

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035163**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.08

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

(21) Номер заявки
201600026

(22) Дата подачи заявки
2014.06.13

(54) ПРЕПАРАТ ОЧИЩЕННОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ГИАЛУРОНИДАЗЫ, СПОСОБ ЕГО ПРОИЗВОДСТВА И СОДЕРЖАЩИЕ ЕГО КОМПОЗИЦИИ

(31) **MI2013A000992**

(56) **WO-A1-2010130810**

(32) **2013.06.17**

EP-A1-0005751

(33) **IT**

WO-A1-2009111066

(43) **2016.08.31**

CN-A-101633931

(86) **PCT/IB2014/062193**

WO-A2-2009037566

(87) **WO 2014/203133 2014.12.24**

HYNES WAYNE L. ET AL.: "Hyaluronidases of Gram-positive bacteria", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 183, no. 2, 15 February 2000 (2000-02-15), pages 201-207, XP002538530, ISSN: 0378-1097, DOI:10.1111/J.1574-6968.2000.TB08958.X the whole document

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФИДИА ФАРМАЧЕУТИЧИ С.П.А.
(IT)

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

(74) Представитель:
Бадасва Т.Н., Агуреев А.П., Фомичева
Т.С., Фелицына С.Б. (RU)

(57) Предложен препарат очищенной рекомбинантной гиалуронидазы *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. Содержание эндотоксина в этом препарате не превышает 0,5 ед./мг. Также предложен способ получения препарата гиалуронидазы из трансформированных микроорганизмов *E. coli* или *B. subtilis*. Способ характеризуется высокой производительностью и может выполняться в промышленных масштабах. Очищенная рекомбинантная гиалуронидаза *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 может входить в состав фармацевтической композиции для лечения заболеваний или в состав косметологической композиции для эстетического улучшения внешнего вида у людей.

B1

035163

035163

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к гиалуронидазе, получаемой из бактерий *S. koganeiensis*, к ее препарату, способу его производства и композициям на его основе.

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 белки), 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 будущей 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 сердечно-сосудистых 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 фермента (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 термолabileный 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 сердечно-сосудистых заболеваний и нарушений мозгового кровообращения, и ее использование ограничивается лечением лишь некоторых сердечно-сосудистых заболеваний из-за высокого содержания примесей в препаратах, имеющихся 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 фермента, который в течение долгого времени сохранял бы стабильность в водном растворе даже в присутствии протеолитических ферментов, 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 препарата гиалуронидазы *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, выбранных из клеток *Escherichia coli* и клеток *Bacillus subtilis*, которые трансформированы по меньшей мере одним вектором, содержащим кДНК последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, кодирующую указанную в п.1 гиалуронидазу;

б) ферментируют содержимое биореактора при pH от 6,7 до 7,1 в присутствии питательного раствора;

в) добавляют индуктор лактозных генов в биореактор и инкубируют смесь в течение периода от 8 до 24 ч;

г) центрифугируют полученную суспензию бактериальных клеток и удаляют надосадочную жидкость, тем самым извлекая осадок, состоящий из указанных бактериальных клеток;

д) суспендируют полученный осадок и подвергают полученную суспензию осмотическому удару;

е) экстрагируют периплазматические белки из суспензии путем центрифугирования и выделяют белковую фракцию с ферментативной активностью гиалуронидазы;

ж) очищают фракцию белка с ферментативной активностью гиалуронидазы путем осуществления следующих способов в последовательности:

(i) сильная ионообменная хроматография;

(ii) слабая катионообменная хроматография и

(iii) хроматография ароматического гидрофобного взаимодействия.

Цели изобретения также достигаются с помощью препарата очищенной рекомбинантной гиалуронидазы *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21. Содержание эндотоксина в этом препарате не превышает 0,5 ед./мг.

Кроме того, цели изобретения достигаются с помощью полинуклеотида, содержащего последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 17, кодирующего рекомбинантную 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 использования и содержащей гиалуронидазу *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 в очищенной форме

как единственный активный ингредиент или в сочетании с другим активным веществом. Данная композиция может использоваться в лечении таких заболеваний как отеки, воспалительные состояния, обморожения, твердые опухоли, опосредованные IgE аллергические реакции, заболевания ротовой полости, внезапные кровоизлияния в стекловидное тело, артериосклероз, нарушения кровяного давления, сердечно-сосудистые заболевания и нарушения мозгового кровообращения, такие как стеноз мозговых артерий или инсульт, или коровий мастит.

Цели изобретения также достигаются с помощью композиции, пригодной для косметического использования и содержащей гиалуронидазу *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 в очищенной форме как единственный активный ингредиент или в сочетании с другим активным веществом. Данная композиция может использоваться для улучшения эстетического внешнего вида у людей, пораженных целлюлитом или с небольшим количеством жировой массы.

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; (б) - анализ BLAST на сходство нуклеотидной последовательности, определяемой гиалуронидазой из *S. koganeiensis* ATCC 31394, и нуклеотидных последовательностей, имеющихся в электронной базе данных.

Фиг. 7 (а) - функциональная характеристика протеиновой последовательности гиалуронидазы из *S. koganeiensis*; (б) - 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 изображения 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 плазмидах. 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 P_{grac}, 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 (ОРС), кодирующая протеин гиалуронидазы из S. koganeiensis, клонированной в вектор pHT43 (MOBITEC); (b) - нуклеотидная последовательность ОРС, кодирующая протеин гиалуронидазы S. koganeiensis, клонированной в вектор pET22b(+) (Novagen); (c) - нуклеотидная последовательность ОРС, 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 антигиалуронидазы (Abnova), показал единственную иммунореактивную 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 мин до 24 ч.

