaa tcgccaggaa gagaatcaaa aaagggaag	4740
aagaagttaa ttatgttgct gaaacggaag agaagatatg gacagaagag caaataaaaa	4800
acttttcttt agacaaattt ggtacgcata taccttacat agaaggctcat tatacaatct	4860
taaataatta cttctttgat ttttggggct attttttagg tgctgaagga attgcgctct	4920
atgctcacct aactcgttat gcatacggca gcaaagactt ttgctttcct agtctacaaa	4980
caatcgctaa aaaaatggac aagactcctg ttacagttag aggctacttg aaactgcttg	5040
aaaggtaggg ttttatttgg aaggtaaacg tccgtaataa aaccaaggat aacacagagg	5100
aatccccgat ttttaagatt agacgtaagg ttcctttgct ttcagaagaa cttttaaatg	5160
gaaaccctaa tattgaaatt ccagatgacg aggaagcaca tgtaaagaag gcttttaaaa	5220
aggaaaaaga gggctttcca aaggttttga aaaaagagca cgatgaattt gttaaaaaaa	5280
tgatggatga gtcagaaaca attaatatc cagaggcctt acaatatgac acaatgtatg	5340
aagatatact cagtaaagga gaaattcgaa aagaaatcaa aaaacaaata cctaattccta	5400

P04568 PCTENGL_ST25_RU

caacatcttt tgagagtata tcaatgacaa ctgaagagga aaaagtcgac agtactttaa	5460
aaagcgaaat gcaaaatcgt gtctctaagc cttcttttga tacctgggtt aaaaacacta	5520
agatcaaaat tgaaaataaa aattgtttat tacttgtacc gagtgaattt gcatttgaat	5580
ggattaagaa aagatattta gaaacaatta aaacagtcct tgaagaagct ggatatgttt	5640
tcgaaaaaat cgaactaaga aaagtgaat aaactgctga agtatttcag cagttttttt	5700
tatttagaaa tagtgaaaaa aatataatca gggaggtatc aatatttaat gagtactgat	5760
ttaaatttat ttagactgga attaataatt aacacgtaga ctaattaa aa ttaatgagg	5820
gataaagagg atacaaaaat attaatctca atccctatta aattttaaca aggggggggat	5880
taaaatttaa ttagagggtt atccacaaga aaagacccta ataaaatttt tactagggtt	5940
ataacactga ttaatttctt aatgggggag ggattaaaat ttaatgacaa agaaaacaat	6000
cttttaagaa aagcttttaa aagataataa taaaaagagc tttgcgatta agcaaaactc	6060
tttacttttt cattgacatt atcaaattca tcgatttcaa attgttgttg tatcataaag	6120
ttaattctgt tttgcacaac cttttcagga atataaaaca catctgaggc ttgttttata	6180
aactcagggt cgctaaagtc aatgtaacgt agcatatgat atggtatagc ttccacccaa	6240
gtagccttt ctgcttcttc tgaatgtttt tcatatactt ccatgggtat ctctaaatga	6300
ttttcctcat gtagcaaggt atgagcaaaa agtttatgga attgatagtt cctctctttt	6360
tcttcaactt ttttatctaa aacaaacact ttaacatctg agtcaatgta agcataagat	6420
gtttttccag tcataatttc aatcccaa at cttttagaca gaaattctgg acgtaaactt	6480
tttggtgaaa gaattttttt atgtagcaat atatccgata cagcaccttc taaaagcggt	6540
ggatgaatagg gcattttacc tatctcctct cattttgttg aataaaaata gtcattttcg	6600
tccatctacc tatcctatta tcgaacagtt gaacttttta atcaaggatc agtccttttt	6660
ttcattattc ttaaactgtg ctcttaactt taacaactcg atttgttttt ccagatctcg	6720
agggtaaacta gcctcgccga tcccgaaga ggcccggcag tcagggtggca cttttcgggg	6780
aaatgtgctg ggaacccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct	6840
catgagacaa taaccctgat aatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat	6900
tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc	6960

P04568 PCTENGL_ST25_RU

tcaccagaa acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg	7020
ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg	7080
ttttccaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga	7140
cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta	7200
ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc	7260
tgccataacc atgagtgata acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc	7320
gaaggagcta accgcttttt tgacacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg	7380
ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc	7440
aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccgga	7500
acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct	7560
tccggctggc tggttttattg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat	7620
cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg	7680
gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagatagggtg cctcactgat	7740
taagcattgg taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact	7800
tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacccaaat	7860
cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc	7920
ttcttgagat cttttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgt	7980
accagcggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg	8040
cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt ctttctagt tagccgtagt taggccacca	8100
cttcaagaac tctgtagcac gcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc	8160
tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga	8220
taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac	8280
gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttccga	8340
agggagaaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag	8400
ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg	8460
acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggagg agcctatgga aaaacgccag	8520

P04568 PCTENGL_ST25_RU

caacgcggcc tttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc	8580
tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc	8640
tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagttagc gaggaagcgg aagagcgcgc	8700
aatacgcattg c	8711

<210> 39

<211> 6124

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of vector pHyal_sk

<400> 39

tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaacgcgc gcgggtgtgg tggttacgcg	60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcgcgct cctttcgctt tcttcccttc	120
ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tccctttagg	180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc	240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt	300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggcttattc	360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta	420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt	480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta	540
tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat	600
gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt	660
ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg	720
agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga	780
agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg	840
tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggg	900
tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg	960
cagtgtgccg ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg	1020

P04568 PCTENGL_ST25_RU

aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga	1080
tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc	1140
tgacgaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaaactggc gaactactta ctctagcttc	1200
ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc	1260
ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg	1320
cggatatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac	1380
gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc	1440
actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt	1500
aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac	1560
caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gacccgtag aaaagatcaa	1620
aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc	1680
accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt	1740
aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg	1800
ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tcctgttacc	1860
agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt	1920
accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga	1980
gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct	2040
tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg	2100
cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca	2160
cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa	2220
cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctacatgtt	2280
ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga	2340
taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcgggaaga	2400
gcgcctgatg cggtattttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcataatatg	2460
tgactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat	2520
cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgcctt	2580

P04568 PCTENGL_ST25_RU

gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct	2640
gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct	2700
catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgcctg ttcattccgcg tccagctcgt	2760
tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcggggccatg ttaagggcgg	2820
ttttttcctg tttggtcact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa	2880
tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat gaacatgcc	2940
ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaac tggcgggtatg gatgcggcgg gaccagagaa	3000
aaatcactca gggccaatgc cagcgttcg ttaatacaga tgtaggtgtt ccacagggt	3060
gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct gacttccgcg	3120
tttccagact ttacgaaaca cggaaccga agaccattca tgttggtgct caggtcgcag	3180
acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac	3240
cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca	3300
cccgtggggc cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttggtggcgg	3360
gaccagtga cgaaggcttga gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc	3420
cgatcatcgt cgcgctccag cgaaagcggc cctcgccgaa aatgacccag agcgctgccg	3480
gcacctgtcc tacgagttgc atgataaaga agacagtcac aagtgcggcg acgatagtca	3540
tgccccgcgc ccaccggaag gagctgactg gggtgaaggc tctcaagggc atcggtcgag	3600
atcccgggtgc ctaatgagtg agctaactta cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt	3660
tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag	3720
gcggtttgcg tattgggcgc cagggtgggt tttcttttca ccagtgagac gggcaacagc	3780
tgattgccct tcaccgcctg gccctgagag agttgcagca agcgggtccac gctggtttgc	3840
cccagcaggc gaaaatcctg tttgatggtg gttaacggcg ggatataaca tgagctgtct	3900
tcggtatcgt cgtatccac tacgagata tccgcaccaa cgcgcagccc ggactcggta	3960
atggcgcgca ttgcgcccag cgccatctga tcgttggaac ccagcatcgc agtgggaacg	4020
atgccctcat tcagcatttg catggtttgt tgaaaaccgg acatggcact ccagtcgcct	4080
tccggttccg ctatcggctg aatttgattg cgagtgaatg atttatgcca gccagccaga	4140

P04568 PCTENGL_ST25_RU

cgagacgcg cgcagacaga acttaatggg cccgctaaca gcgcgatttg ctggtgaccc	4200
aatgcgacca gatgctccac gccagtcgc gtaccgtctt catgggagaa aataatactg	4260
ttgatgggtg tctggtcaga gacatcaaga aataacgccg gaacattagt gcaggcagct	4320
tccacagcaa tggcatcctg gtcattccagc ggatagttaa tgatcagccc actgacgcgt	4380
tgcgcgagaa gattgtgcac cgccgcttta caggcttcga cgccgcttcg ttctaccatc	4440
gacaccacca cgctggcacc cagttgatcg gcgcgagatt taatcgccgc gacaatttgc	4500
gacggcgctg gcagggccag actggaggtg gcaacgcaa tcagcaacga ctgtttgccc	4560
gccagttgtt gtgccacgcg gttgggaatg taattcagct ccgccatcg cgcttccact	4620
ttttcccgcg ttttcgcaga aacgtggctg gcctggttca ccacgcggga aacggtctga	4680
taagagacac cggcatactc tgcgacatcg tataacgtta ctggtttcac attcaccacc	4740
ctgaattgac tctcttcgg gcgctatcat gccataccgc gaaaggtttt gcgccattcg	4800
atggtgtccg ggatctcgac gctctccctt atgcgactcc tgcattagga agcagcccag	4860
tagtaggttg aggccgttga gcaccgccgc cgcaaggaat ggtgcatgca aggagatggc	4920
gcccaacagt ccccgccga cggggcctgc caccataccc acgccgaaac aagcgctcat	4980
gagcccgaag tggcgagccc gatcttcccc atcgggtgatg tcggcgatat aggcgccagc	5040
aaccgcacct gtggcgccgg tgatgccggc cacgatgcgt ccggcgtaga ggatcgagat	5100
ctcgatcccg cgaaattaat acgactcact ataggggaat tgtgagcgga taacaattcc	5160
cctctagaaa taattttgtt taactttaag aaggagatat acatatgaaa tacctgctgc	5220
cgaccgctgc tgctggtctg ctgctcctcg ctgcccagcc ggcgatggcc atggccgggg	5280
agaacggcgc gacgacgacc ttcgacggcc cgggtggccgc cgagaggttc agcgcgga	5340
ccacactgga ggccgccttc ctcaagacga cctcggagac gaaccacgc gcgaccatct	5400
accaggccgg tacgtcgggc gacggcgcg cgctgaacgt gatctccgac aaccggggca	5460
cctcggccat gtacctctcc ggcaccgaga ccgcgcgcgg caccctgaag atcaccacc	5520
gcgggtacgc cgacggctcc gacaaggacg ccgccgccct gtcgctcgac ctccgcgtgg	5580
ccggcaccgc cggccagggc atctacgtca cggcgacgaa cggcccgacc aagggaacc	5640
tgatgccct gcgcaacaac acgggcctgg acgacttcgt cgtcaagggc accggccgca	5700

P04568 PCTENGL_ST25_RU

tcggcgctcgg catcgaccgc gcggccacgc cccgcgcca ggtccacatc gtccagcggg	5760
gcgacgccct cgccgcgctc ctggtggagg gctcggtagc catcggaac gccgcgacgg	5820
taccgacgtc ggtggacagc tcgggcggcg gcgccctgta cgcgtcgggc ggcgccctgc	5880
tgaggcgcgg ctccaacggc acggtcacga cgatcgacc ggcgtagaaa ttcgagctcc	5940
gtcgacaagc ttgcggccgc actcgagcac caccaccacc accactgaga tccggctgct	6000
aacaaagccc gaaaggaagc tgagttggct gctgccaccg ctgagcaata actagcataa	6060
ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg ggttttttgc tgaaaggagg aactatatcc	6120
ggat	6124

<210> 40

<211> 6058

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence of vector pHyal_sk_SL

<400> 40

tgccgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaacgcgc gcgggtgtgg tggttacgcg	60
cagcgtgacc gctacacttg ccagcgccct agcgcccgct cttttcgctt tcttcccttc	120
ctttctcgcc acgttcgccc gctttccccg tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg	180
gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa cttgattagg gtgatggttc	240
acgtagtggg ccatcgccct gatagacggg ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt	300
ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg aacaacactc aaccctatct cggcttattc	360
ttttgattta taagggattt tgccgatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta	420
acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat attaacgttt acaatttcag gtggcacttt	480
tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc taaatacatt caaatatgta	540
tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat	600
gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt gccttcctgt	660
ttttgctcac ccagaaacgc tgggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg	720
agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtgaagatc cttgagagtt ttcgccccga	780

P04568 PCTENGL_ST25_RU

agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg	840
tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga atgacttggt	900
tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg	960
cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg	1020
aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga	1080
tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc	1140
tgcagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc gaactactta ctctagcttc	1200
ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc	1260
ggcccttccg gctggctggt ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg	1320
cggatatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac	1380
gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc	1440
actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt agattgattt	1500
aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac	1560
caaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa	1620
aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc	1680
accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt	1740
aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc cgtagttagg	1800
ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tcctgttacc	1860
agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt	1920
accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttga	1980
gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct	2040
tccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg	2100
cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca	2160
cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc tatggaaaaa	2220
cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg ctacatgtt	2280
cttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg agtgagctga	2340

P04568 PCTENGL_ST25_RU

taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga	2400
gcgcctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatatatgg	2460
tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac actccgctat	2520
cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct	2580
gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct	2640
gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg cggtaaagct	2700
catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgcctg ttcacccgcg tccagctcgt	2760
tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcgggccatg ttaagggcgg	2820
ttttttcctg tttggctact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc atgggggtaa	2880
tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat gaacatgccc	2940
ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaac tggcggtatg gatgcggcgg gaccagagaa	3000
aaatcactca gggccaatgc cagcgcttcg ttaatacaga tgtaggtgtt ccacagggtg	3060
gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga acataatggg gcagggcgct gacttccgcg	3120
tttccagact ttacgaacaa cggaaccga agaccattca tgttgttgct caggctcgag	3180
acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgtat cggtgattca ttctgctaac	3240
cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg atcatgcgca	3300
cccgtggggc cgccatgccg gcgataatgg cctgcttctc gccgaaacgt ttgggtggcgg	3360
gaccagtga cgaaggcttg gcgagggcgt gcaagattcc gaataccgca agcgacaggc	3420
cgatcatcgt cgcgctccag cgaaagcggc cctcgccgaa aatgaccag agcgctgccg	3480
gcacctgtcc tacgagttgc atgataaaga agacagtcac aagtgcggcg acgatagtca	3540
tgccccgcgc ccaccggaag gagctgactg ggttgaaggc tctcaagggc atcggtcgag	3600
atcccgggtg ctaatgagtg agctaactta cattaattgc gttgcgctca ctgcccgtt	3660
tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag	3720
gcggtttgcg tattgggcgc cagggtggtt tttcttttca ccagtgaagc gggcaacagc	3780
tgattgccct tcaccgcctg gccctgagag agttgcagca agcgggtccac gctggtttgc	3840
cccagcaggc gaaaatcctg tttgatgggt gttaacggcg ggatataaca tgagctgtct	3900

P04568 PCTENGL_ST25_RU

tcggtatcgt cgtatccac taccgagata tccgcaccaa cgcgagccc ggactcggta	3960
atggcgcgca ttgcgccag cgccatctga tcgttggaac ccagcatcgc agtgggaacg	4020
atgccctcat tcagcatttg catggtttgt tgaaaaccgg acatggcact ccagtcgcct	4080
tccggttccg ctatcggctg aatttgattg cgagtgagat atttatgcca gccagccaga	4140
cgagacgcg ccgagacaga acttaatggg cccgctaaca gcgcgatttg ctggtgaccc	4200
aatgcgacca gatgctccac gccagtcgc gtaccgtctt catgggagaa aataatactg	4260
ttgatgggtg tctggtcaga gacatcaaga aataacgccg gaacattagt gcaggcagct	4320
tccacagcaa tggcatcctg gtcattccagc ggatagttaa tgatcagccc actgacgcgt	4380
tgcgcgagaa gattgtgcac cgccgcttta caggcttcga cgccgcttcg ttctaccatc	4440
gacaccacca cgctggcacc cagttgatcg gcgcgagatt taatcgccgc gacaatttgc	4500
gacggcgcggt gcagggccag actggagggtg gcaacgcaa tcagcaacga ctgtttgccc	4560
gccagttgtt gtgccacgcg gttgggaatg taattcagct ccgccatcgc cgcttcact	4620
ttttcccgcg ttttcgcaga aacgtggctg gcctggttca ccacgcggga aacggtctga	4680
taagagacac cggcatactc tgcgacatcg tataacgtta ctggtttcac attcaccacc	4740
ctgaattgac tctcttcgg gcgctatcat gccataccgc gaaaggtttt gcgccattcg	4800
atggtgtccg ggatctcgac gctctccctt atgcgactcc tgcattagga agcagcccag	4860
tagtaggttg aggccgttga gcaccgccgc cgcaaggaat ggtgcatgca aggagatggc	4920
gccaacagt ccccgccca cggggcctgc caccataccc acgccgaaac aagcgctcat	4980
gagcccgaag tggcgagccc gatcttcccc atcggtgatg tcggcgatat aggcgccagc	5040
aaccgcacct gtggcgccgg tgatgccggc cacgatgcgt ccggcgtaga ggatcgagat	5100
ctcgatcccg cgaaattaat acgactcact ataggggaat tgtgagcgga taacaattcc	5160
cctctagaaa taattttgtt taactttaag aaggagatat acatatggcc ggggagaacg	5220
gcgcgacgac gaccttcgac ggcccgggtg ccgccgagag gttcagcgcg gacaccacac	5280
tggaggccgc cttcctcaag acgacctcgg agacgaacca cgcggcgacc atctaccagg	5340
ccggtacgtc gggcgacggc gcggcgctga acgtgatctc cgacaacccg ggcacctcgg	5400
ccatgtacct ctccggcacc gagaccgcgc gcggcaccct gaagatcacc caccgcgggt	5460