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:

- a) засевают среду бактериальной культуры в биореакторе инокулятом рекомбинантных клеток, содержащих по меньшей мере один вектор с последовательностью SEQ ID NO: 41;
- b) содержимое биореактора с шага a) подвергают ферментации при pH от 6,7 до 7,1 в присутствии питательного раствора;
- c) добавляют к смеси с шага b) индуктор лактозных генов;
- d) смесь с шага c) подвергают индукции сроком от 8 до 24 ч;
- e) подвергают центрифугированию бактериальные клетки, полученные на шаге d);
- f) выполняют повторное суспензирование сгустков, полученных на шаге e), и подвергают полученную суспензию осмотическому удару;
- g) экстрагируют периплазматические протеины путем центрифугирования суспензии с шага f);
- h) очищают фракцию протеина с энзимной активностью гиалуронидазы, полученную на шаге g), 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 T и pH.

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 клеточного 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 грамположительной 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, сердечно-сосудистые 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 грамположительной 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 ч для оценки уровней ДНК и РНК, производимой стандартными методами (фиг. 1), а оставшаяся после анализа часть фракции хранилась при температуре -80°C в реагенте RNAProtect™ 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);
- RFSADTTIEAAFIKTTSETINAATYK (SEQ ID NO: 2);
- GYADGSDKAAALSLLDLR (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 5'-tggCCATGGCCGGGG AGAACGGCGCGACGACGA+3'	NcoI	671 п.н.	pHyal_sk (фиг. 13 (b))
	SEQ ID NO: 33 5'-ctcGAATTCtaCGCC 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'-ctcGAATTCtaCGCCGG TGCGATCGTCGTGACC-3'	EcoRI		
pET24b (+)	SEQ ID NO: 36 5'-ataCATATGGCCGGGGA GAACGGCGCGACGACGA-3'	NdeI	672 п.н.	pRH_sk
	SEQ ID NO: 37 5'-ctcGAATTCtaCGCCGG TGCGATCGTCGTGACC-3'	EcoRI		

После клонирования и амплификации в клетках *E. coli* штамма DH5 α 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 (а) 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 (табл. 1).

Таблица 1

Плазмиды и стратегии клонирования, используемые в настоящем изобретении

Штамм	Плаزمида	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 Лурья-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 ч. 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 связа-

но 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 ч после засева и до 19-го часа (время индукции) при экспоненциально возрастающей дозе.

После индукции конечного раствора изопропилном β -D-1-тиогактопиранозидом (ИПТГ) в количестве 1 ммоль конечного раствора питательный раствор можно добавлять к культуре в течение 5 ч ежедневно в том же количестве, что и последняя добавка. Индукция происходит через 24 ч после засева и продолжается в течение 8-24 ч, как правило, в течение 12 ч. Бактериальные клетки собирались после периода индукции с помощью центрифугирования и хранились при -80°C . Клетки *E. coli* BL21 (DE3), трансформированные вектором rHyal_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 ч индукции с помощью 1 ммоль ИПТГ при 37°C (табл. 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 конце ферментации (г/л)	0,5	1	1,5	1,2	2,1
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 густки, 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 л продукта ферментации (приблизительно эквивалентно диапазону 80-90 г клеточных густков, отражающих выработку приблизительно 1-1,2 г/л рекомбинантной гиалуронидазы) для балансировки в течение 45 мин при комнатной температуре.

После балансировки густки обработали свежим раствором (5°C) для дисперсии густков. Ресуспензированные густки 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 (например, 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 (например, 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 (например, Phenyl-Sepharose® FTP), 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 об. фосфатно-солевого буфера 1x (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 1л очищенного продукта, подвергшегося ферментации (табл. 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 густков (МЕ)			$2,1 \times 10^7$			
Общее количество на грамм густков (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(a)).

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 ед./мл культуры, в сравнении, например, с 130 ед./мл 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 цистеин (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 ч);

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 последо-

вательность, 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 табл. 4.

Таблица 4

Результат характеризационных анализов рекомбинантной гиалуронидазы, полученной в соответствии с настоящим изобретением из клона rHyal_Sk.

Анализ	Рекомбинантная гиалуронидаза
Анализ способом секвенирования N-терминальной области протеина (Lowry/VCA)	1 мг/мл AGENGA
I ДСН-ПААГ-электрофорез	>99%
Изоэлектрическое фокусирование Теоретический показатель I.P.5.5	90% (I.P.5.2 ± 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 (Iх 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, т.е. энзимная активность бычьей гиалуронидазы (бычья РН20) ингибируется человеческой и/или животной кровью, однако было обнаружено, что человеческая и/или животная кровь не ингибиру-

ет 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-хозяин, 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 по меньшей мере с 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 E (IgE), заболеваний ротовой полости, внезапных кровоизлияний в стекловидное тело, артериосклероза, нарушений кровяного давления, сердечно-сосудистых 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, энзимы, 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 энзимами), 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 уве-

личивая 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.

Преыдушие исследования показали эффективность гиалуронидазы в лечении сердечно-сосудистых 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 сердечно-сосудистых 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 ч. После выращивания культуру использовали для засева в 20-литровый биореактор (Biostat U, B.BRAUN), содержащий 10 л

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 ч 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 мин 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 гиалуронової кислоты. Энзимное переваривание проводилось при 37°C в течение 30 мин 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 мин после добавления кислого раствора на основе лошадиной сыворотки. Стандарт гиалуронидазы из тестикул млекопитающих (EDQM, гиалуронидаза FIP, H1115000), содержащий 328 МЕ/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 пу-

тем 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);
- GYADGSDKDAALSLDLR (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'-GTCGGCACCGTCGCCGCGTTCGCCGAT-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 (Тоyobo), 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 с, 40 циклов отжига при 55°C в течение 30 с 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 на 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'-ctccgcgaccagtctctcg-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*;

b) 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'-CGTACCCGCGGTGGGTGATCTTACAG-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'-accattcggagttgatcgttg-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(a)). 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(a), (b)). 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 pHT43(+).

кДНК, кодирующая гиалуронидазу, полученную из *S. koganeiensis* (SEQ ID NO: 41), была амплифицирована ПЦР из плазмиды 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'-gttGGATCCCGGGGAGAACGGCGCGACGACGA-3' SEQ ID NO: 28) и антисмыслового (5'-gacTCTAGATCACGCCGGTGGCATCGTCGTGACC-3' SEQ ID NO: 29).

Для амплификации были выполнены следующие циклы ПЦР: первоначальная денатурация при 96°C в течение 5 мин, 30 циклов отжига при 55°C в течение 30 с и удлинения при 72°C в течение 1 мин, затем денатурация при 96°C в течение 40 с. 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 pHT43(+), 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 мин, 30 циклов отжига при 55°C в течение 30 с и удлинения при 72°C в течение 60 с, последующая денатурация при 94°C в течение 1 мин) с помощью вектор-специфичных праймеров (в направлении вперед 5'-TGTGGAATTGTGAGCGGATA-3' (SEQ ID NO: 30)), в обратном направлении 5'-TTTCAACCATTGTTCAGGT-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 (ΦX174 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: 38) после секвенирования (фиг. 13(a)) анализировалась с помощью инструментов биоинформатики, таких как ClustalW, Traslate (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'-ctcGAATTCtcaGCCGGTGGCATCGTCGTGACC-3' (SEQ ID NO: 33)). Для амплификации были выполнены следующие циклы ПЦР: первоначальная денатурация при 96°C в течение 5 мин, 30 циклов отжига при 55°C в течение 30 с и удлинения при 72°C в течение 1 мин, затем денатурация при 96°C в течение 40 с. 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* 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 мин, 30 циклов отжига при 55°C в течение 30 с и удлинения при 72°C в течение 60 с, последующая денатурация при 94°C в течение 1 мин) с помощью вектор-специфичных праймеров (промотор T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO: 34), терминатор T7: 5'-GCTAGTTATGTCTCAGCGG-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 (ΦX174 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, Traslate (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'-tggCCATGGCCGGGAGAACGGCGCAGACGA-3' (SEQ ID NO: 36)) и антисмыслового (5'-ctcGAATTCtcaCGCCGGTGCATCGTCGTGACC-3' (SEQ ID NO: 37)).

Для амплификации были выполнены следующие циклы ПЦР: первоначальная денатурация при 96°C в течение 5 мин, 30 циклов отжига при 55°C в течение 30 с и удлинения при 72°C в течение 1 мин, затем денатурация при 96°C в течение 40 с. 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 мин, 30 циклов отжига при 55°C в течение 30 с и удлинения при 72°C в течение 60 с, последующая денатурация при 94°C в течение 1 мин) с использованием вектор-специфичных праймеров

(промотор T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO: 34),

терминатор T7: 5'-GCTAGTTATGTCTCAGCGG-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 (ΦX174 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: 40) после секвенирования (фиг. 13(c)) 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* DH5α (Invitrogen, генотип: F-φ801acZΔ M15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gytA96 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, DH5α-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::hug cm::neo; NeoR [23]), предоставленный МОБИТЕС, это - грамположительный бактериальный штамм, характеризующийся дефицитом восьми протеаз, в результате чего этот бактериальный штамм используется при производстве секретлируемых 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 аликвот.

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 MgSO₄, 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 аликвот.

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 MgSO₄, 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 аликвот.

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 мин. 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-МОБИТЕС), 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 ПЦП (первоначальная денатурация при 94°C в течение 5 мин, 30 циклов отжига при 55°C в течение 30 с и удлинения при 72°C в течение 60 с, последующая денатурация при 94°C в течение 1 мин) с использованием вектор-специфичных праймеров (а направлении вперед 5'-TGTGGAATTGTGAGCGGATA-3' (SEQ ID NO: 30), в обратном направлении 5'-TTTCAACCAATTTGTTCCAGGT-3' (SEQ ID NO: 31)) для анализа успешной трансформации в *B. subtilis* и проверки успешной трансформации в *E. coli*

(промотор T7: 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГ-3' (SEQ ID NO: 34),

терминатор T7: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' (SEQ ID NO: 35)).

Полученный продукт ПЦП для трансформированных клеток с pHTsk_HYAL (927 п.н.), pHyal_sk (940 п.н.) и pHyal_sk_SL (874 п.н.) был проанализирован электрофорезом в 1% агарозном геле с использованием эталонных стандартов молекулярной массы (FX174 DNA и λ DNA/HindIII производства Fermentas). Для анализа правильной рамки гена, кодирующего гиалуронидазу после связывания с вектором, последовательность продуктов ПЦП 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 ч индукции бактериальная культура центрифугировалась на скорости 7500 об/мин в течение 10 мин 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 1x 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 ч 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 ч после индукции путем центрифугирования на скорости 7500 об/мин в течение 10 мин. После центрифугирования бактериальный ступок отбирался для оценки экспрессии полученных клеток *E. coli* и проверки, в какой части клетки производится рекомбинант.

Затем ступки, полученные из клеток *E. coli*, индуцированных ИПТГ, были обработаны бактериальным протеином В-PER (PIERCE) в соответствии с предоставленными поставщиком инструкциями для оценки экспрессии гиалуронидазы в периплазматической и/или цитоплазматической 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 pHyal_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 ч 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 pHyal_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 ч 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 ч. 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°C в течение 5-6 ч. 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°C.

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* (DH5 α), содержащий плазмиду, полученную с помощью pHtsk_HYAL (клон 105), штамм *E. coli* (DH5 α) и *E. coli* (BL21 (DE3)), содержащий плазмиду, полученную с помощью pHyal_sk (клон 413), штамм *E. coli* (DH5 α) и *E. coli* (BL21 (DE3)), содержащий плазмиду, полученную с помощью pHyal_sk_SL (клон 225), и штамм *E. coli* (DH5 α) 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 (10 мкмоль, 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 *is. coli*, а затем инкубирована на скорости 200 об/мин при 37°C в течение приблизительно 18 ч. 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 *is. coli*), а затем инкубирована на скорости 200 об/мин при 37°C в течение приблизительно 16 ч. 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 *is. coli*), а затем инкубировано на скорости 200 об/мин при 37°C в течение 5-6 ч. 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 *is. 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 rHsk).