P04568 PCTENGL_ST25_RU

acgccgacgg ctccgacaag gacgccgccg ccctgtcgct cgacctccgc gtggccggca	5520
ccgccgcccc gggcatctac gtcacggcga cgaacggccc gaccaagggc aacctgatcg	5580
ccctgcgcaa caacacgggc ctggacgact tcgtcgtcaa gggcaccggc cgcacggcg	5640
tcggcatcga ccgcgcggcc acgccccgcg cccaggtcca catcgtccag cggggcgacg	5700
ccctcgccgc gctcctggtg gagggctcgg tacgcatcgg gaacgccgcg acggtaccga	5760
cgtcggtgga cagctcgggc ggccggcgccc tgtacgcgtc gggcggcgcc ctgctgtggc	5820
gcggctccaa cggcacggtc acgacgatcg caccggcgtg agaattcgag ctccgtcgac	5880
aagcttgccg ccgcactcga gcaccaccac caccaccact gagatccggc tgctaacaaa	5940
gcccgaagg aagctgagtt ggctgctgcc accgctgagc aataactagc ataaccctt	6000
ggggcctcta aacgggtctt gaggggtttt ttgctgaaag gaggaactat atccggat	6058

<210> 41
 <211> 654
 <212> DNA
 <213> Streptomyces koganeiensis

<400> 41	
atggccgggg agaacggcgc gacgacgacc ttcgacggcc cggtagggcg cgagagggttc	60
agcgcggaca ccacactgga ggccgccttc ctcaagacga cctcggagac gaaccacgcg	120
gcgaccatct accaggccgg tacgtcgggc gacggcgcgg cgctgaacgt gatctccgac	180
aaccggggca cctcggccat gtacctctcc ggcaccgaga ccgcgcgcgg caccctgaag	240
atcaccacc gcgggtacgc cgacggctcc gacaaggacg ccgccgccct gtcgctcgac	300
ctccgcgtgg ccggcaccgc cggccagggc atctacgtca cggcgacgaa cggcccgacc	360
aagggaacc tgatcgccct gcgcaacaac acgggcctgg acgacttcgt cgtcaagggc	420
accggccgca tcggcgctcg catcgaccgc gcggccacgc cccgcgcca ggtccacatc	480
gtccagcggg gcgacgccct cgccgcgctc ctggtggagg gctcggtag catcggaac	540
gccgcgacgg taccgacgtc ggtggacagc tcgggcggcg gcgccctgta cgcgtcgggc	600
ggcgccctgc tgtggcgcgg ctccaacggc acggtcacga cgatcgacc ggcg	654

<210> 42
 <211> 6

P04568 PCTENGL_ST25_RU

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N-terminal amminoacidic sequence following to con
pHyal_sk_SL transformation

<400> 42

Ala Gly Glu Asn Gly Ala
1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The more represented N-terminal sequence from E.coli sample
transformed with vector pHyal_sk

<400> 43

Met Ala Gly Glu Asn Gly Ala
1 5

<210> 44

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> The least represented N-terminal sequence in E.coli sample
transformed with vector pHyal_sk

<400> 44

Ala Gln Pro Ala Met Ala Met Ala Gly Glu Asn Gly Ala
1 5 10

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> N-terminal of partially mature protein from E.coli
transformed with vector pHyal_sk

P04568 PCTENGL_ST25_RU

<400> 45

Ala Gln Pro Ala Met Ala Met
1 5

<210> 46

<211> 129

<212> PRT

<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 46

Phe Asp Gly Pro Val Ala Ala Glu Arg Phe Ser Ala Asp Thr Thr Leu
1 5 10 15

Glu Ala Ala Phe Leu Lys Thr Thr Ser Glu Thr Asn His Ala Ala Thr
20 25 30

Ile Tyr Gln Ala Gly Thr Ser Gly Asp Gly Ala Ala Leu Asn Val Ile
35 40 45

Ser Asp Asn Pro Gly Thr Ser Ala Met Tyr Leu Ser Gly Thr Glu Thr
50 55 60

Ala Arg Gly Thr Leu Lys Ile Thr His Arg Gly Tyr Ala Asp Gly Ser
65 70 75 80

Asp Lys Asp Ala Ala Ala Leu Ser Leu Asp Leu Arg Val Ala Gly Thr
85 90 95

Ala Ala Gln Gly Ile Tyr Val Thr Ala Thr Asn Gly Pro Thr Lys Gly
100 105 110

Asn Leu Ile Ala Leu Arg Asn Asn Thr Gly Leu Asp Asp Phe Val Val
115 120 125

Lys

<210> 47

<211> 30

<212> PRT

P04568 PCTENGL_ST25_RU

<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 47

Met Pro Val Ala Arg Arg Leu Phe Leu Gly Ser Phe Thr Ala Gly Ala
1 5 10 15

Val Thr Val Ala Thr Ala Ala Ala Thr Gly Thr Ala Ser Ala
20 25 30

<210> 48

<211> 246

<212> PRT

<213> Streptomyces pristinaespiralis

<400> 48

Met Ser Val Ser Arg Arg Leu Phe Leu Gly Gly Phe Thr Ala Gly Ala
1 5 10 15

Val Thr Val Ala Ala Gly Ala Ala Ala Thr Pro Ala Ala Ala Glu
20 25 30

Ala Asp Gly Pro Thr Thr Thr Phe Asp Gly Pro Val Val Ala Glu Gly
35 40 45

Phe Arg Thr Asp Ser Thr Val Lys Ser Ala Phe Phe Lys Thr Thr Ser
50 55 60

Thr Thr Glu His Ala Val Thr Ala Tyr Gln Ala Gly Thr Ser Gly Ser
65 70 75 80

Gly Val Ala Leu Asn Val Val Ser Lys Asn Pro Gly Asp Ser Ala Met
85 90 95

Tyr Leu Ser Gly Thr Glu Lys Ala His Gly Thr Leu Lys Ile Ser His
100 105 110

Thr Gly His Ala Asp Gly Ser Asp Glu Lys Ala Ser Ala Leu Ser Ile
115 120 125

Asp Leu Leu Thr Ala Gly Thr Ala Ala Gln Gly Ile Phe Val Lys Ala

P04568 PCTENGL_ST25_RU

130

135

140

Gly Asn Gly Pro Thr Thr Gly Asn Leu Ile Cys Leu Arg Asn Asn Ala
145 150 155 160

Arg Asp Asp Phe Val Val Lys Gly Ser Gly Arg Val Gly Ile Gly Met
165 170 175

Gly Val Gly Gly Asn Pro Trp Ser Gln Leu His Val Val Gln Gln Pro
180 185 190

Gly Thr Asp Ser Ala Leu Met Val Glu Gly Thr Val Arg Val Val Asp
195 200 205

Val Ala Ser Ala Pro Thr Gly Val Asp Ser Arg Gly Gly Gly Val Leu
210 215 220

Tyr Ala Glu Asn Gly Ala Leu Lys Trp Arg Gly Ser Asp Asn Thr Val
225 230 235 240

Thr Thr Ile Ala Pro Ala
245

<210> 49
<211> 245
<212> PRT
<213> Streptomyces tsukubaensis

<400> 49

Met Ala Val Asn Arg Arg Leu Phe Leu Gly Gly Phe Thr Ala Gly Ala
1 5 10 15

Val Thr Val Ala Ala Gly Thr Ala Thr Pro Ala Ala Ala Ala Ala
20 25 30

Gln Gly Pro Thr Thr Thr Phe Asp Gly Pro Val Val Ala Glu Arg Phe
35 40 45

Ser Thr Asn Ser Thr Val Asn Ser Ala Phe Leu Lys Thr Thr Ser Thr
50 55 60

P04568 PCTENGL_ST25_RU

Thr Glu His Ala Ala Thr Val Tyr Gln Ala Gly Thr Ser Gly Ser Gly
65 70 75 80

Val Ala Leu Asn Ile Val Ser Asp Asn Pro Asp Asn Ser Ala Val Tyr
85 90 95

Leu Thr Gly Arg Glu Lys Thr Arg Gly Thr Leu Lys Ile Ser His Ile
100 105 110

Gly His Ala Asp Gly Ser Asp Ala Asp Ala Ala Ala Val Ser Ile Asp
115 120 125

Leu Lys Thr Ala Gly Thr Ala Thr Gln Gly Ile Phe Leu Thr Ala Thr
130 135 140

Asp Gly Ala Thr Thr Gly Asn Leu Ile Cys Leu Arg Asn Asn Gly Arg
145 150 155 160

Asp Asp Phe Val Val Lys Gly Ser Gly Arg Val Gly Ile Gly Leu Ala
165 170 175

Val Gly Ser Ala Pro Trp Ser Gln Leu His Val Val Gln Arg Pro Gly
180 185 190

Ala Asp Ser Ala Leu Met Val Glu Gly Ala Val Arg Ile Val Asp Ala
195 200 205

Ala Thr Val Pro Thr Ala Val Asp Ser Lys Gly Gly Gly Thr Leu Tyr
210 215 220

Ala Gln Gly Gly Glu Leu Met Trp Arg Ser Ala Asn Gly Asn Val Thr
225 230 235 240

Arg Ile Ala Ser Ala
245

<210> 50

<211> 125

P04568 PCTENGL_ST25_RU

<212> PRT

<213> Streptomyces pristinaespiralis

<400> 50

Phe Asp Gly Pro Val Val Ala Glu Gly Phe Arg Thr Asp Ser Thr Val
1 5 10 15

Lys Ser Ala Phe Phe Lys Thr Thr Ser Thr Thr Glu His Ala Val Thr
20 25 30

Ala Tyr Gln Ala Gly Thr Ser Gly Ser Gly Val Ala Leu Asn Val Val
35 40 45

Ser Lys Asn Pro Gly Asp Ser Ala Met Tyr Leu Ser Gly Thr Glu Lys
50 55 60

Ala His Gly Thr Leu Lys Ile Ser His Thr Gly His Ala Asp Gly Ser
65 70 75 80

Asp Glu Lys Ala Ser Ala Leu Ser Ile Asp Leu Leu Thr Ala Gly Thr
85 90 95

Ala Ala Gln Gly Ile Phe Val Lys Ala Gly Asn Gly Pro Thr Thr Gly
100 105 110

Asn Leu Ile Cys Leu Arg Asn Asn Ala Arg Asp Asp Phe
115 120 125

<210> 51

<211> 131

<212> PRT

<213> Streptomyces tsukubaensis

<400> 51

Phe Asp Gly Pro Val Val Ala Glu Arg Phe Ser Thr Asn Ser Thr Val
1 5 10 15

Asn Ser Ala Phe Leu Lys Thr Thr Ser Thr Thr Glu His Ala Ala Thr
20 25 30

P04568 PCTENGL_ST25_RU

Val Tyr Gln Ala Gly Thr Ser Gly Ser Gly Val Ala Leu Asn Ile Val
35 40 45

Ser Asp Asn Pro Asp Asn Ser Ala Val Tyr Leu Thr Gly Arg Glu Lys
50 55 60

Thr Arg Gly Thr Leu Lys Ile Ser His Ile Gly His Ala Asp Gly Ser
65 70 75 80

Asp Ala Asp Ala Ala Ala Val Ser Ile Asp Leu Lys Thr Ala Gly Thr
85 90 95

Ala Thr Gln Gly Ile Phe Leu Thr Ala Thr Asp Gly Ala Thr Thr Gly
100 105 110

Asn Leu Ile Cys Leu Arg Asn Asn Gly Arg Asp Asp Phe Val Val Lys
115 120 125

Gly Ser Gly
130

<210> 52

<211> 5

<212> PRT

<213> Streptomyces koganeiensis

<400> 52

Phe Asp Gly Pro Val
1 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения гиалуронидазы из *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394, содержащей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 21, включающий в себя следующие шаги:

а) засевают среду бактериальной культуры в биореакторе инокулятом рекомбинантных клеток, содержащих, по меньшей мере, один вектор с последовательностью SEQ ID NO: 41;

б) содержимое биореактора с шага а) подвергают ферментации при pH от 6,7 до 7,1 в присутствии питательного раствора;

с) добавляют к смеси с шага б) индуктор лактозных генов;

д) смесь с шага с) подвергают индукции сроком от 8 до 24 часов;

е) подвергают центрифугированию бактериальные клетки, полученные на шаге д);

ф) выполняют повторное суспензирование сгустков, полученных на шаге е), и подвергают полученную суспензию осмотическому удару;

г) экстрагируют периплазматические протеины путем центрифугирования суспензии с шага ф);

h) очищают фракцию протеина с энзимной активностью гиалуронидазы, полученную на шаге г), с помощью следующей последовательности действий:

(i) выполняют сильную ионообменную хроматографию и изоляцию фракции с энзимной активностью гиалуронидазы;

(ii) выполняют слабую катионообменную хроматографию и изоляцию фракции с энзимной активностью гиалуронидазы; и

(iii) выполняют ароматическую гидрофобную хроматографию и изоляцию фракции с энзимной активностью гиалуронидазы.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что рекомбинантную клетку на шаге а) выбирают из клетки *Escherichia coli* и клетки *Bacillus subtilis*.

3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что в качестве питательного раствора на шаге б) используют раствор глицерина.

4. Гиалуронидаза, полученная из *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394, содержащая последовательность аминокислот SEQ ID NO: 21, в очищенной форме.

5. Полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 17, кодирующую бактериальную гиалуронидазу, содержащую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 21.

6. Рекомбинантный вектор, полученный средствами генной инженерии, содержащий полинуклеотид, охарактеризованный в п. 5.

7. Вектор по п. 6, отличающийся тем, что вектор представляет собой плазмиду.

8. Клетка-хозяин, содержащая вектор, охарактеризованный в п. 6 или п. 7.

9. Композиция, пригодная для фармацевтического или косметического использования, содержащая гиалуронидазу, охарактеризованную в п. 4.

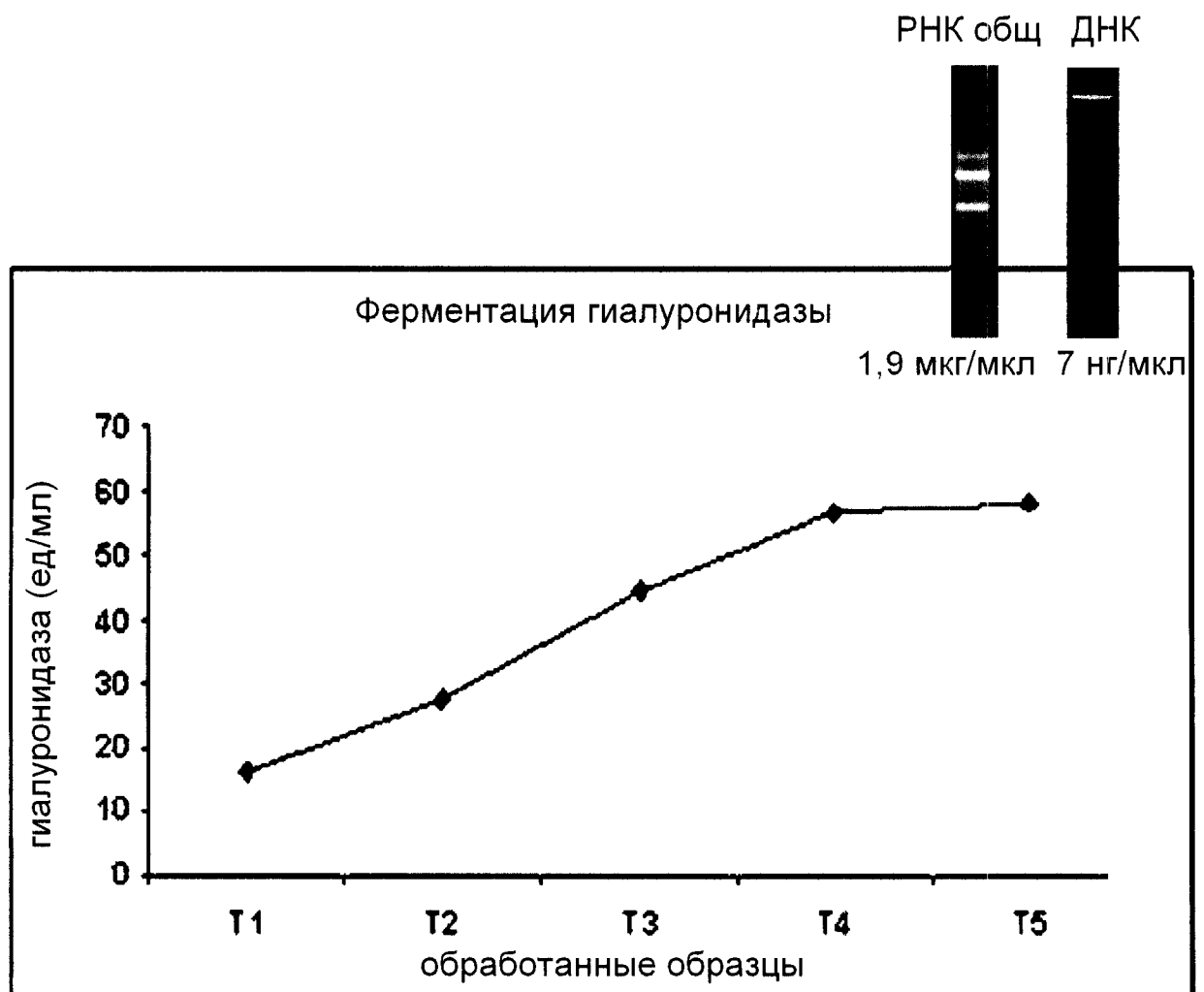
10. Гиалуронидаза по п. 4 или гиалуронидаза, полученная способом, охарактеризованным в п. 1, для использования при лечении и/или предотвращении заболевания или нарушения, возможно, в сочетании с, по меньшей мере, еще одним активным веществом.