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), содержащей 50 мкг/мл ампициллина, и инкубировался при 37°C на скорости 150 об/мин в течение 16-18 ч. 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 1 л жидкости: 2 г Na₂HPO₄·2H₂O, 2 г KH₂PO₄, 4 г K₂HPO₄, 3,8 г лимонной кислоты, 3,3 г (NH₄)₂SO₄, 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 1 л среды: 0,49 г MgSO₄·7H₂O, 0,0147 г CaCl₂, 1 мл FeCl₂ (0,2 моль), 2 мл микропримесей (микропримесей на 1 л: 0,96 г лимонной кислоты, 0,25 г CoCl₂·6H₂O, 1,5 г MnCl₂·4H₂O, 0,15 г CuCl₂·2H₂O, 1,5 г H₃BO₃, 0,25 г Na₂MoO₄·2H₂O, 1,3 г Zn (CH₃COO)₂·2H₂O), 0,01 г тиамина, 5 г глюкозы, 3 г экстракта дрожжей.

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

Бактериальные клетки отбирались после периода индукции в течение приблизительно 16 ч путем центрифугирования на скорости 7500 об/мин в течение 25 мин. 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 клет-

ки, составило приблизительно 0,1-0,15 г/л культуры, с максимальной экспрессией, наблюдаемой через 16 ч после индукции 1 ммоль ИПТГ при 37°C.

Клетки *E. coli* BL21 (DE3), трансформированные с помощью вектора pHyal_sk_SL, для экспрессии 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% (табл. 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 ампицилина, и инкубировался при 37°C на скорости 150 об/мин в течение 16-18 ч. 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 1 л жидкости: 2 г Na₂HPO₄·2H₂O, 2 г KH₂PO₄, 4 г K₂HPO₄, 3,8 г лимонной кислоты, 3,3 г (NH₄)₂SO₄, 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 1 л среды: 0,49 г MgSO₄·7H₂O, 0,0147 г CaCl₂, 1 мл FeCl₂ (0,2 моль), 2 мл микропримесей (микропримеси на 1 л: 0,96 г лимонной кислоты, 0,25 г CoCl₂·6H₂O, 1,5 г MnCl₂·4H₂O, 0,15 г CuCl₂·2H₂O, 1,5 г H₃BO₃, 0,25 г Na₂MoO₄·2H₂O, 1,3 г Zn(CH₃COO)₂·2H₂O), 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 1 л питательной среды: 2 г Na₂HPO₄·2H₂O, 3 г KH₂PO₄, 5,4 г K₂HPO₄, 3,8 г лимонной кислоты, 4 г (NH₄)₂SO₄, 9 г MgSO₄·7H₂O, 0,047 г CaCl₂, 1 мл FeCl₂ (раствор 0,2 моль), 2 мл микроэлементов (микроэлементы на 1 л: 0,96 г лимонной кислоты, 0,25 г CoCl₂·6H₂O, 1,5 г MnCl₂·4H₂O, 0,15 г CuCl₂·2H₂O, 1,5 г H₃BO₃, 0,25 г Na₂MoO₄·2H₂O, 1,3 г Zn (CH₃COO)₂·2H₂O), 0,01 г тиамина. Питательная среда добавлялась через 6 ч 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-тиогаляктопиранозидом (ИПТГ) в количестве 1 ммоль, питательный раствор добавлялся к культуре в течение 5 ч ежедневно в том же количестве, что и последняя добавка. Индукция началась через 24 ч после засева и продолжалась в течение 12 ч. Были разработаны следующие параметры ферментации: температура 37°C, перемешивание на скорости 600 об/мин, поток воздуха 5-10 л воздуха в минуту, давление на выходе приблизительно 0,8 бар.

Бактериальные клетки отбирались после периода индукции в течение 12 ч путем центрифугирования на скорости 7500 об/мин в течение 25 мин. 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 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 ч 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 (табл. 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% (табл. 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 табл. 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 мин. 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 мин или до полного ресуспендирования массы. Должным образом ресуспендированный сгусток центрифугировался на скорости 13000 об/мин в течение 10 мин 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 H_2O и 10 мкл супернатанта (растворимые протеины), разведенные в 10, 100 и 1000 раз с помощью $1 \times$ 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% (мас./об.) в 0,5 моль NaOH) для осаждения непереваренной гиалуроновой кислоты, и планшет инкубировался в течение 20 мин при комнатной температуре. Степень осаждения измерялась по оптической плотности при 640 нм.

Затем измерялась активность на 1 мл рекомбинантного протеина в культурной жидкости с помощью следующих расчетов: активность 1 мл, полученного в результате анализа/2×коэффициент разведения×10=активность на 1 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 л 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 мин 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 мин при комнатной температуре и в дальнейшем в течение приблизительно 1 ч при 5°C с использованием магнитной мешалки Heidolph type MR2002 на скорости 500 об/мин. После приблизительно 1 ч ресуспендированный сгусток в холодном виде добавили в 4,5 л раствора для осмотического удара (1,2 г/л Tris, 4 мл/л HCl_2N , 0,1 г/л MgCl_2) для экстракции периплазматического протеина. Полученная смесь перемешивалась в течение 4 ч 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 мин 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 с.

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 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 мин при комнатной температуре и в дальнейшем в течение приблизительно 30 мин при 5°C с использованием магнитной мешалки Heidolph type MR2002 на скорости 1000 об/мин. Приблизительно через 1 ч ресуспендированный сгусток центрифугировался при 5°C в течение 45 мин 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 мин 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 с. 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 грани-

цей 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 1 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, подвергшегося ферментации (табл. 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 гиалуронової кислоты. Энзимное переваривание было проведено при 37°C в течение 30 мин 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 мин после добавления кислого раствора на основе лошадиной сыворотки. Стандарт гиалуронидазы из тестикул млекопитающих (EDQM, гиалуронидаза FIP, N1115000), содержащий 328 МЕ/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 МЕ/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 мм. 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 2×10^{-6} моль. Все образцы разводились в окончательной концентрации 2×10^{-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(a)). 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 мин, 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 pH 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 плавленного кварца (50 см фактической длины, 60,2 см общей длины, внутренний диаметр 50 мкм) и 20 ммоль буфера натрия цитрата при pH 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), т.е. 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: $12383 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. 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 антигиалуронидазным антителом (Abnova), разведенным 1:2000 в 10% сухом молоке/ФСБ, в течение 12 ч, и специфическая реакция была зафиксирована путем добавления на 1 ч 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 тестируемых 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 антигиалуронидазным 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 грамотрицательными 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 инкубируются 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 ед. эндотоксинов на 1 мг рекомбинантной гиалуронидазы (табл. 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 HCP" 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 табл. 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 1 мг рекомбинантной гиалуронидазы (табл. 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 мин до 24 ч.

Вкратце, образцы гиалуроновой кислоты (500-730 кДа) после реакции с рекомбинантной гиалуронидазой в указанные временные промежутки (от 5 мин до 24 ч) 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 ч при температуре приблизительно 16°C с постоянным напряжением 50 В. 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 ч.

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 ед.) для снижения вреда, причиненного утечкой антибиотиков, гипертонических 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 представлена турбидиметрическая модель для анализов *in vitro*. Вкратце, рекомбинантная гиалуронидаза (полученная согласно изобретению) в концентрации 10 ед. ($<250 \text{ нг}$) и бычья гиалуронидаза, 100 ед. (300

мкг) были раздельно обработаны двумя различными дозами проназы Е (200 и 500 мкг) в растворе фосфатного буфера (рН 7,0) при 37°C в течение 1 ч, 24 ч и 48 ч. 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, т.е. 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 ед., 400 ед.), а также бычьей гиалуронидазы (40 ед., 400 ед.), были раздельно 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 мин, 1 ч и 6 ч. 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 обеспечить общую активность в кровотоке без риска бактериальных или вирусных инфекций, что также эффективно для лечения сердечно-сосудистых 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.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Препарат очищенной рекомбинантной гиалуронидазы *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, причем препарат содержит эндотоксин в количестве менее 0,5 ед./мг.

2. Способ получения препарата очищенной рекомбинантной гиалуронидазы *Streptomyces koganeiensis* ATCC 31394 по п.1, включающий следующие стадии:

а) засевают среду бактериальной культуры в биореакторе инокулятом рекомбинантных клеток, выбранных из клеток *Escherichia coli* и клеток *Bacillus subtilis*, которые трансформированы по меньшей ме-

ре одним вектором, содержащим кДНК последовательности SEQ ID NO: 41, кодирующую указанную в п.1 гиалуронидазу;

b) ферментируют содержимое биореактора при pH от 6,7 до 7,1 в присутствии питательного раствора;

c) добавляют индуктор лактозных генов в биореактор и инкубируют смесь в течение периода от 8 до 24 ч;

d) центрифугируют полученную суспензию бактериальных клеток и удаляют надосадочную жидкость, тем самым извлекая осадок, состоящий из указанных бактериальных клеток;

e) суспендируют полученный осадок и подвергают полученную суспензию осмотическому удару;

f) экстрагируют периплазматические белки из суспензии путем центрифугирования и выделяют белковую фракцию с ферментативной активностью гиалуронидазы;

g) очищают фракцию белка с ферментативной активностью гиалуронидазы с помощью методов, осуществляемых последовательно:

(i) сильной ионообменной хроматографии;

(ii) слабой катионообменной хроматографии и

(iii) хроматографии ароматического гидрофобного взаимодействия.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что в качестве питательного раствора на стадии b) используют раствор глицерина.

4. Полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеотидов SEQ ID NO: 17, кодирующую рекомбинантную гиалуронидазу, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

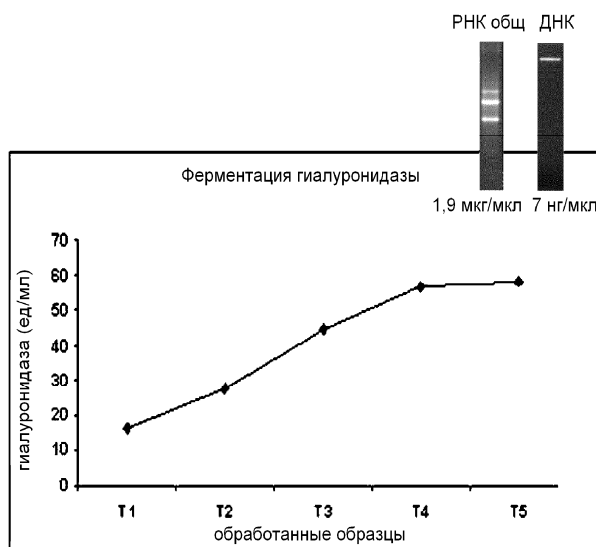
5. Рекомбинантный вектор, содержащий полинуклеотид по п.4.

6. Вектор по п.5, представляющий собой плазмиду.

7. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.5 или 6.

8. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантную гиалуронидазу, охарактеризованную в п.1, как единственный активный ингредиент или в сочетании с другим активным веществом, для лечения и/или предотвращения заболевания или нарушения, выбранного, по меньшей мере, из отеков, воспалительных состояний, обморожения, твердых опухолей, аллергических реакций, опосредованных IgE, заболеваний ротовой полости, внезапных кровоизлияний в стекловидное тело, артериосклероза, нарушений кровяного давления, сердечно-сосудистых заболеваний и нарушений мозгового кровообращения, таких как стеноз мозговых артерий или инсульт, или коровьего мастита.

9. Косметическая композиция, содержащая рекомбинантную гиалуронидазу, охарактеризованную в п.1, как единственный активный ингредиент или в сочетании с другим активным веществом, для эстетического улучшения внешнего вида у людей, пораженных целлюлитом или с небольшим количеством жировой массы.