11. Гиалуронидаза по п. 10, отличающаяся тем, что заболевание или нарушение представляет собой, по меньшей мере, одно из следующих: отеки, воспалительные состояния, обморожения, твердые опухоли, аллергические реакции, опосредованные IgE, заболевания ротовой полости, внезапные кровоизлияния в стекловидное тело, артериосклероз, нарушения кровяного давления, сердечнососудистые заболевания и нарушения мозгового кровообращения, такие как стеноз мозговых артерий или инсульт, а так же коровий мастит.

12. Нетерапевтическое использование гиалуронидазы, охарактеризованной в п. 4 или гиалуронидазы, полученной способом, охарактеризованным в п. 1, для применения в косметике и/или для эстетического улучшения внешнего вида.

13. Гиалуронидаза, полученная из *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394, содержащая последовательность аминокислот SEQ ID NO: 21, полученная способом, охарактеризованным в любом из п. 1 – п. 3.

pq1/29



T1, T2, T3, T4 обработанные для очистки РНК

T1, T2, T4, T5 обработанные для экстракции ДНК

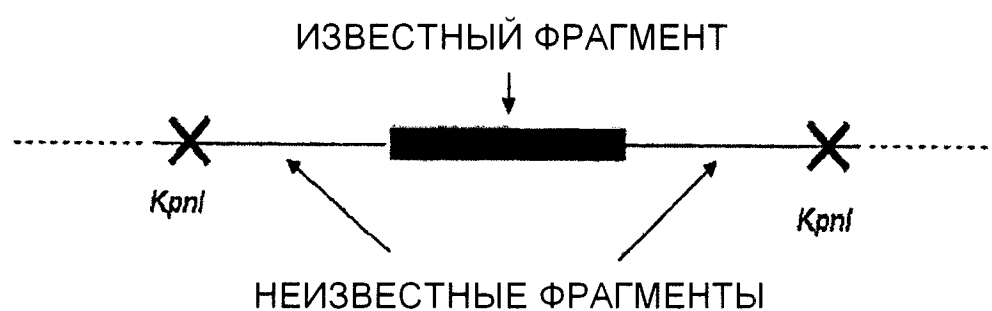
Фиг. 1

1	<u>GAG AAC GGG GCG ACG ACG ACG TTC GAC GGC CCG GTG GCC GCC GAG</u>	45
1	E N G A T T T F D G P V A A E	15
46	AGG TTC AGC GCG GAC ACC ACA CTG GAG GCC GCC TTC CTC AAG ACG	90
16	R F S A D T T L E A A F L K T	30
91	ACC TCG GAG ACG AAC CAC GCG GCG ACC ATC TAC CAG GCC GGT ACG	135
31	T S E T N H A A T I Y Q A G T	45
136	TCG GGC GAC GGC GCG GCG CTG AAC GTG ATC TCC GAC AAC CCG GGC	180
46	S G D G A A L N V I S D N P G	60
181	ACC TCG GCC ATG TAC CTG TCC GGC ACC GAG ACC GCG CGC GGC ACC	225
61	T S A M Y L S G T E T A R G T	75
226	CTG AAG ATC ACC CAC CGC GGG TAC GCC GAC GGC TCC GAC AAG GAC	270
76	L K I T H R G Y A D G S D K D	90
271	GCC GCC GCC CTG TCG CTC GAC CTC CGC GTG GCC GGC ACC GCC GCC	315
91	A A A L S L D L R V A G T A A	105
316	CAG GGC ATC TAC GTC ACG GCG ACG AAC GGC CCG ACC AAG GGC AAC	360
106	Q G I Y V T A T N G P T K G N	120
361	CTG ATC GCC CTG CGC AAC AAC ACG GGC CTG GAC GAC TTC GTC GTC	405
121	L I A L R N N T G L D D F V V	135
406	AAG GGC ACC GGC CGC ATC GGC GTC GGC ATC GAC CGC GCG GCC ACG	450
136	K G T G R I G V G I D R A A T	150
451	CCC CGC GCC CAG GTC CAC ATC GTC CAG CGG GGC GAC GCC CTC GCC	495
151	P R A Q V H I V Q R G D A L A	165
496	GCG CTC CTG GTG GAG GGC TCG GTA CGC <u>ATC GGG AAC GCG GCG ACG</u>	540
166	A L L V E G S V R I G N A A T	180
541	<u>GTG CCG</u> 546	
181	V P	

Кроме различающейся аминокислоты (подчеркнуто), обнаружены все последовательности, полученные в предыдущих протеиновых последовательностях (выделено жирным шрифтом).

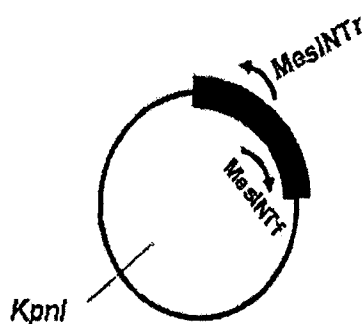
Фиг. 2

a) ЭНЗИМНОЕ ПЕРЕВАРИВАНИЕ ГЕНОМА

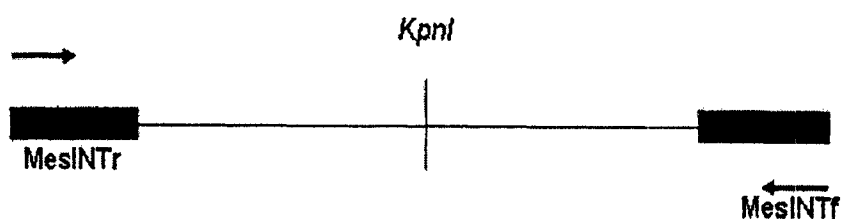


X -- РАЙОН ВОЗМОЖНОЙ РЕСТРИКЦИИ ЭНЗИМОМ

b) ЛИГИРОВАНИЕ ПЕРЕВАРЕННОГО ЭНЗИМА



c) АМПЛИФИКАЦИЯ ПРАЙМЕРОМ, ВНУТРЕННИМ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЗВЕСТНОМУ ФРАГМЕНТУ



Фиг. 3

1	<u>ggta cct</u> gtg acg gct aca ccc cgc ccc aac ctc cgt aca acc att	45
1		15
46	cggg agt tga tgc ttg tgc ttg tcc cgg ggg act cat gcg act cat	90
16		30
91	gcg tcc ctc cgt tca cag cag aca cga gag agt ggg gga cga cgc	135
31		45
136	ATG CCG GTG GCA CGC AGA CTG TTT CTG GGG AGC TTC ACC GCG GGC	180
46	M P V A R R L F L G S F T A G	60
181	GCG GTG ACC GTG GCG ACG GCC GCC GCG ACG GGT ACG GCC TCG GCG	225
61	A V T V A T A A A T G T A S A	75
226	GCC GGG <u>GAG AAC GGC</u> GCG ACG ACC TTC GAC GGC CCG GTG GCC	270
76	A G E N G A T T T F D G P V A	90
271	GCC GAG AGG TTC AGC GCG GAC ACC ACA CTG GAG GCC GCC TTC CTC	315
91	A E R F S A D T T L E A A F L	105
316	AAG ACG ACC TCG GAG ACG AAC CAC GCG GCG ACC ATC TAC CAG GCC	360
106	K T T S E T N H A A T I Y Q A	120
361	GGT ACG TCG GGC GAC GGC GCG GCG CTG AAC GTG ATC TCC GAC AAC	405
121	G T S G D G A A L N V I S D N	135
406	CCG GGC ACC TCG GCC ATG TAC CTC TCC GGC ACC GAG ACC GCG CGC	450
136	P G T S A M Y L S G T E T A R	150
451	GGC ACC <u>CTG AAG ATC ACC CAC</u> CGC GGG TAC GCC GAC GGC TCC GAC	495
151	G T L K I T H R G Y A D G S D	165
496	AAG GAC GCC GCC GCC CTG TCG CTC GAC CTC CGC GTG GCC GGC ACC	540
166	K D A A A L S L D L R V A G T	180
541	GCC GCC CAG <u>GGC ATC TAC GTC</u> ACG GCG ACG AAC GGC CCG ACC AAG	585
181	A A Q G I Y V T A T N G P T K	195
586	GGC AAC CTG ATC GCC CTG CGC AAC AAC ACG GGC CTG GAC GAC TTC	630
196	G N L I A L R N N T G L D D F	210
631	GTC GTC AAG GGC ACC GGC CGC ATC GGC GTC GGC ATC GAC CGC GCG	675
211	V V K G T G R I G V G I D R A	225
676	GCC ACG CCC CGC GCC CAG GTC CAC ATC GTC CAG CCG GGC GAC GCC	720
226	A T P R A Q V H I V Q R G D A	240
721	CTC GCC GCG CTC CTG GTG GAG GGC TCG GTA CGC ATC GGG AAC GCC	765
241	L A A L L V E G S V R I G N A	255
766	GCG ACG <u>GTA CCG</u> ACG TCG GTG GAC AGC TCG GGC GGC GGC GCC CTG	810
256	A T V P T S V D S S G G G A L	270
811	TAC GCG TCG GGC GGC GCC CTG CTG TGG CGC GGC TCC AAC GGC ACG	855
271	Y A S G G A L L W R G S N G T	285
856	GTC ACG ACG ATC GCA CCG GCG tga agt aca gga gag aac agt gca	900
286	V T T I A P A +	300
901	gtt gac gcc cga aga act gtt tgc cgg gag	930
301		

Нуклеиновые кислоты:

- строчными буквами обозначена не кодирующая область, обнаруженная в 5' и 3';
- наклонными буквами обозначена кодирующая область, обнаруженная в 5' и 3' на этих последних шагах обработки;
- жирным шрифтом обозначены начальный (START) и конечный (STOP) кодоны;
- подчеркиванием обозначена последовательность, соответствующая олиго в 5' MesFor2 (жирным шрифтом выделены нуклеотидные и консервативные последовательности) и MesINTf/MesINTR;
- жирным шрифтом с подчеркиванием обозначены точки рестрикции для KpnI.

Аминокислоты:

- жирным шрифтом обозначена область, соответствующая результатам предыдущего протеинового секвенирования;
- жирным шрифтом обозначены области, соответствующие начальному пептиду, обнаруженному на этом последнем шаге обработки.

3	acc att cgg agt tga tgg ttg tgg tcc cgg ggg act cat gcg	47
0		14
48	act cat gcg tcc ctc cgt tca cag cag aca cga gag agt ggg gga	92
15		29
93	cga cgc ATG CCG GTG GCA CGC AGA CTG TTT CTG GGG AGC TTC ACC	137
30	M P V A R R L F L G S F T	44
138	GCG GGC GCG GTG ACC GTG GCG ACG GCC GCC GCG ACG GGT ACG GCC	182
45	A G A V T V A T A A A T G T A	59
183	TCG GCG GCC GGG GAG AAC GGC GCG ACG ACG ACC TTC GAC GGC CCG	227
60	S A A G E N G A T T T F D G P	74
228	GTG GCC GCC GAG AGG TTC AGC GCG GAC ACC ACA CTG GAG GCC GCC	272
75	V A A E R F S A D T T L E A A	89
273	TTC CTC AAG ACG ACC TCG GAG ACG AAC CAC GCG GCG ACC ATC TAC	317
90	F L K T T S E T N H A A T I Y	104
318	CAG GCC GGT ACG TCG GGC GAC GGC GCG GCG CTG AAC GTG ATC TCC	362
105	Q A G T S G D G A A L N V I S	119
363	GAC AAC CCG GGC ACC TCG GCC ATG TAC CTC TCC GGC ACC GAG ACC	407
120	D N P G T S A M Y L S G T E T	134
408	GCG CGC GGC ACC CTG AAG ATC ACC CAC CGC GGG TAC GCC GAC GGC	452
135	A R G T L K I T H R G Y A D G	149
453	TCC GAC AAG GAC GCC GCC GCC CTG TCG CTC GAC CTC CGC GTG GCC	497
150	S D K D A A A L S L D L R V A	164
498	GGC ACC GCC GCC CAG GGC ATC TAC GTC ACG GCG ACG AAC GGC CCG	542
165	G T A A Q G I Y V T A T N G P	179
543	ACC AAG GGC AAC CTG ATC GCC CTG CGC AAC AAC ACG GGC CTG GAC	587
180	T K G N L I A L R N N T G L D	194
588	GAC TTC GTC GTC AAG GGC ACC GGC CGC ATC GGC GTC GGC ATC GAC	632
195	D F V V K G T G R I G V G I D	209
633	CGC GCG GCC ACG CCC CGC GCC CAG GTC CAC ATC GTC CAG CGG GGC	677
210	R A A T P R A Q V H I V Q R G	224
678	GAC GCC CTC GCC GCG CTC CTG GTG GAG GGC TCG GTA CGC ATC GGG	722
225	D A L A A L L V E G S V R I G	239
723	AAC GCC GCG ACG GTA CCG ACG TCG GTG GAC AGC TCG GGC GGC GGC	767
240	N A A T V P T S V D S S G G G	254
768	GCC CTG TAC GCG TCG GGC GGC GCC CTG CTG TGG CGC GGC TCC AAC	812
255	A L Y A S G G A L L W R G S N	269
813	GGC ACG GTC ACG ACG ATC GCA CCG GCG tga agt aca gga gag aac	857
270	G T V T T I A P A *	284
858	agt gca gtt gac	869
285		288

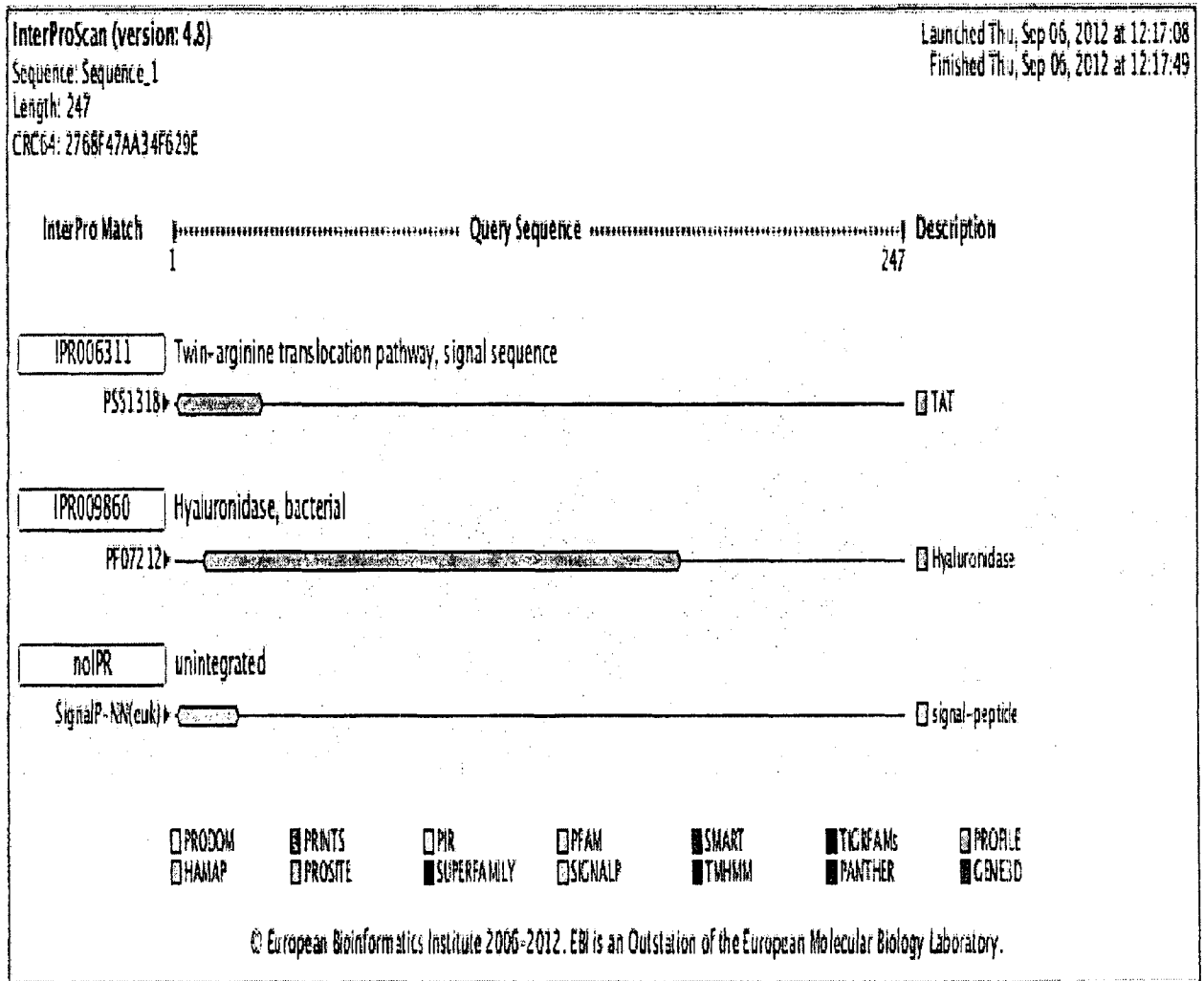
- подчеркиванием выделена область, соответствующая начальному пептиду;
- жирным шрифтом выделена последовательность аминокислот, соответствующая зрелой гиалуронидазе;
- жирным шрифтом строчных букв выделена последовательность нуклеотидов праймеров, использованных для изоляции.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

S.pristinaespiralis	ATGAGCGTGTGCGGGAGGTTGTTCTCTGGGAGGGTTACCGCGGGGGCGGTTACCGTGGCG	60
S.tsukubaensis	ATGGCTGTGAACCGGAGACTCTTCTGGGCGGATTACCGCGGGGGCGGTTACCGTGGCG	60
S.koganeiensis	ATGCCGGTGGCAGCAGACTGTTTCTGGGGAGCTTACCGCGGGGGCGGTTACCGTGGCG	60
Actinoplanes	ATGGCCATGGCAGCAGGCTGTTCTTGGGAAGCTTACCGCGGGGGCGGTTACCGTGGCG	60
	*** ** *	
S.pristinaespiralis	GCGGGCGCGCGCGCG---ACGCCGCGCGCGCGCGCGGAGCGGACGGCCCCGACGACGACG	117
S.tsukubaensis	GCGGGCACTGC---G---ACGCCGCGTGGCGCGCGCGCGCGCGGAGGGCGGACGACGACG	114
S.koganeiensis	ACGGCGCGCGCGGAGCGGTTACGGCTCGGGCGCGCGGGGAGA---ACGGCGCGGACGACGACG	117
Actinoplanes	CTGGGTGAGTCC-----ACCCAGCGCGTGGCGAGACGA-----CCACCAGGACG	105
	** * * * *	
S.pristinaespiralis	TTGACGGTCCGGTGGTGGCGGAGGGTTTCAGGACGGACTCCACCGTCAAGTCCGCTTC	177
S.tsukubaensis	TTGACGGGGCCCGTGGTGGCGGAGGGTTTCAGGACGGACTCCACCGTCAAGTCCGCTTC	174
S.koganeiensis	TTGACGGGGCCCGTGGCGCGGAGGGTTTCAGGACGGACTCCACCGTCAAGTCCGCTTC	177
Actinoplanes	TTTCCGGGACCGGTTGGTGGCGCAACGCTTCAGGACGGACTCCAGCATCGAGTCTGCATAT	165
	** * * * *	
S.pristinaespiralis	TTCAAGACGACGTCGACGACCGAGCAGCGGTTGACGGCCTATCAGGCGCGGACGTCGGGC	237
S.tsukubaensis	CTGAAGACGACGTCACGACCGAGCAGCGCGCGGACCGTCTACGAGCGGGGACCTCGGGC	324
S.koganeiensis	CTCAAGACGACCTCGGACCGAGCAGCGCGGACCGTCTACGAGCGGGGACCTCGGGC	237
Actinoplanes	TTCAAGACGACGTCGTTGACCGACAACGCGGTTGACCGTCTATCAGGCGCGGCTCGGGC	225
	* * * * *	
S.pristinaespiralis	AGCGGCGTGGCCCTGAACGTCGTATCGAAGAACCCGGGTGACTCGGCCATGTATCTCAGT	297
S.tsukubaensis	AGCGGGTGGCCCTGAACGTCGTATCGGAGAACCCGGGACAACTCGGCGGTCTACCTCACC	294
S.koganeiensis	GACGGCGCGCGCTGAACTGATCTCCGACAAACCCGGGACCTCGGCGGTGACCTCTCC	297
Actinoplanes	AGAGGCGTGGCGTTGAACGTCGTCTCCGACAATCCGAGAACTCGGCCATGTATCTGGAG	285
	** * * * *	
S.pristinaespiralis	GGCAGCGGAGAAGGCGCAGCGGACGCTGAAGATCTCGCACAGGGGCCACGCGGACGGCTCG	357
S.tsukubaensis	GGCCGGGAGAAGACCGCGCGGACCGTGAAGATCTCGCACATCGGCCATCGGCGGACGGTCC	354
S.koganeiensis	GGCACCGAGACCGCGCGCGGACCGTGAAGATCAACCCACCGCGGTACGGCGGCTCG	357
Actinoplanes	GGCAGCGGAGACCGCGCGGACGCTGAAGATCAACCCATCAGGGCTACGACGACGGCTCG	345
	** * * * *	
S.pristinaespiralis	GACGAGAAGGCGTCCGCTCTGTGTCGATCGACCTGCTGACGGCGGGGACGGCAGCCAGGGC	417
S.tsukubaensis	GACGCGGAGCGCGCGCGCTGTGTCATCGACTGAAGACGCGCGGACCGCACGCGGACGGC	414
S.koganeiensis	SACAAGGACGCGCGCGCGCTGTGCTGTCGACCTCGCGCTGGCGCGGACCGCGCGGCGG	417
Actinoplanes	GATCGACGCGCGCGCGCTCTGTCGATCGACCTGCGGACGCGGCGGACCGCGCGGACGGC	405
	** * * * *	
S.pristinaespiralis	ATCTTCGTGAAGGCGGGCAACGGGCCCCACCACCGGCAACCTGATCTGCCTGCGCAACAAC	477
S.tsukubaensis	ATCTTCCTGACCGCCACGGACGGTGCCACGACGGGCAATCTGATCTGTCTGCGCAACAAC	474
S.koganeiensis	ATCTACGTCACGGCGACGAAGCGCGCGGACCAAGGGCAACCTGATCGCCCTGCGCAACAAC	477
Actinoplanes	ATCTACCTGACGGCGACGAACGGGCGGACGACGGGCGACCTGATCGCACTGCGCAACAAC	465
	*** * * * *	
S.pristinaespiralis	---GCCCGAGACGACTTCGTCGTCAGGGGAGCGGGCGGGTTCGGTATCGGCAT---GGCGGT	533
S.tsukubaensis	---GGCCGCGACGATTCGTCGTCAGGGGAGCGGGACGGTTCGGTATCGGTCT---GGCGGT	530
S.koganeiensis	ACGGGCGTGGACGACTTCGTCGTCAGGGGACCGGCGCATCGGCGTGGCGATCGACGCG	537
Actinoplanes	CCCGCGGGGATGACTTCATCGTCACCGGTGCGGACGGATCGGTATCGGGGTCAACCGG	525
	* * * * *	
S.pristinaespiralis	G-GGCGGCAACCCCTGGTCGCGCTCCATGTCGTGCGAGCAGCGGGCACCGACTCGGCGC	592
S.tsukubaensis	G-GGCTCGGCCCCCTGGTCCGAGCTCCATGTCGTCCAGCGGGCGGGGCGGACTCCGCGC	589
S.koganeiensis	GCGGCCACGCCCCGCG---CCGAGTCCACATCGTCCAGCGGGGCGGCGGCTCGGCGCGC	595
Actinoplanes	G-GTGACACACCGCGCGGACAGGTGCACATCGTCCAGCAGCGGGAGTCCCCGACGAGG	583
	* * * * *	
S.pristinaespiralis	TGATGGTCGAGGGCACGGTGGCGGTCGTCGACGTGGCCTCCGCGCCACGGGCGGCTCGACT	652
S.tsukubaensis	TGATGGTCGAGGGACGGTGGCGGTCGTCGACGTGGCCTCCGCGCCACGGGCGGCTCGACT	649
S.koganeiensis	TCCTGGTGGAGGGCTCGGTACGATCGGGACCGCGGACGGTACCGACGTGGTGGACA	655
Actinoplanes	TGTTGATCGAGGGCGTGGTGGCGATCGCCAACACCGCCACCGTGGCCACCTCTGCCGACT	643
	* * * * *	
S.pristinaespiralis	CGCGCGCGCGCGCGCGTGTGTACGCGGAGAACGGTGGCGCTGAAGTGGCGCGGCTCCGACA	712
S.tsukubaensis	CCAAGGGCGCGCGGACGCTCTACGACAGGGCGGGGAGCTGATGTGGCGGACGCGGAGC	709
S.koganeiensis	GCTCGGGCGCGCGCGCGCTGTACGCGTGGGCGGCGCGCTGTGTGGCGCGGCTCCACG	715
Actinoplanes	CGTCCGGTGGGGGAAATCTGTATGCGGTGAACGGGCGCTGATGTGGCGGAGTGCCAACG	703
	** * * * *	
S.pristinaespiralis	ACACGGTCACCAACATCGCCCCCGCTGA	741
S.tsukubaensis	GCAACGTCACCGTATCGCCTCGGCCTGA	738
S.koganeiensis	GCACGGTCACGACGATCGCACCGGCGTGA	744
Actinoplanes	GCAAGGTCACGACGATCGCCTCGGCTGA	732
	** * * * *	

- * Консервативные остатки
 : Остатки со строго близкими характеристиками
 . Остатки с нестрогим близкими характеристиками

Фиг. 6 (b)



Последовательность аминокислот гиалуронидазы из *S. Koganeiensis*:



- ☒ Сигнальная последовательность пути транслокации дубль-аргинина
- ☒ Модуль, гомологичный участку связывания гиалуроновой кислоты
- ☒ Каталитический домен Hyaluronidase_1

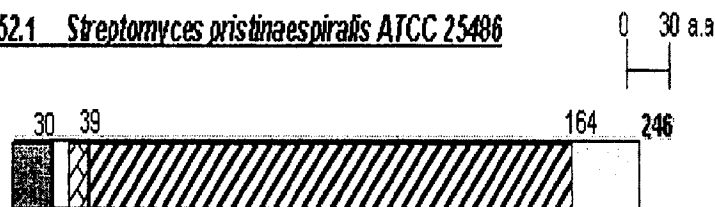
Фиг. 7 (a)

Гиалуроноглюкозаминидаза YP_006266806.1 *Actinoplanes* sp. SE50/110



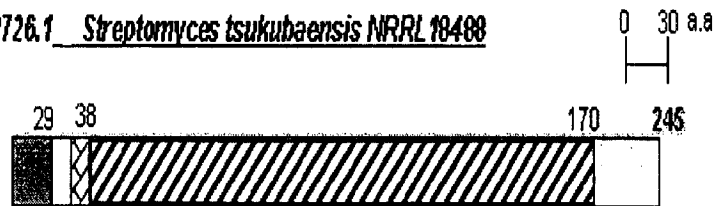
- Сигнальная последовательность пути транслокации дубль-аргинина
- ▨ Модуль, гомологичный участку связывания гиалуроновой кислоты
- ▧ Каталитический домен Hyaluronidase_1

Предсказанный протеин ZP_06911952.1 *Streptomyces pristinaespiralis* ATCC 25486



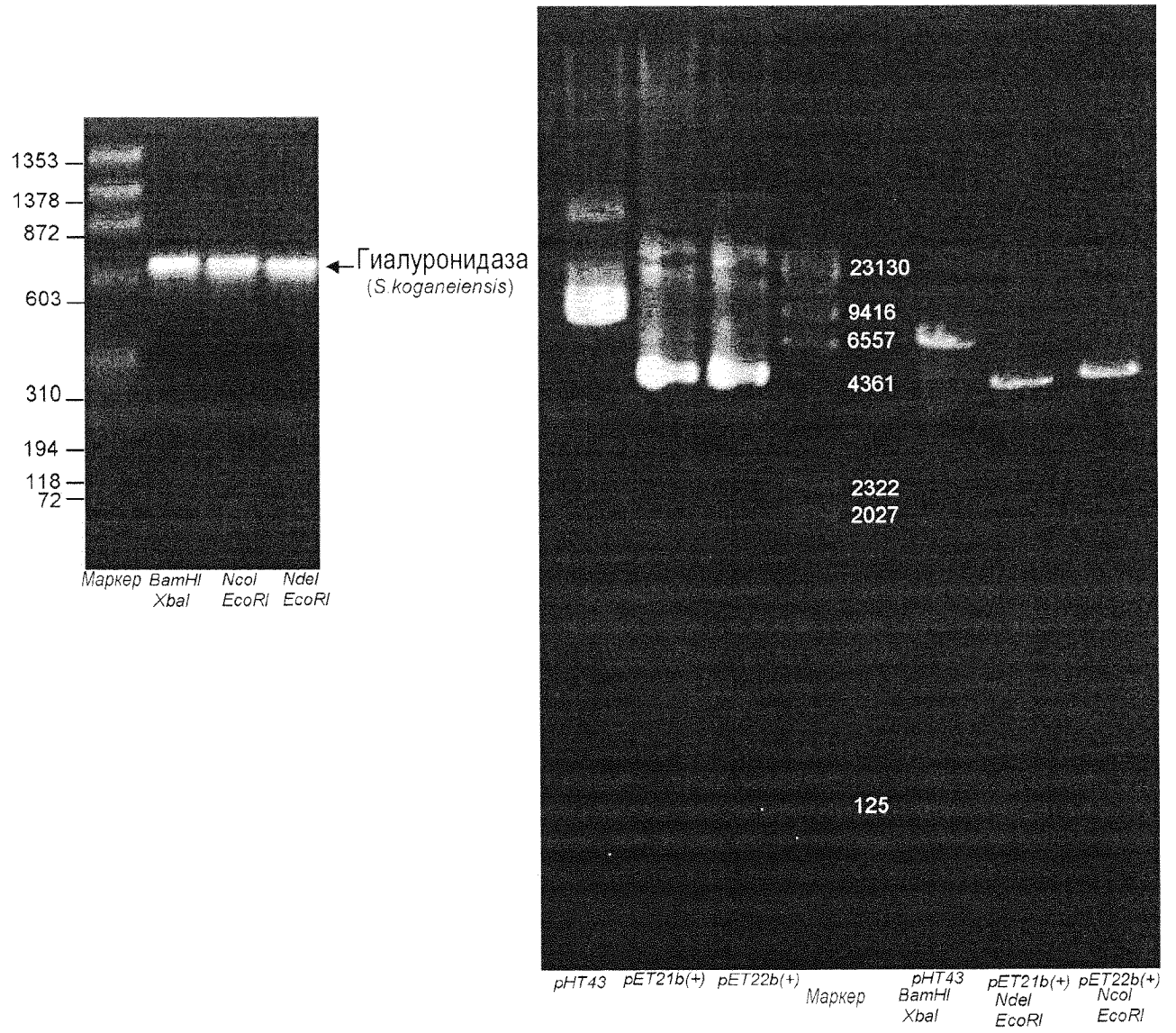
- Сигнальная последовательность пути транслокации дубль-аргинина
- ▨ Модуль, гомологичный участку связывания гиалуроновой кислоты
- ▧ Каталитический домен Hyaluronidase_1

Гипотетический протеин ZP_10072726.1 *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 10400



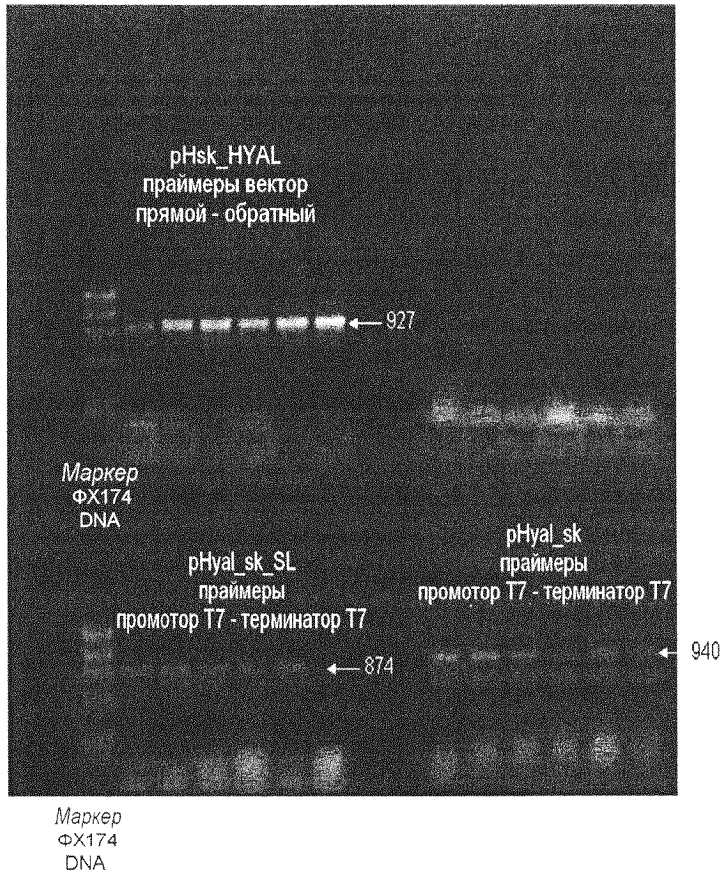
- Сигнальная последовательность пути транслокации дубль-аргинина
- ▨ Модуль, гомологичный участку связывания гиалуроновой кислоты
- ▧ Каталитический домен Hyaluronidase_1

Фиг. 7 (b)

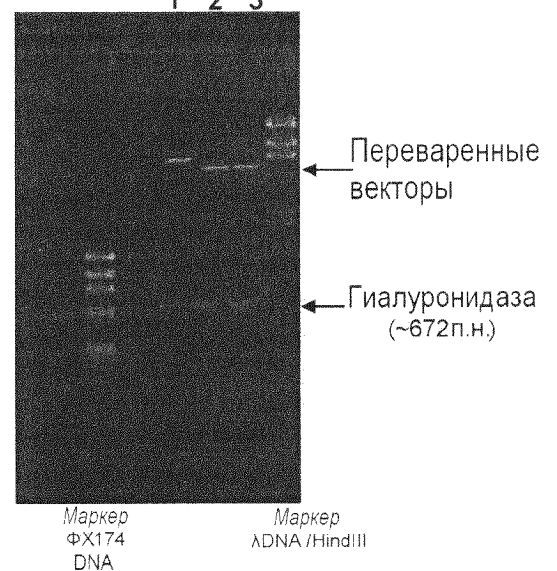


Фиг. 8

(a)