T1, T2, T3, T4 обработанные для очистки РНК

T1, T2, T4, T5 обработанные для экстракции ДНК

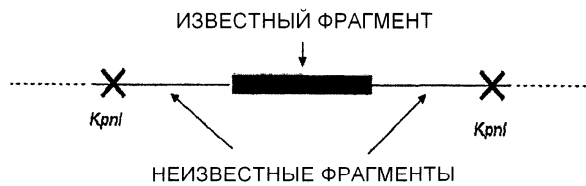
Фиг. 1

1	<u>GAG AAC GGG GCG ACG ACG ACG TTC</u> GAC GGC CCG GTG GCC GCC GAG	45
1	<u>E N G A T T T F D G P V A A E</u>	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).

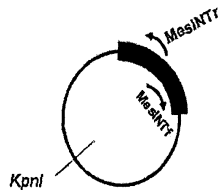
Фиг. 2

a) ЭНЗИМНОЕ ПЕРЕВАРИВАНИЕ ГЕНОМА

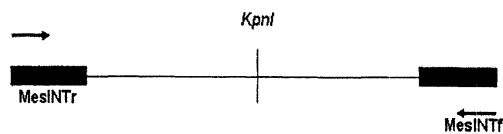


X -- РАЙОН ВОЗМОЖНОЙ РЕСТРИКЦИИ ЭНЗИМОМ

b) ЛИГИРОВАНИЕ ПЕРЕВАРЕННОГО ЭНЗИМА



c) АМПЛИФИКАЦИЯ ПРАЙМЕРОМ, ВНУТРЕННИМ ПО ОТНОШЕНИЮ К ИЗВЕСТНОМУ ФРАГМЕНТУ



Фиг. 3

```

1  ggta cqt gtg acg gct aca ccc cgc ccc aac ctc cgt aca acc att 45
1  15
46  ccgg egt tga tgg tgg tgg tcc cgg ggg act cat ggg act cat 90
16  30
91  ggc 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 GCC 180
46  M P V A R R L F L G S F T A G 60
181 CCG GTG ACC GTG GCG ACG CCC GCC GCG ACG GGT AGC GCC TCG GCG 225
61  A V T V A T A A A T C T A S A 75
226 GCC GGG GAG AAC GGC GCG ACG 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 CCC GAG AGG TTC AGC GCG GAC ACC AGA 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 GCC 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 GCC ACC TCG GCC ATG TAC CTC TCC GGC ACC GAG ACC GCG CCG 450
136 F G T S A M Y L S G T E T A R 150
451 GCC ACC CTG AAG ATC ACC CAC CGC GGG TAC GCC GAC GCC 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 GCC ACC 540
166 K D A A A L S L D L R V A G T 130
541 GCC GCC CAG GCC ATC TAC GTC ACG GGC ACG AAC GGC CCG ACC AAG 595
181 A A Q G I Y V T A T N G P T K 195
586 GCC 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 GCC ACC GCC CCC ATC GCC GTC CCC ATC GAC GCC CCC 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 CGC GGC GAC GCC 720
226 A T P R A Q V H I V Q R G D A 240
721 CTC GCC GGC CTC CTG GTG GAG GGC TCG GTA CCC ATC GGG AAC GCC 765
241 L A A L L V E G S V R I G N A 255
766 GCC ACG GTA CCG ACG TCG CTG GAC AGC TCG GGC GCC GCC CTG 810
256 A T V F T S V D S S G G G A L 270
811 TAC GCC TCG GCC GCC GCC CTG CTG TGG CGC GCC 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 ACC 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 tcg cgg gag 930
301

```

Нуклеиновые кислоты:

- строчными буквами обозначена некодирующая 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/MesINTg;
 - 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.

Фиг. 4

```

3 acc att cgg agt tga tog ttg tgg tgc cgg ggg act cat gog 47
0
48 act cat cgg tcc ctc cgt tca cag cag eca cga gag agt ggg gga 92
15
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 ACC TTC GAC GGC CCG 227
60 S A A G E N G A T T T F D G F 74
228 GTG GCC GCC GAG AGG TTC AGC GCG GAC ACC ACA CTG GAG GCC GGC 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 GCG GCC 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 GGC CTG TCG CTC GAC CTC GCG 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 F 179
543 ACC AAG GGC AAC CTG ATC GUC 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 GCG GCG GCC ACG CCC GGC 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 GCG 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 GCC GCC CTG CTG TGG GCG GCC 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 GCA CCG GCG tga agt eca gga gag aac 857
270 G T V T T I A P A * 284
858 agt goa 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.

Фиг. 5

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

S.pristinaespiralis MSVSRRLFGGFTAGAVTVAAGAAATPAAAAEADGPTTIIDGFWAEGFRILSIVKSAFT 60
S.tsukubaensis MAVNRRLFGGFTAGAVTVAAG-TATPAAAAAQGPTTIIDGFWAERFSINIVNSAFL 59
S.koganeiensis MPVARRLFGGFTAGAVTVAATAATGASAAAGENGATTIDGFWAERFSADTIEAFT 60
Actinoplanes MAMARRLFGGFTAGAVTVAAGEST---PAAAEET-TITTFGFWAQRFSIDSTIESAFT 56
*.:*****:*****.:*:** ** ** ** ** * :!::!::!::

S.pristinaespiralis KTIISTIEHAIVYQAGTSSGVALNIVSKNGDSAMVLSGTEPKAGHTLKIISHIGHADGSD 120
S.tsukubaensis KTIISTIEHAIVYQAGTSSGVALNIVSNEENSAMVLSGTEPKAGHTLKIISHIGHADGSD 119
S.koganeiensis KTIISTIEHAIVYQAGTSSGVALNIVSNEENSAMVLSGTEPKAGHTLKIISHIGHADGSD 120
Actinoplanes KTIISTIEHAIVYQAAASGRGVALNIVSNEENSAMYLEGTEPKAGHTLKIISHIGHADGSD 116
*****:**.* ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * :*****:!:****

S.pristinaespiralis EKASALSIDLITAGTAAQGFVWAGNGEFTIKNLICLRNN-ARDDFVWVWGSGRVIGMVG 179
S.tsukubaensis ADRAAVSIDLKTAGTAAQGFILITADGAIIGNLICLRNN-GRDDFVWVWGSGRVIGLAVG 178
S.koganeiensis KCRALSIDLKVAGTAAQGFVYVITAINGFTIKNLICLRNITGLDFVWVWGTGRIGVGIARA 180
Actinoplanes RSNALSIDLBTAGTAAQGFVYVITAINGFTIKNLICLRNITGRDDFTVWVWGTGRIGVWNRG 176
*.:**:* ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * :*****:!:****

S.pristinaespiralis GNPWSQLHVWQPGTDSALMVEGTVRVVDVASAPTEGVDSSRGGVLYENGALKWRGSDNI 239
S.tsukubaensis SAFPWSQLHVWRPGDASALMVEGAVRIVDAIVPTAVDSKGGVLYAQGELMWRSGANG 238
S.koganeiensis ATPRQVHIVQPGVAGVLIWVRIANTAVPTAVDSKGGVLYAQGELMWRSGANG 240
Actinoplanes DTPRQVHIVQPGVAGVLIWVRIANTAVPTAVDSKGGVLYAVNGALMWRSGANGK 236
*.:**:* ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * ** ** ** ** * :*****:!:****

S.pristinaespiralis VTIIAPA 246
S.tsukubaensis VIRIAPA 245
S.koganeiensis VTIIAPA 247
Actinoplanes VIQIAPA 243
** ** *