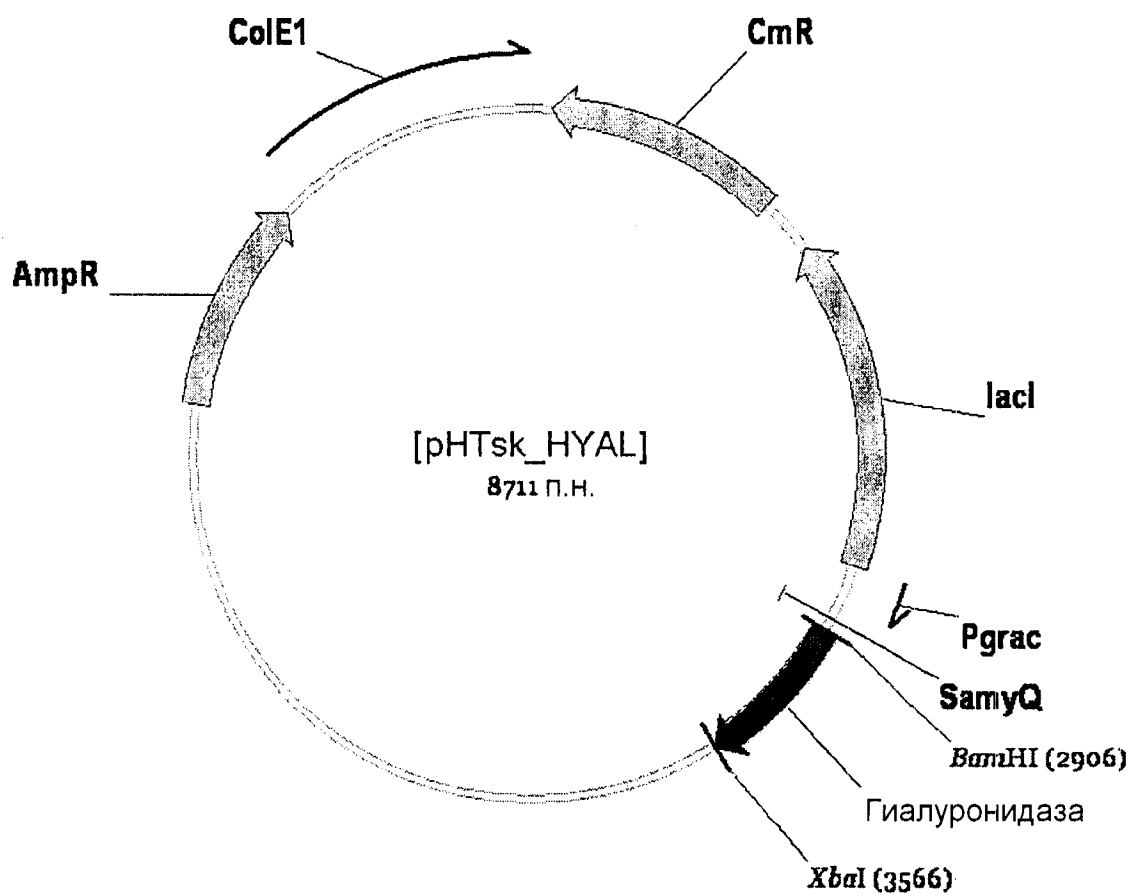
(b)



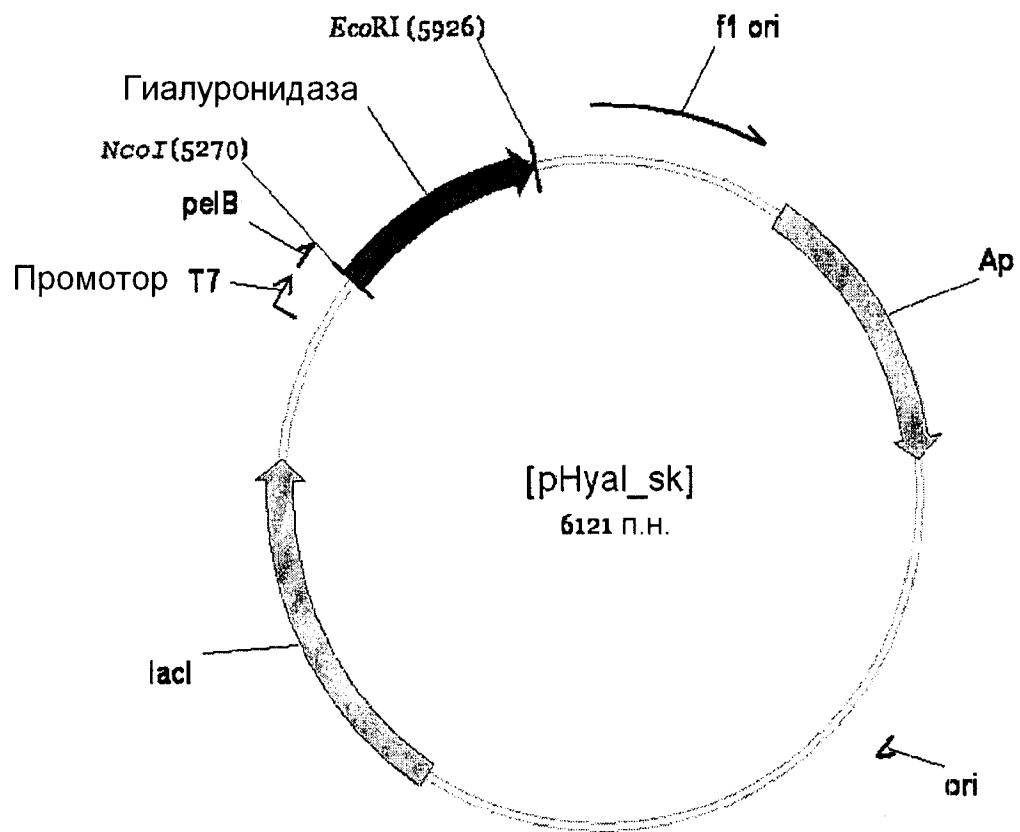
- 1- pHTsk_HYAL, переваренный *BamHI-XbaI*
 2- pHYAL_sk_SL, переваренный *NdeI-EcoRI*
 3- pHYAL_sk, переваренный *NcoI-EcoRI*

Фиг. 9

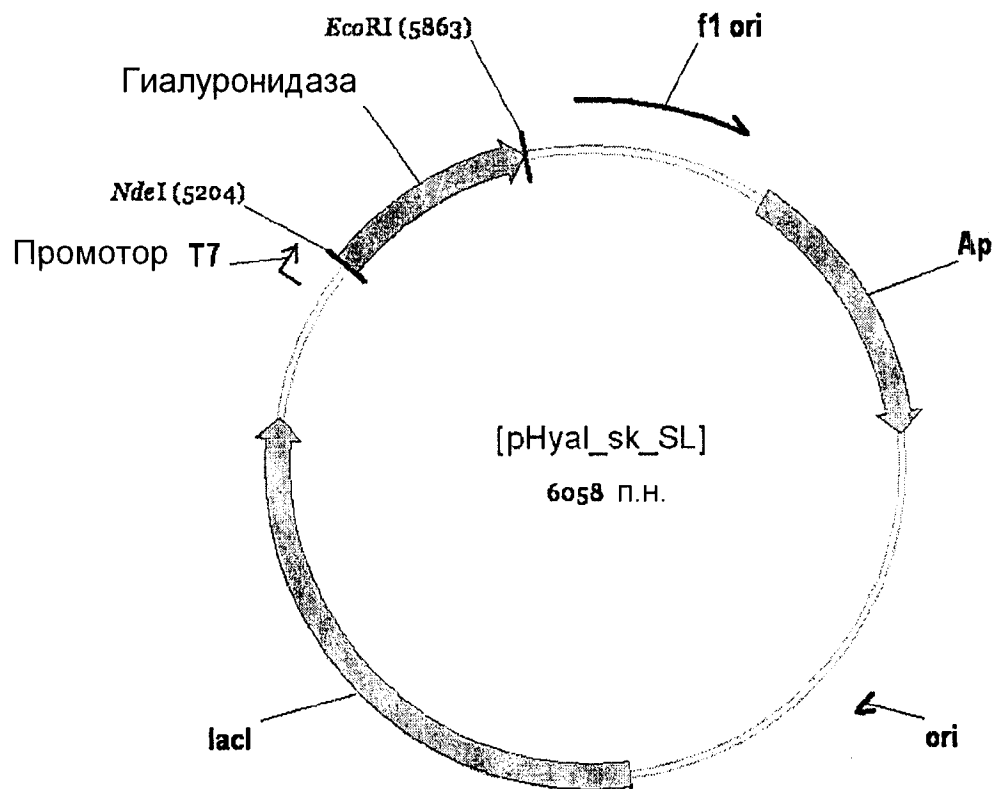
12/29



Фиг. 10



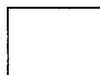
Фиг. 11



Фиг. 12

[pHTsk_HYAL]

2601	AAGGATCAAT GATTCAAAAA CGAAAGCGGA CAGTTTCGTT CAGACTTGTG CTTATGTGCA CGCTGTTATT TGTGAGTTTG CCGATTACAA AAACATCAGC TTCTTAGTTA CTAAGTTTTT GCTTTCGGCT GTCAAAGCAA GTCTGAACAC GAATACACGT GCGACAATAA ACAGTCAAAC GGCTAATGTT TTTGTAGTCG
	BamHI ~~~~~
+2	A G E N G A T T T F D G P V A A E R F S A D T T L E A A F L
2701	CGTAGGATCC GCCGGGGAGA ACGGCGCGAC GACGACCTTC GACGGCCCGG TGGCCGCCGA GAGGTCAGC GCGGACACCA CACTGGAGGC CGCCTTCCTC GCATCCTAGG CGGCCCTCTT TGCCGGCTG CTGCTGGAAG CTGCCGGGCG ACCGGCGGCT CTCCAAGTCG CGCCTGTGGT GTCACCTCCG GCGGAAGGAG
+2	K T T S E T N H A A T I Y Q A G T S G D G A A L N V I S D N P G T S
2801	AAGACGACCT CGGAGACGAA CCACGCGCGG ACCATCTACC AGGCCGGTAC GTCGGGCCAC GCGCGGGCGC TGAACGTGAT CTCGACAAC CCGGGCACCT TTCTGCTGGA GCCTCTGCTT GGTGCGCGC TGGTAGATGG TCCGGCCATG CAGCCCGCTG CCGCGCCCGG ACTTGCACTA GAGGCTGTTG GGCCCGTGA
+2	S A M Y L S G T E T A R G T L K I T H R G Y A D G S D K D A A A L S
2901	CGGCCATGTA CCTCTCCGGC ACCGACACCG CGCGCGGCAC CCTGAAGATC ACCCACCGCG GGTACGCCGA CGGCTCCGAC AAGGACGCGG CGGCCCTGTC GCGGTACAT GGAGAGGCGG TGGCTCTGGC GCGCGCCGTG GGACTTCTAG TGGGTGGCGC CCATGCGGCT GCGGAGGCTG TTCCTCGGC GCGGGGACAG
+2	S L D L R V A G T A A Q G I Y V T A T N G P T K G N L I A L R N N T
3001	GCTCGACCTC CGCCTGGCGG GCACCGCCCG CCAGGGCATC TACGTCAAGG CGACCAACGG CCGGACCAAG GGCAACCTGA TCGCCCTGCG CAACAACAGG CGAGCTGGAG GCGCACCGCG CGTGGCGGGG GGTCGCCGATG ATGCACTGCC GCTGCTTGCC GGGCTGGTTC CGGTGGACT AGCGGGACCG GTTGTGTGTC
+2	G L D D F V V K G T G R I G V G I D R A A T P R A Q V H I V Q R G D
3101	GGCCTGGACG ACTTCGTCGT CAAGGGCACC GCGCGCATCG GCCTCGGCAT CGACCGCGCG GCCACGCCCG GCGCCAGGT CCACATCGTC CAGCGGGGCG CCGGACCTGC TGAAGCAGCA GTTCCCGTGG CCGGCGTAGC CGCAGCCGTA GCTGGCGGCG CGGTGCGGGG CCGGGGTCCA GGTGTAGCAG GTCGCCCCGC
+2	D A L A A L L V E G S V R I G N A A T V P T S V D S S G G G A L Y A
3201	ACGCCCTCGC CGCGCTCCTG GTGGAGGGCT CGGTACGCAT CGGGAACGCC GCGACGGTAC CGACGTCGGT GGACAGCTCG GCGGGCGGCG CCTGTAGCGG TGCGGGAGCG GCGCGAGGAC CACCTCCCGA GCCATGCGTA GCCTTGCGG CGCTGCCATG GCTGCAGCCA CCTGTGAGC CCGCGCGCGG GGGACATGCG
	XbaI ~~~~~
+2	A S G G A L L W R G S N G T V T T I A P A *
3301	GTCGGCGGCG GCCCTGCTGT GGCGCGGCTC CAACGGCAGG GTCACGACGA TCGCACCGGC GTGATCTAGA GTCGACGTCC CCGGGGACGC CGGCCTAATG CAGCCCGCGG CCGGACGACA CCGCGCCGAG GTTGCCGTGC CAGTGTGCT AGCGTGGCG CACTAGATCT CAGCTGCAGG GGCCTCGTC GCGGGATTAC

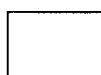


Последовательность, принадлежащая вектору pHT43

Фиг. 13 (а)

[pHyal_sk]

5101	CTCGATCCCG CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATCC CCTCTAGAAA TAATTTTGT TAACTTTAAG AAGGAGATAT GAGCTAGGGC GCTTTAATTA TGCTGAGTGA TATCCCTTA ACACTCGCCT ATTGTTAAGG GGAGATCTTT ATTAACAAAC ATTGAAATTC TTCTCTATA
	NcoI ~~~~~ A G E N G A T T T
+3	
5201	ACATATGAAA TACCTGCTGC CGACCGCTGC TGCTGGTCTG CTGCTCCTCG CTGCCAGCC GCGATGGCC ATGCGCGGG AGAACGGCGC GACGACGACC TGTATACTTT ATGGACGACG GCTGCGGACG ACGACCAGAC GACGAGGAGC GACGGGTCGG CCGCTACCGG TACCGGCCCC TCTTGCCGCG CTGCTGCTGG
+3	F D G P V A A E R F S A D T T L E A A F L K T T S E T N H A A T I Y
5301	TTGACGCCC CGGTGGCCGC CGAGAGGTTT AGCGCGGACA CCACACTGGA GGCGGCTTC CTCAAGACGA CCTCGGAGAC GAACCACGCG GCGACCATCT AAGTGCCGG GCCACCGCG GCTCTCCAAG TCGCGCTGT GGTGTGACCT CCGGCGGAAG GAGTCTGCT SGAGCCTCTG CTTGGTGC GCCTGGTAGA
+3	Y Q A G T S G D G A A L N V I S D N P G T S A M Y L S G T E T A R G
5401	ACCAGGCGCG TACGTCGGGC GACGGCGCG CGCTGAACGT GATCTCCGAC AACCGGGCA CCTCGGCCAT GTACCTCTCC GGCACCGAGA CCGCGCGCGG TGGTCCGGCC ATGACGCGCG CTGCGCGGCC GCGACTTGCA CTAGAGGCTG TTGGGCGCGT GGAGCCGGA CATGGAGAGG CCGTGCTCTT GCGCGCGGCC
+3	G T L K I T H R G Y A D G S D K D A A A L S L D L R V A G T A A Q G
5501	CACCTGAAG ATCACCCACC GCGGGTACGC CGACGGCTCC GACAAGGACG CCGCGGCCCT GTGCTCGAC CTCCCGCTGG CCGGCACCGC CGCCAGGGC GTGGGACTTC TAGTGGGTGG CGCCATGCG GCTGCCGAGG CTGTTCTGCG GGCGCGGGA CAGCGAGCTG GAGGCGCACC GGCCGTGGCG GCGGGTCCCG
+3	I Y V T A T N G P T K G N L I A L R N N T G L D D F V V K G T G R I
5601	ATCTACGTC CGCGACGAA CGGCCGACC AAGGCAACC TGATCGCCCT GCGCAACAAC ACGGCGCTCG ACAGTTCTGT CTCAAGGGC ACGGCGCGCA TAGATGCACT GCGCTGCTT GCGGGCTGG TTCCCGTTGG ACTAGCGGGA CCGGTGTGTT TCCCGGACC TGCTGAAGCA GCAGTTCCCG TGGCCGCGCT
+3	I G V G I D R A A T P R A Q V H I V Q R G D A L A A L L V E G S V R
5701	TCGGCGTCGG CATCGACCG CCGGCCACGC CCGCGGCCA GTCCACATC GTCCAGCGGG GCGACGCCCT CGCGCGGCTC CTGGTGAGG GCTCGGTACG AGCGCGACCG GTAGTGGCG CGCGGTGCG GGGCGGGGT CCAGGTGTAG CAGGTGCGCC CGCTGCGGGA CGGGCGGAG GACCACTCC CGAGCCATGC
+3	R I G N A A T V P T S V D S S G G G A L Y A S G G A L L W R G S N G
5801	CATCGGGAAC GCGCGACGG TACCGACGTC GGTGGACAGC TCGGGCGCG GCGCCCTGTA CGCTGCGGG GCGGCCCTCG TGTTGGCGGG CTCCAACGGC GTAGCCCTTG CCGCGCTGCC ATGGCTGAG CCACCTGTG AGCCCGCGCG CCGGGACAT GCGCAGCCCG CCGCGGACG ACACCGCGCC GAGTTGCGG
	EcoRI ~~~~~
+3	T V T T I A P A *
5901	ACGGTCACGA CGATCGACCC GCGGTGAAA TTGAGCTCC GTCGACAAGC TTGGGCGCG ACTCGAGCAC CACCAACC ACCACTGAGA TCCGGCTGCT TGCCAGTGCT GTAGCGTGG CCGCACTTT AAGCTCGAGG CAGCTGTTCG AACCGCGCG TGAGCTCGTG GTGGTGGTG TGCTGACTCT AGGCGGACGA
6001	AACAAAGCCC GAAAGGAAGC TGAGTTGGCT GCTGCCACCG CTGAGCAATA ACTAGCATAA CCCCTTGGGG CTTCTAAACG GGTCTTGAGG GGTTTTTTGC TTGTTTCGGG CTTTCTTCG ACTCAACCGA CGACGTTGG GACTCGTTAT TGATCGTATT GGGGAACCC GGAGATTTGC CCAGAACTCC CCAAAAACG
6101	TGAAAGGAGG AACTATATCC GGAT ACTTTCCTCC TTGATATAGG CCTA



Последовательность, принадлежащая вектору pET22b(+)

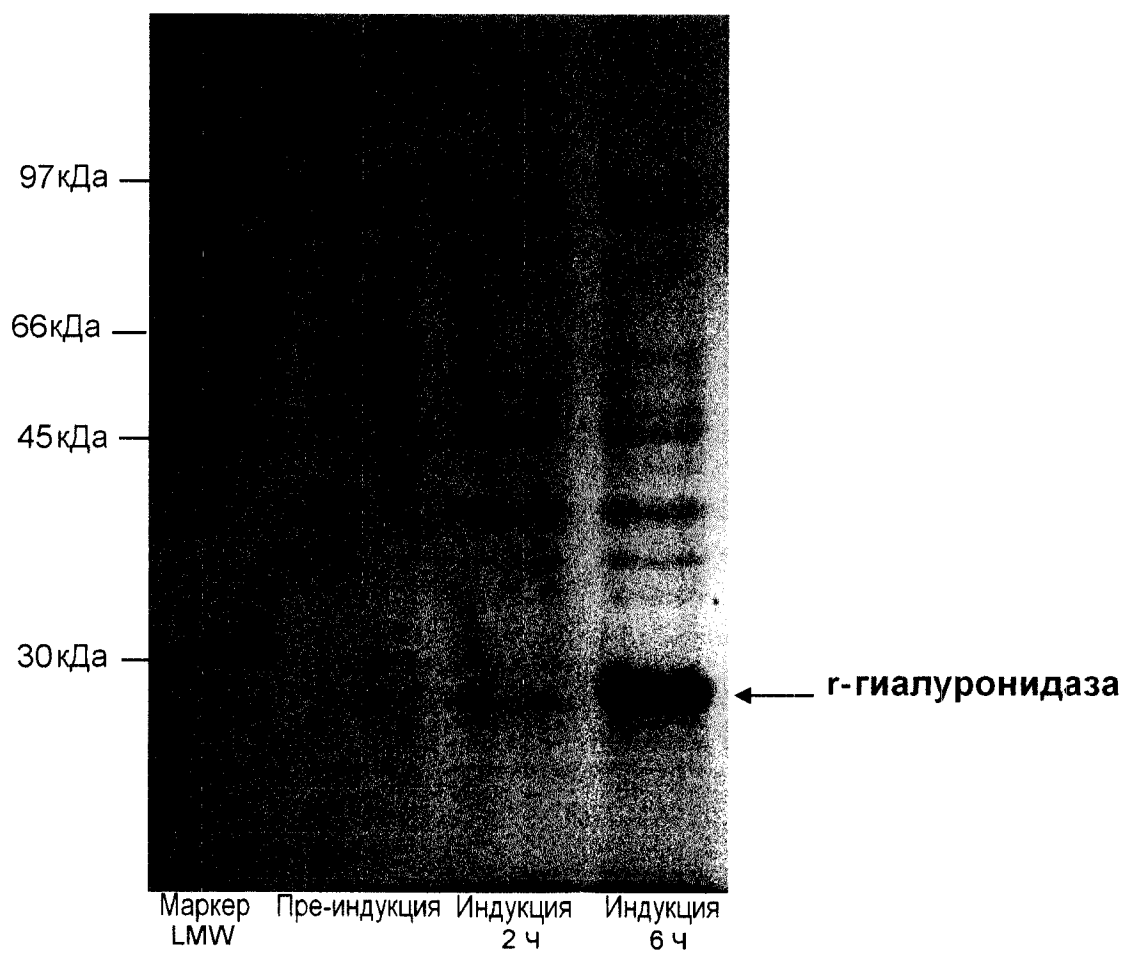
[pHyal_sk_SL]

5101	CTCGATCCCG CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGGAAT TGTGAGCGGA TAACAATTCC CCTCTAGAAA TAATTTTGT TAACTTTAAG AAGGAGATAT GAGCTAGGGC GCTTTAATTA TGCTGAGTGA TATCCCCTTA AACTCGCCT ATTGTTAAGG GGAGATCTTT ATTAACAACAA ATTGAATTC TTCCTCTATA
	NdeI ~~~~~
+3	A G E N G A T T T F D G P V A A E R F S A D T T L E A A F L K
5201	ACATATGCC GGGGAGAACG GCGGACGAC GACCTTCGAC GGCCCGGTGG CCGCCGAGAG GTTCAGCGCG GACACCACAC TGGAGGCCGC CTTCTCAAG TGTATACCG CCCTCTTGC CCGCTGCTG CTGGAAGCTG CCGGGCCACC GCGGCTCTC CAAGTCGCGC CTGTGGTGTG ACCTCGGCG GAAGGAGTTC
+3	T T S E T N H A A T I Y Q A G T S G D G A A L N V I S D N P G T S A
5301	ACGACCTCGG AGACGAACCA CCGGCGGACC ATCTACCAGG CCGGTACGTC GGGCGACGGC GCGGCGCTGA ACGTGATCTC CGACACCCCG GGCACCTCGG TGCTGGAGCC TCTGCTTGGT CCGCCGCTGG TAGATGGTCC GGCCATGCAG CCCGCTGCCG CCGCGGACT TGCCTAGAG GCTGTGGGC CCGTGGAGCC
+3	A M Y L S G T E T A R G T L K I T H R G Y A D G S D K D A A A L S L
5401	CCATGTACCT CTCGCGCACC GAGACCGCG CCGGCACCTT GAAGATCACC CACCGCGGGT ACGCCGACGG CTCGACACAG GACGCGCCCG CCCTGTGCT GGTACATGGA GAGGCCGTGG CTCTGGCGCG CCGCGTGGGA CTCTAGTGG GTGGCGCCCA TCGGCTGCC GAGGCTGTTC CTGCGGCGGC GGGACAGCGA
+3	L D L R V A G T A A Q G I Y V T A T N G P T K G N L I A L R N N T G
5501	CGACCTCCGC GTGGCCGGCA CCGCCGCCCA GGGCATCTAC GTCACGGCGA CGAACGGCCC GACCAAGGGC AACCTGATCG CCCTGCGCAA CAACACGGGC GCTGGAGGCG CACCGGCCGT GCGGCGGGT CCGTAGATAG CAGTGCCGCT GCTTGCCGGG CTGCTTCCCG TTGGACTAGC GGGACGCGTT GTTGTGCCCC
+3	L D D F V V K G T G R I G V G I D R A A T P R A Q V H I V Q R G D A
5601	CTGGACGACT TCGTGTCAA GGGCACCAGC CGCATCGGCG TCGGCATCGA CCGCGCGGCC ACGCCCGCG CCGAGGTCCA CATGTCCAG CCGGCGGACG GACCTGCTGA AGCAGCAGTT CCGTGGCCG GCGTAGCCG AGCCGTAGCT GCGCGCCCG TCGGGGCGC GGGTCCAGGT GTAGCAGGTC GCGCCGCTGC
+3	A L A A L L V E G S V R I G N A A T V P T S V D S S G G G A L Y A S
5701	CCCTCGCCGC GCTCCTGGTG GAGGGCTCGG TACGCATCGG GAACGCGCG ACGGTACCGA CGTCGTGGA CAGCTCGGC GCGGCGCCC TGTACCGCTC GGGAGCGCG CGAGGACCAC CTCCGAGCC ATGCGTAGCC CTTGCGGCG TGCATGGCT GCAGCCACT GTGAGCCCG CCGCGCGGG ACATGCGCAG
	EcoRI ~~~~~
+3	S G G A L L W R G S N G T V T T I A P A *
5801	GGGCGGCGCC CTGCTGTGCC CCGGCTCCA CGGCACGGTC ACGACGATCG CACCGCGCTG ABAATTCGAG CTCGTCGAC AAGCTTGGG CCGCACTCGA CCGCGCGCG GACGACACCG CCGGAGGTT GCGTGCCAG TGCTGTAGC GTGGCCGAC TCTTAAGCTC GAGGAGCTG TTCGAACGCC GCGGTGAGCT
5901	GCACCACCAC CACCACCACT GAGATCCGGC TGCTAACAAA GCGCGAAAGG AAGCTGAGTT GGTGCTGCC ACCGCTGAGC AATAACTAGC ATAACCCCTT CGTGGTGGTG GTGGTGGTGA CTCTAGGCGC ACGATTGTTT CCGGCTTTCC TTCGACTCAA CCGACGACGG TGGCGACTCG TTATTGATCG TATTGGGGAA

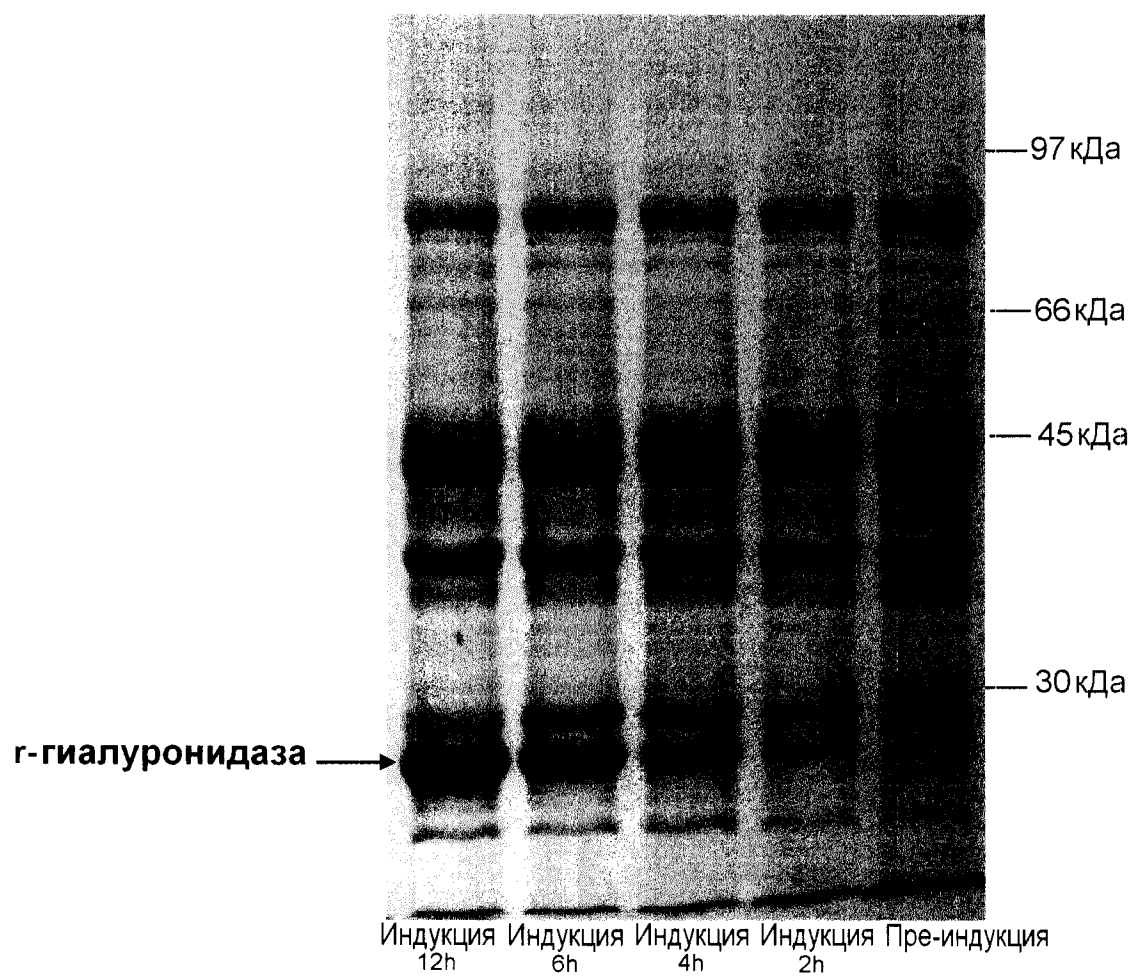


Последовательность, принадлежащая вектору pET21b(+)

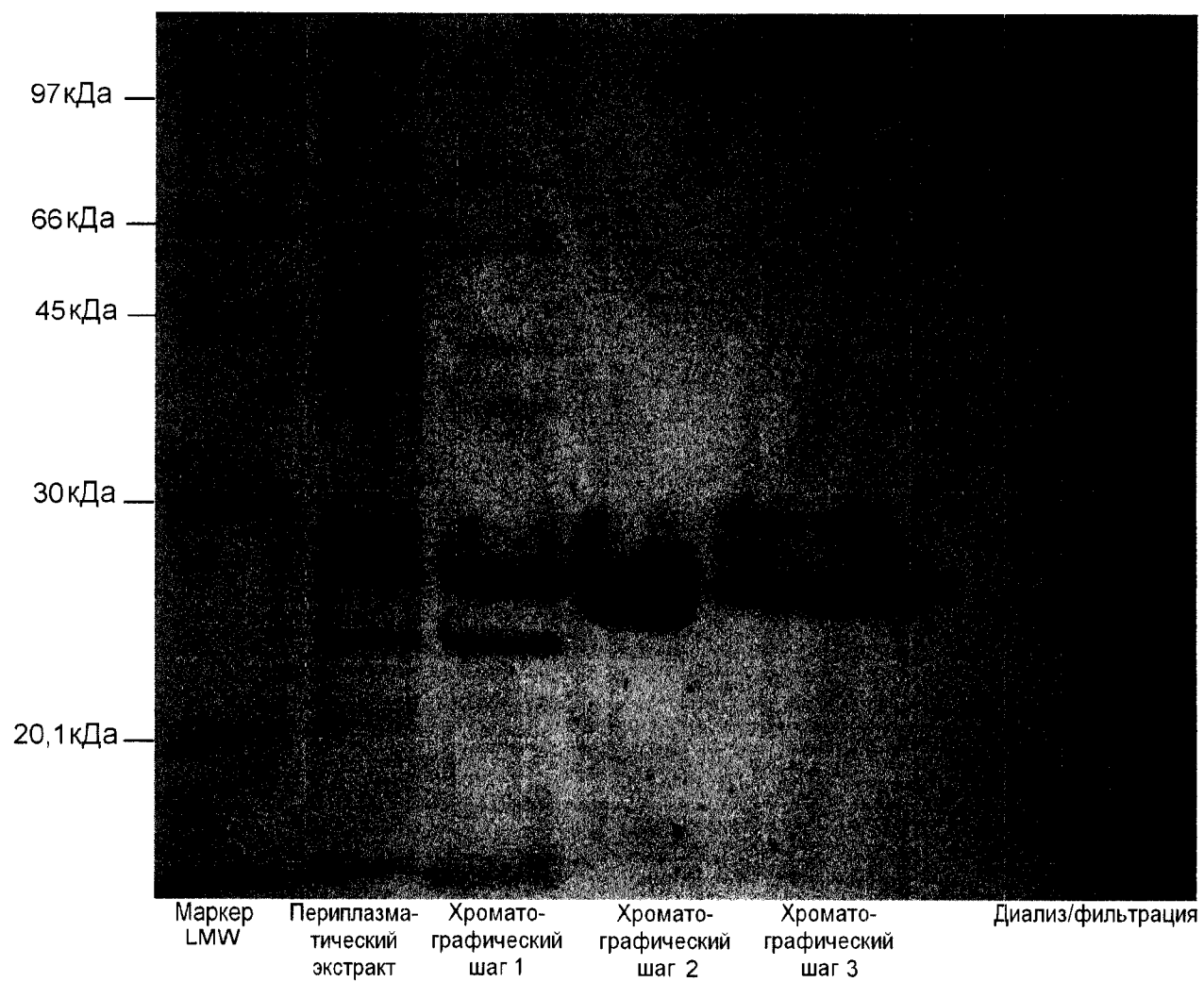
Фиг. 13 (с)