```

- Функциональный домен бактериальной гиалуронидазы (гиалуронидаза_1)
- * Консервативные аминокислотные остатки
- : Аминокислотные остатки со строго близкими характеристиками
- . Аминокислотные остатки с нестрогим близкими характеристиками

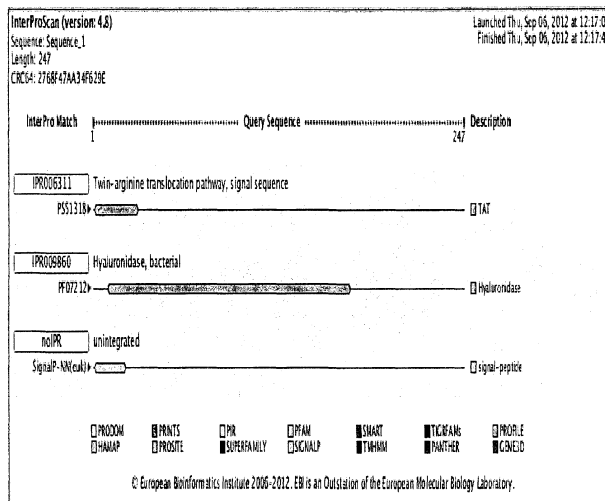
Фиг. 6(a)

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

S. pristinaespiralis	ATGAGCGTGTCCGGAGGTTGTTCTCTCGGAGGTTACCCGCGGGGGGGTACCCTGGCG	60
S. tsukubaensis	ATGGCTGTGAACCGGAGACTCTCTCTGGGCGATTACCCGCGGGGGGGTACCCTGGCG	60
S. Koganeiensis	ATGGCTGTGAACCGGAGACTCTCTCTGGGAGATTACCCGCGGGGGGGTACCCTGGCG	60
Actinoplanes	ATGGCATGCAACCGGAGCTCTCTCTGGGAGATTACCCGCGGGGGGGTACCCTGGCG	60
S. pristinaespiralis	CGGCGCACTGC---G---ACGCGCGCGCGCGCGCGAGCGGAGCGCGCGGACGACGCG	117
S. tsukubaensis	CGGCGCACTGC---G---ACGCGCGCGCGCGCGCGAGCGGAGCGCGCGGACGACGCG	114
S. Koganeiensis	ACGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGAGCGGAGCGCGCGGACGACGCG	117
Actinoplanes	CTGGGTGATCC---ACCCAGCGCTCCCGGAGCGA---G---ACCCAGCGCG	105
S. pristinaespiralis	TTCCAGCGTCCGGTGGTGGCGAGGGTTTCAGACGGACTCCACCCTCAAGTCCCGCTTC	177
S. tsukubaensis	TTCCAGCGTCCGGTGGTGGCGAGGGTTTCAGACGGACTCCACCCTCAAGTCCCGCTTC	174
S. Koganeiensis	TTCCAGCGTCCGGTGGTGGCGAGGGTTTCAGACGGACTCCACCCTCAAGTCCCGCTTC	177
Actinoplanes	TTCCGGGACCGGTGGTGGCGAAGCGTTTCAGACGGACTCCACCCTCAAGTCCCGCTTC	165
S. pristinaespiralis	TTCAAGACGAGTCCGACCGGAGCGCGGTGACGGCTATCAGGCGCGCATCTCGCGCG	237
S. tsukubaensis	TTCAAGACGAGTCCGACCGGAGCGCGGTGACGGCTATCAGGCGCGCATCTCGCGCG	234
S. Koganeiensis	TTCAAGACGAGTCCGACCGGAGCGCGGTGACGGCTATCAGGCGCGCATCTCGCGCG	237
Actinoplanes	TTCAAGACGAGTCCGACCGGAGCGCGGTGACGGCTATCAGGCGCGCATCTCGCGCG	225
S. pristinaespiralis	AGCGCGTGGCGCTGACGCTGATCGAAGACCGCGGTGACTCGGCGATGTATCTCAGT	297
S. tsukubaensis	AGCGCGTGGCGCTGACGCTGATCGAAGACCGCGGTGACTCGGCGATGTATCTCAGT	294
S. Koganeiensis	AGCGCGTGGCGCTGACGCTGATCGAAGACCGCGGTGACTCGGCGATGTATCTCAGT	297
Actinoplanes	AGCGCGTGGCGCTGACGCTGATCGAAGACCGCGGTGACTCGGCGATGTATCTGAG	285
S. pristinaespiralis	GGCACGGAGAGCG	357
S. tsukubaensis	GGCACGGAGAGCG	354
S. Koganeiensis	GGCACGGAGAGCG	357
Actinoplanes	GGCACGGAGAGCG	345
S. pristinaespiralis	GACGGAAGGCGCTCGCTGCGATCGACTGCTGACGGCGGAGCGCGCGCGCGCGCG	417
S. tsukubaensis	GACGGAAGGCGCTCGCTGCGATCGACTGCTGACGGCGGAGCGCGCGCGCGCGCG	414
S. Koganeiensis	GACGGAAGGCGCTCGCTGCGATCGACTGCTGACGGCGGAGCGCGCGCGCGCGCG	417
Actinoplanes	GATCGAGCGCGCGCGCTGCTGATCGACTGCTGACGGCGGAGCGCGCGCGCGCGCG	405
S. pristinaespiralis	ATCTTCGTGAAGCG	477
S. tsukubaensis	ATCTTCGTGAAGCG	474
S. Koganeiensis	ATCTTCGTGAAGCG	477
Actinoplanes	ATCTTCGTGAAGCG	465
S. pristinaespiralis	---GCCGAGAGACTTCTCTGTCAGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG	533
S. tsukubaensis	---GCCGAGAGACTTCTCTGTCAGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG	530
S. Koganeiensis	ACGGCGTGGAGACTTCTCTGTCAGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG	537
Actinoplanes	CCGCGCGGATGACTTCTCTGTCAGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG	525
S. pristinaespiralis	G-GCGCGAACCCCTGGTCCAGCTCCATGCTGTCAGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCG	592
S. tsukubaensis	G-GCGCGAACCCCTGGTCCAGCTCCATGCTGTCAGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCG	589
S. Koganeiensis	GGCGCGAGCG	595
Actinoplanes	G--GTACACACCGCGCGAGGTGCATCCTCCAGCGCGGAGTCCCGCGAGSAG	583
S. pristinaespiralis	TGATGGTCAAGGCG	652
S. tsukubaensis	TGATGGTCAAGGCG	649
S. Koganeiensis	TTCTGGTGGAGCG	655
Actinoplanes	TGTTGATCGAGGCG	643
S. pristinaespiralis	CG	712
S. tsukubaensis	CG	709
S. Koganeiensis	GCTCG	715
Actinoplanes	CGTCCG	703
S. pristinaespiralis	ACACGGTCAACCGATCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG	741
S. tsukubaensis	GCAACGTCACCGATCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG	738
S. Koganeiensis	GCACGGTCAACCGATCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG	744
Actinoplanes	GCAAGGTCACCGATCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG	732