Фиг. 14

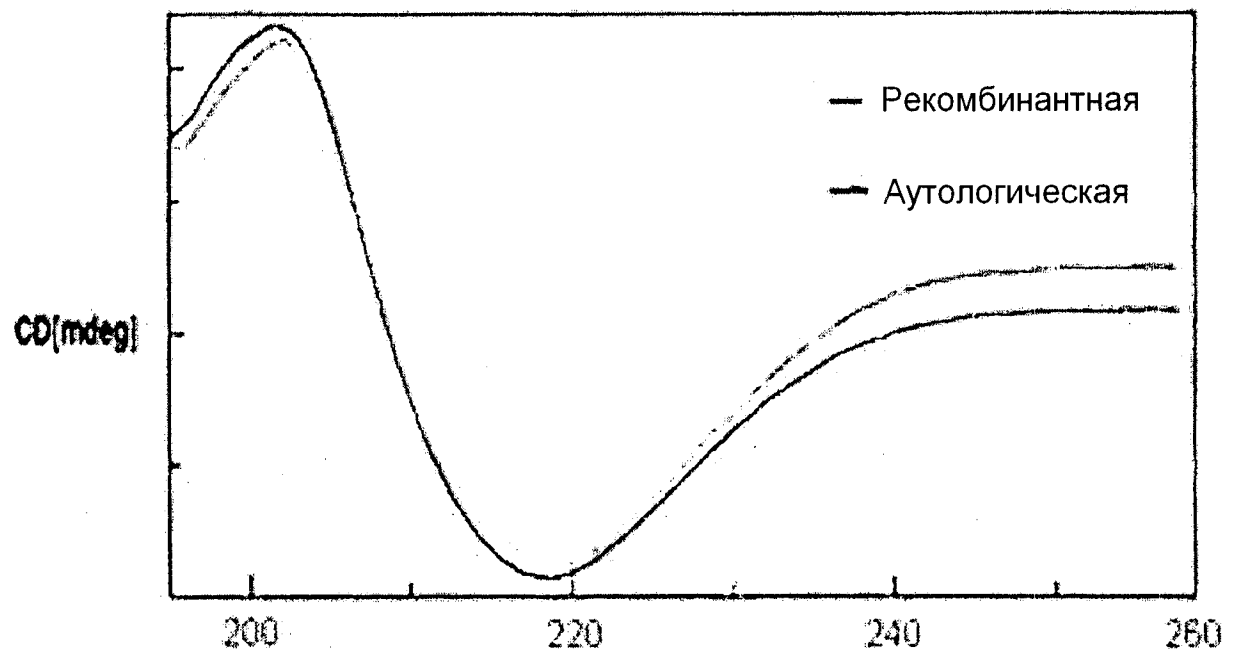


Фиг. 15



Фиг. 16

(a)

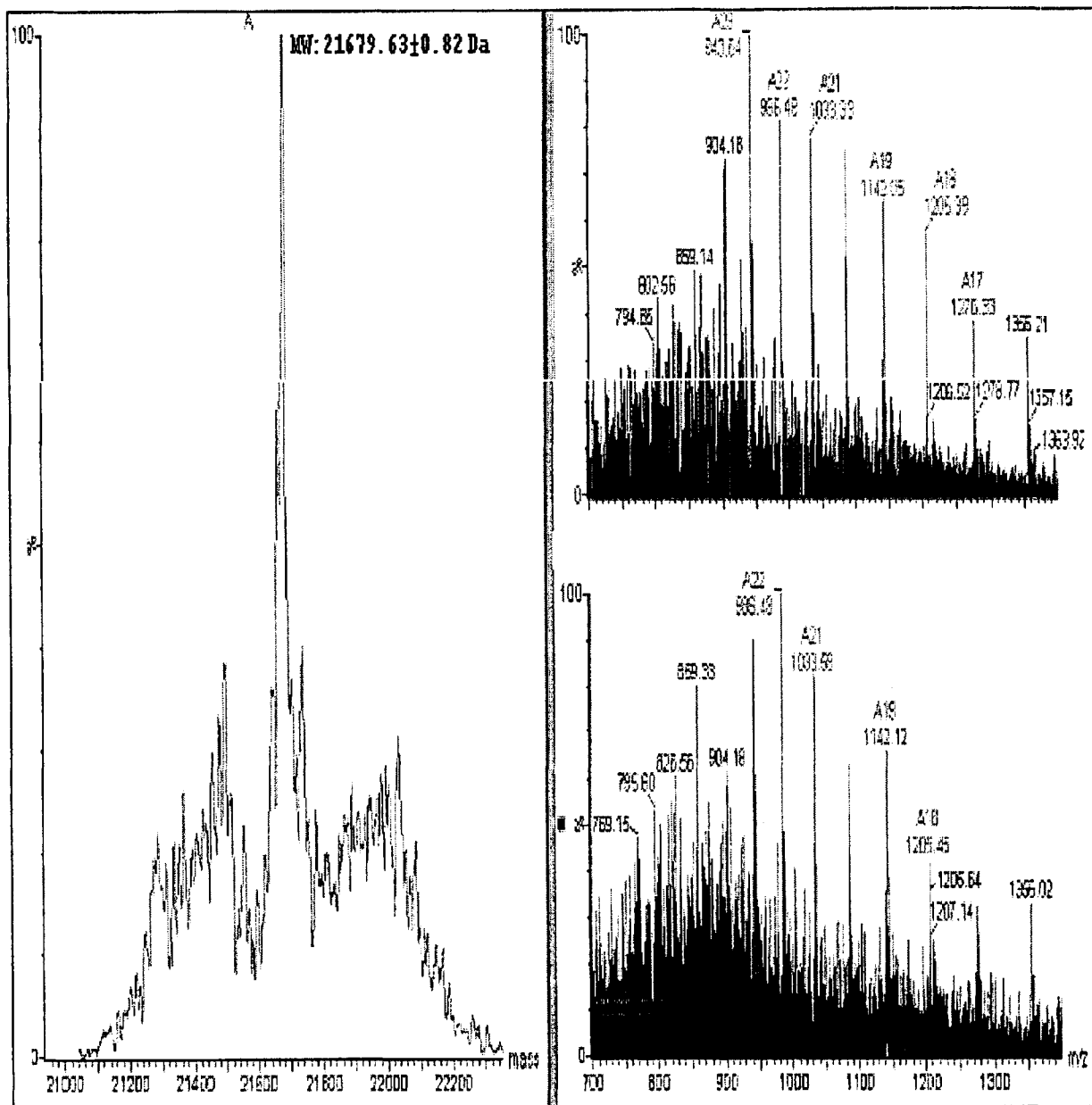


(b)

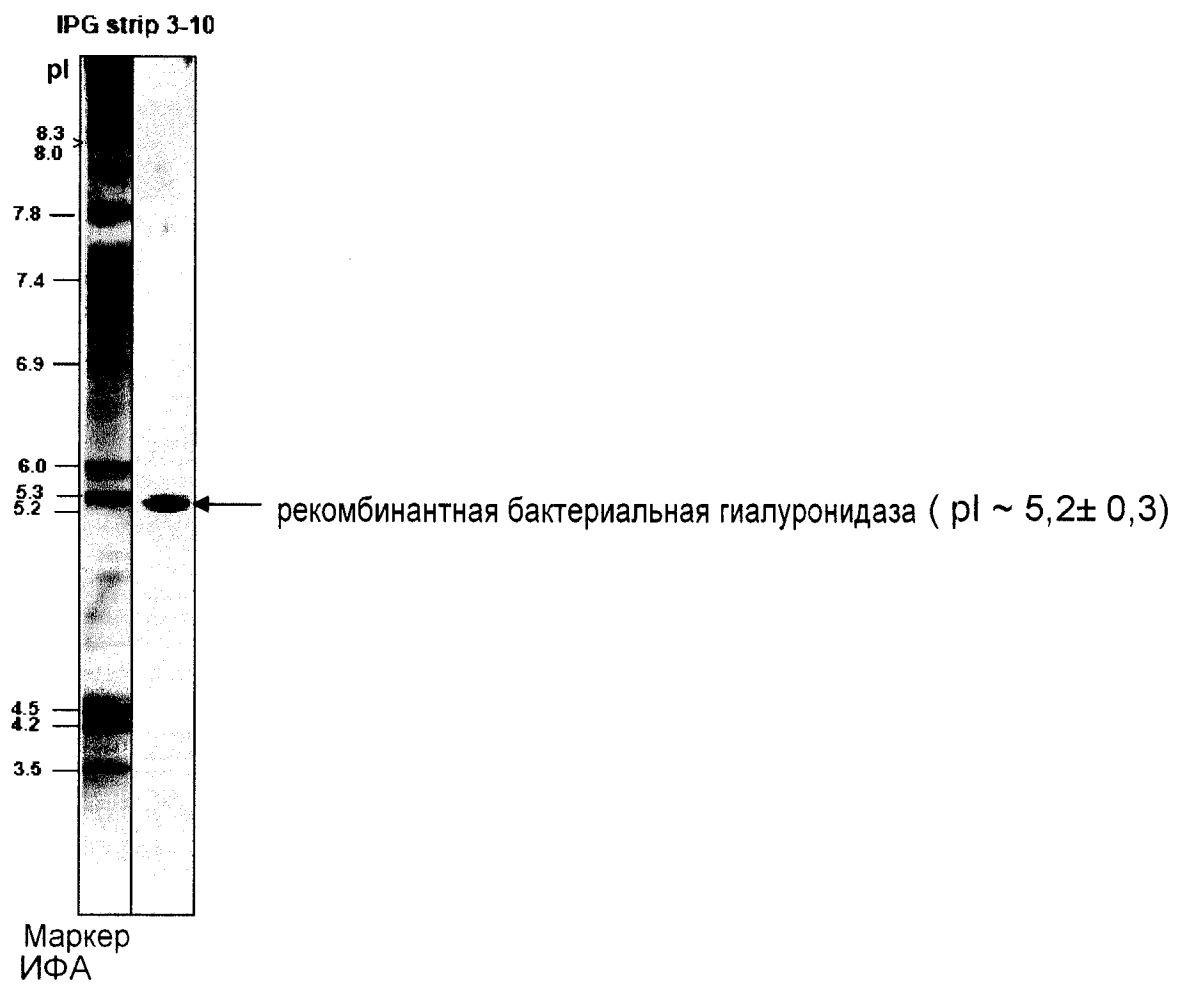


Фиг. 17

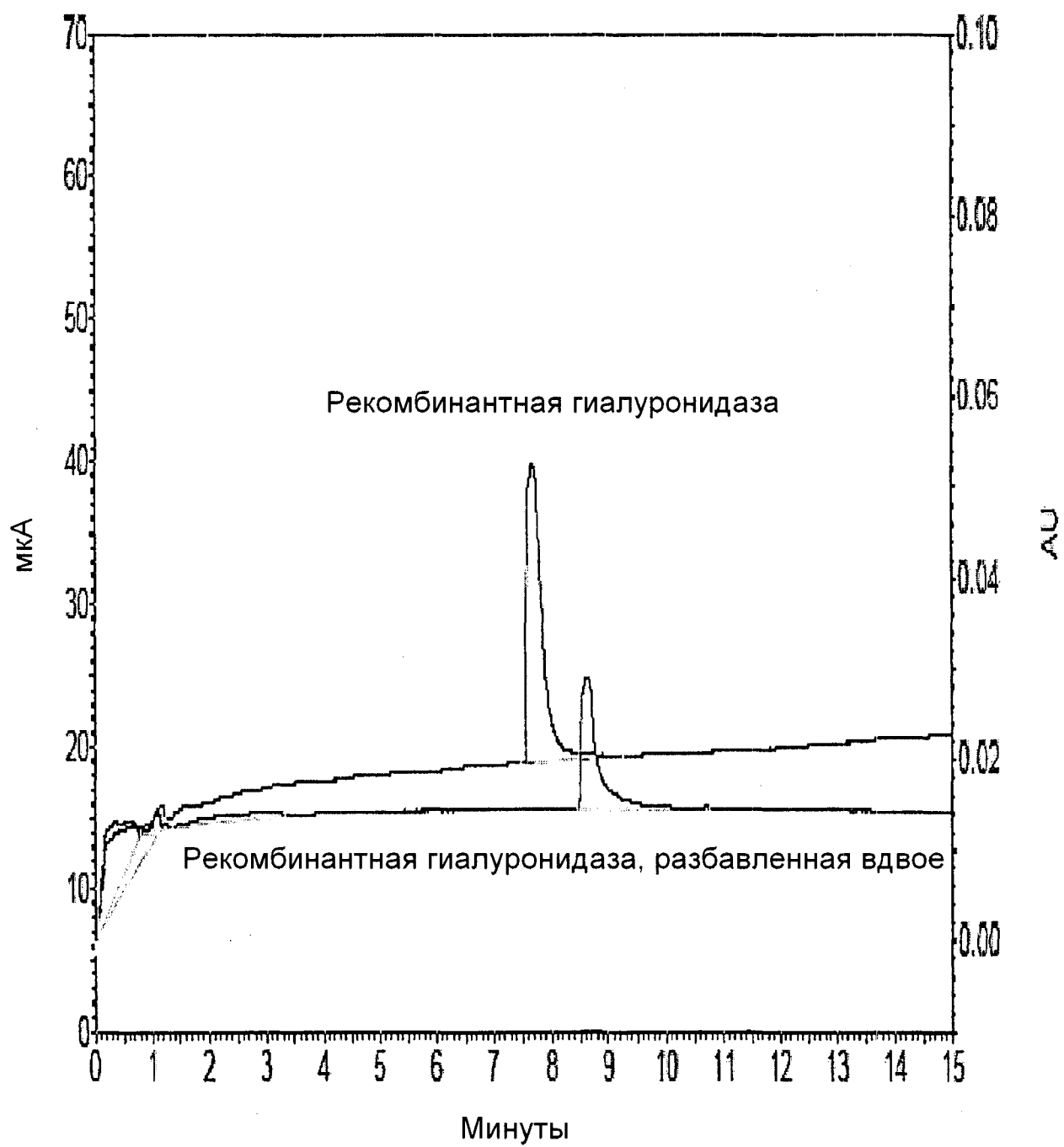
22/29



Фиг. 18



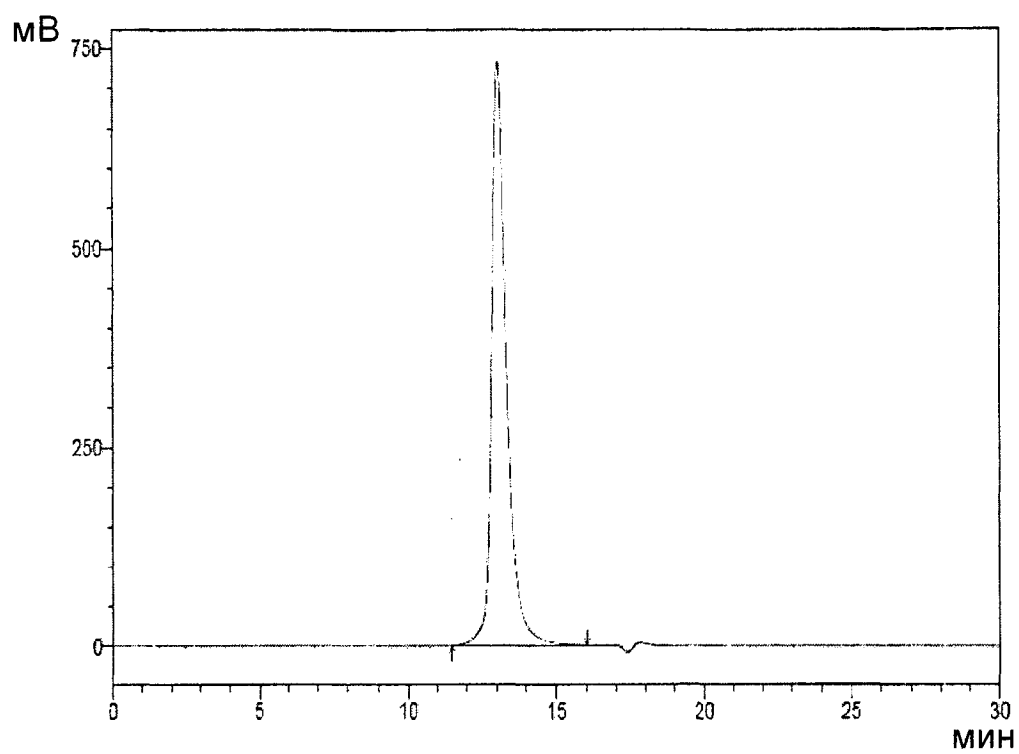
Фиг. 19



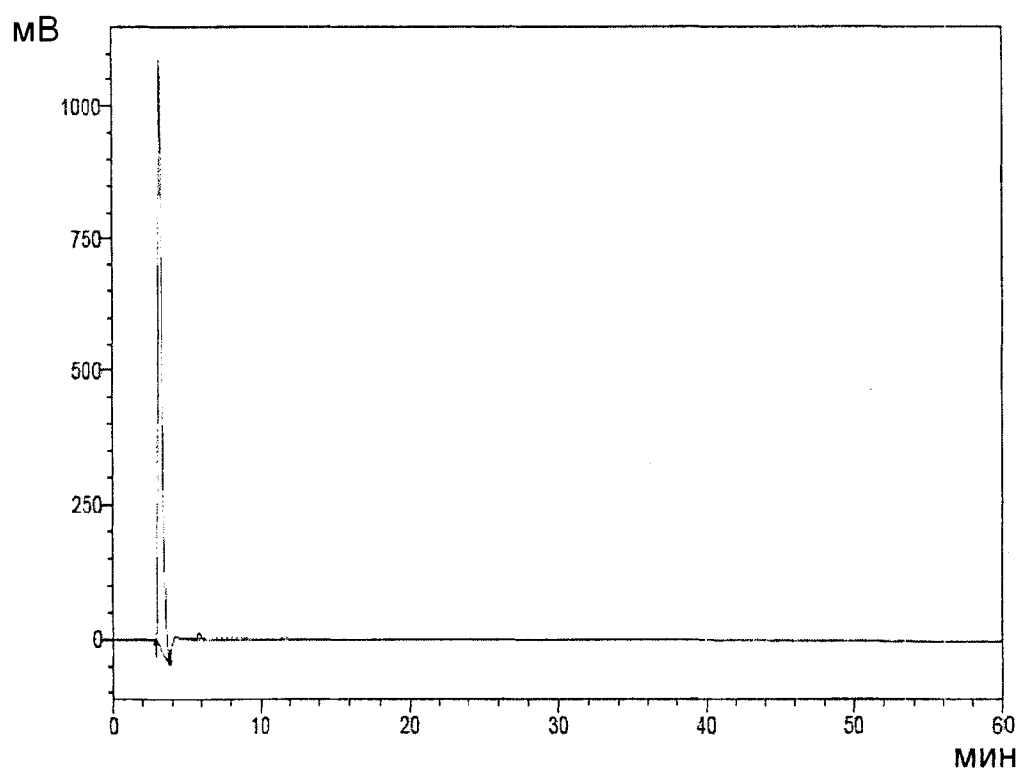
Фиг. 20

25/29

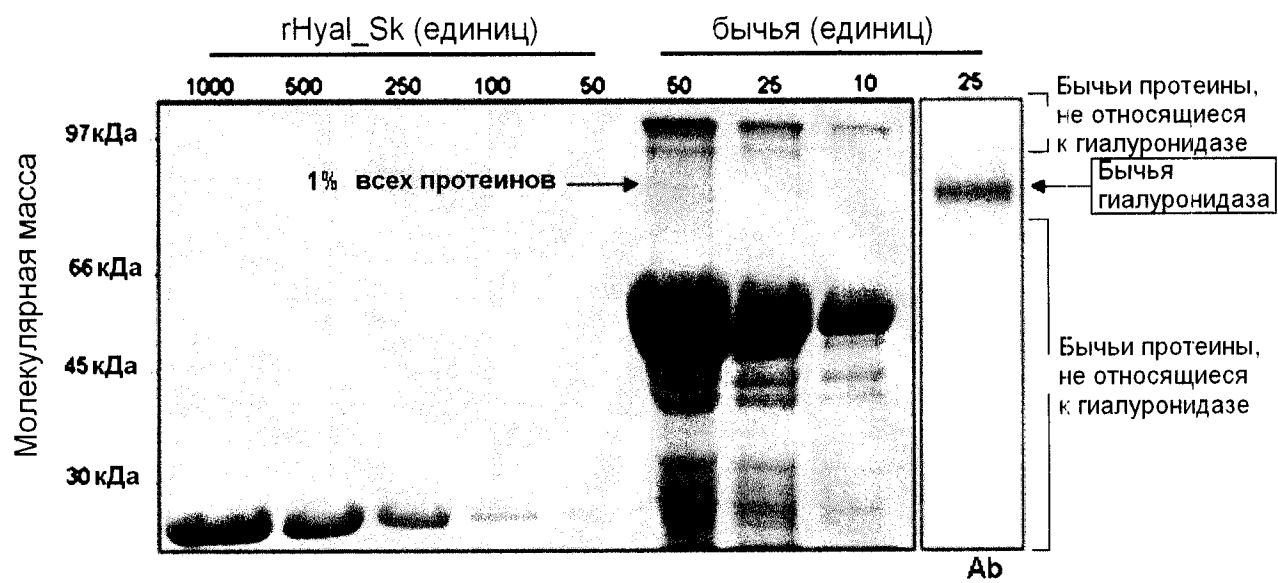
(a)



(b)

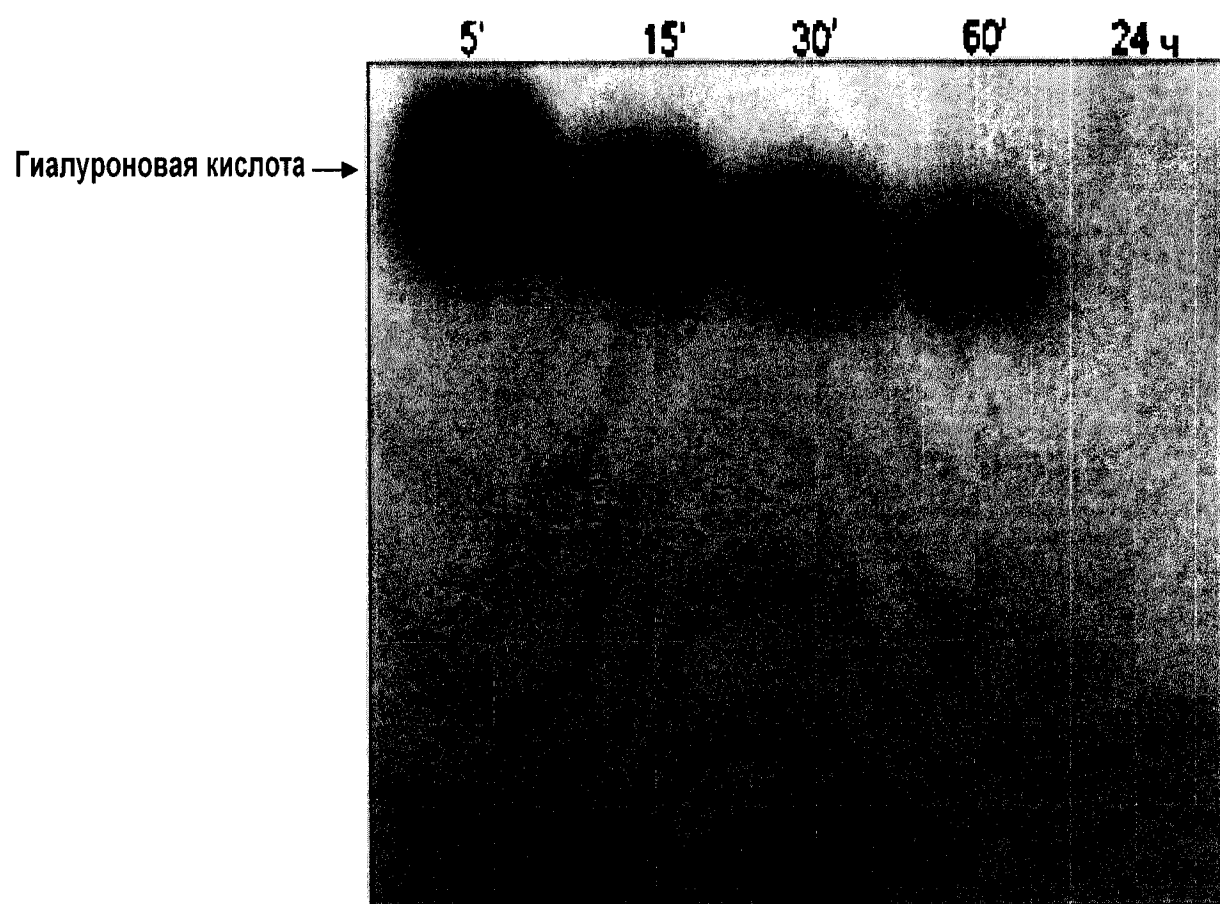


Фиг. 21

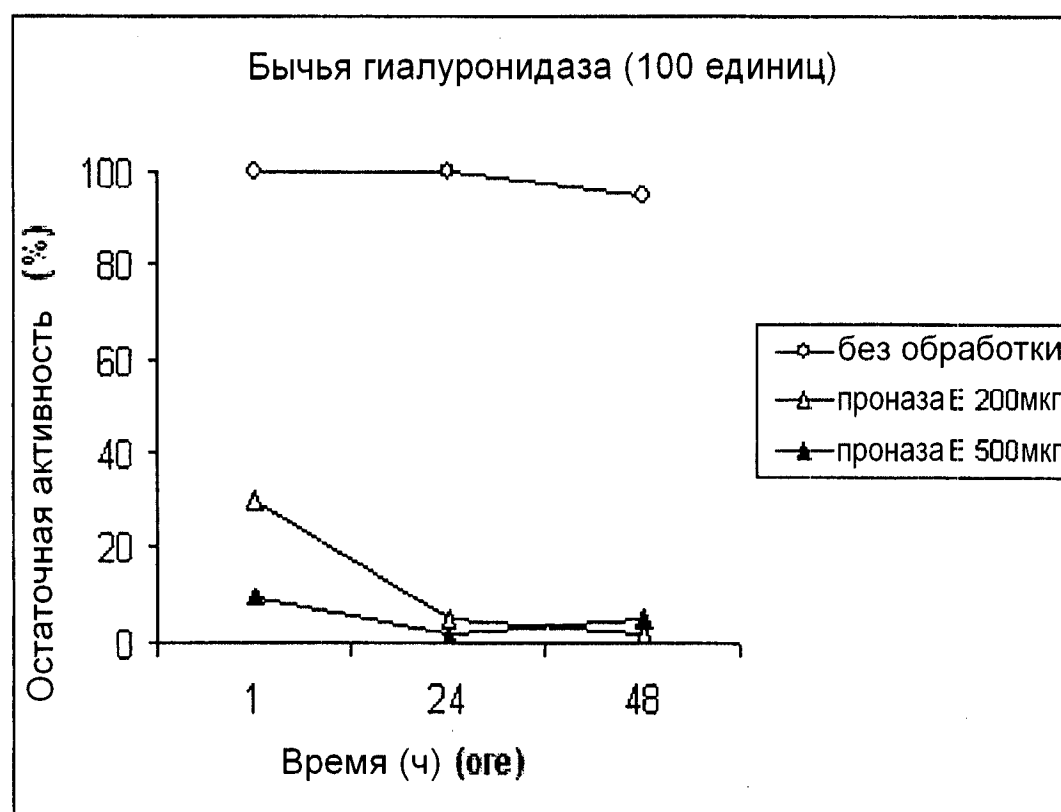
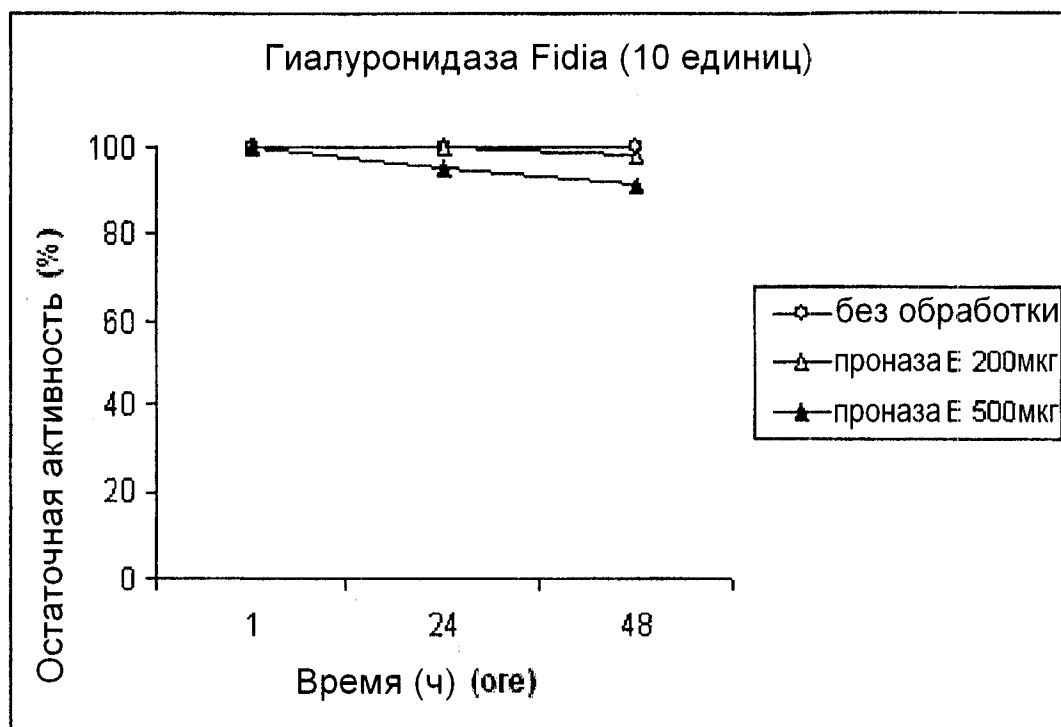


Фиг. 22

27/29

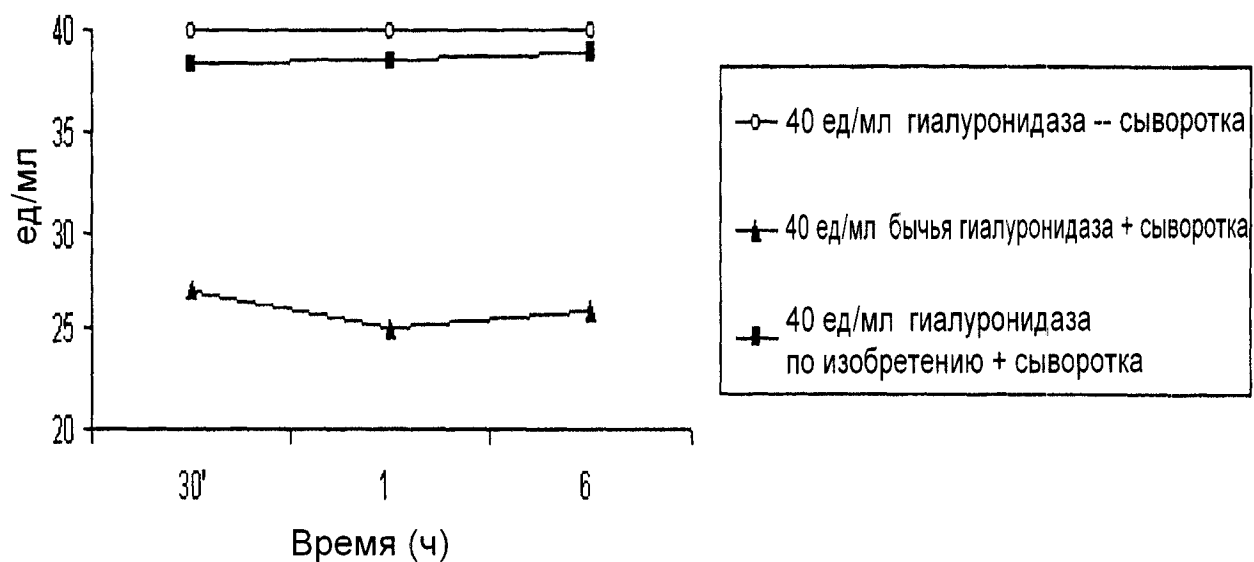


Фиг. 23

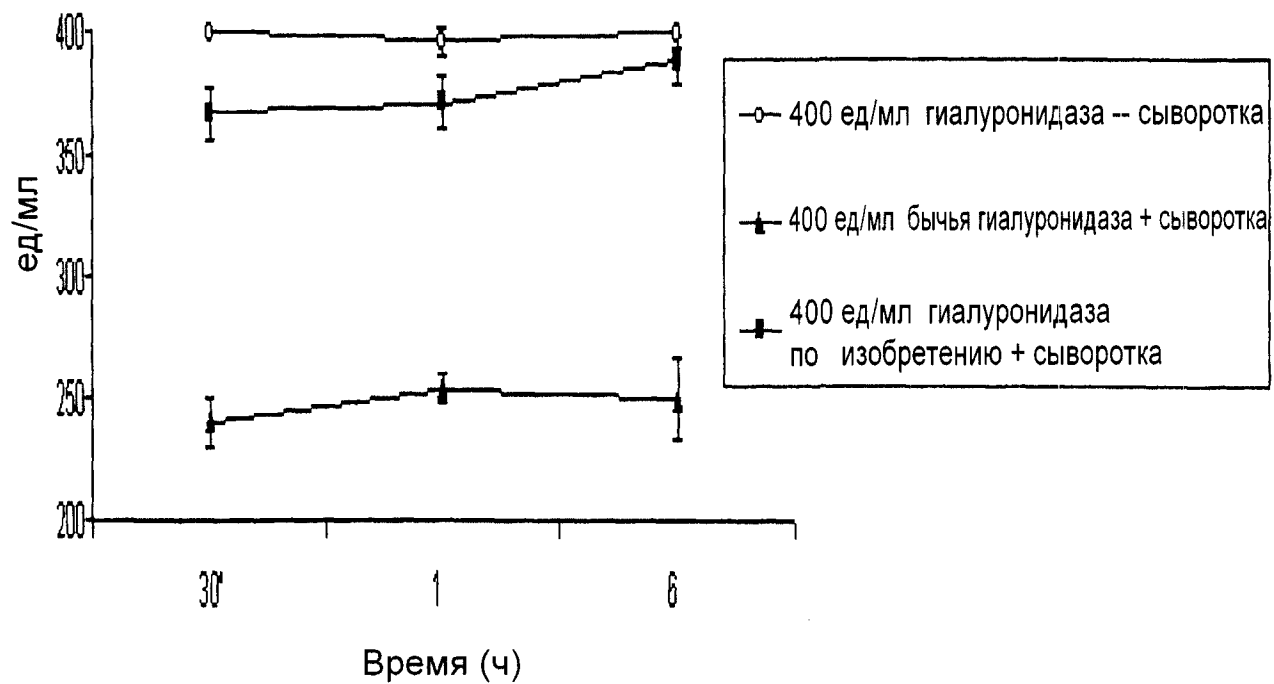


Фиг. 24

Ингибирование активности гиалуронидазы кровью животного



Ингибирование активности гиалуронидазы кровью человека



Фиг. 25