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

Фиг. 6(b)

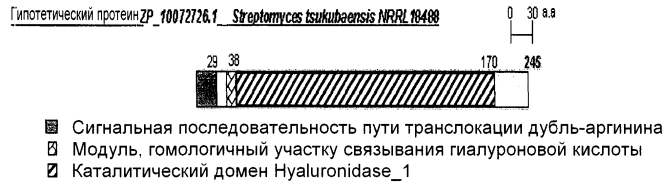
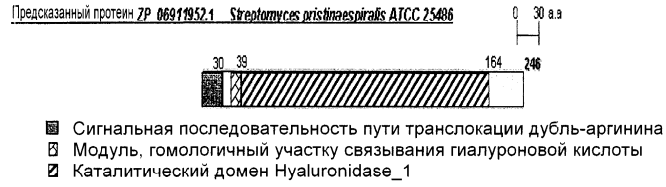
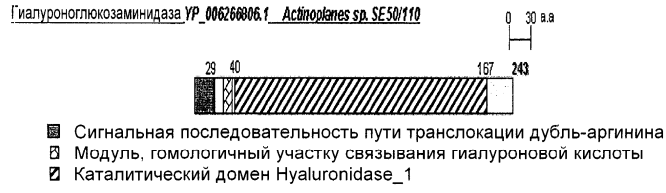


Последовательность аминокислот гиалуронидазы из S. Koganeiensis:

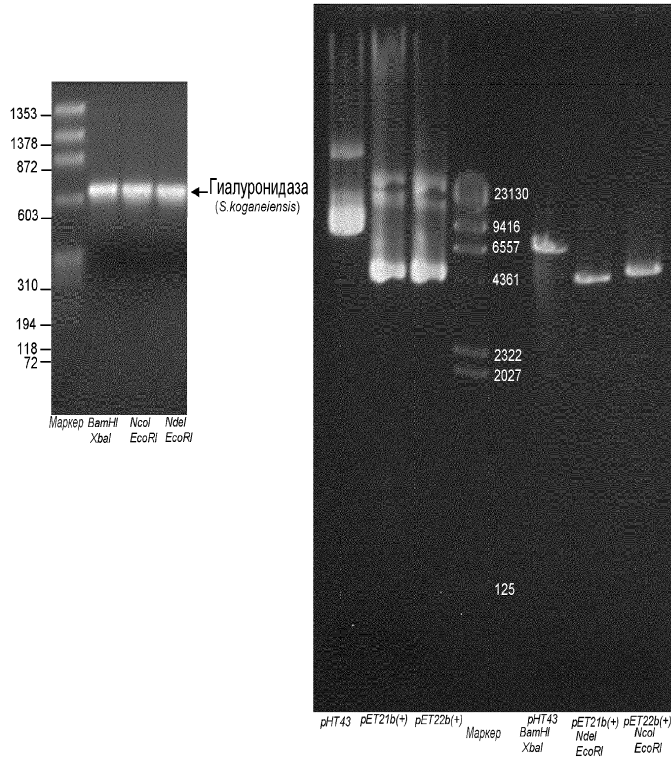


- Сигнальная последовательность пути транслокации дубль-аргина
- ▨ Модуль, гомологичный участку связывания гиалуроновой кислоты
- ▩ Каталитический домен Hyaluronidase_1

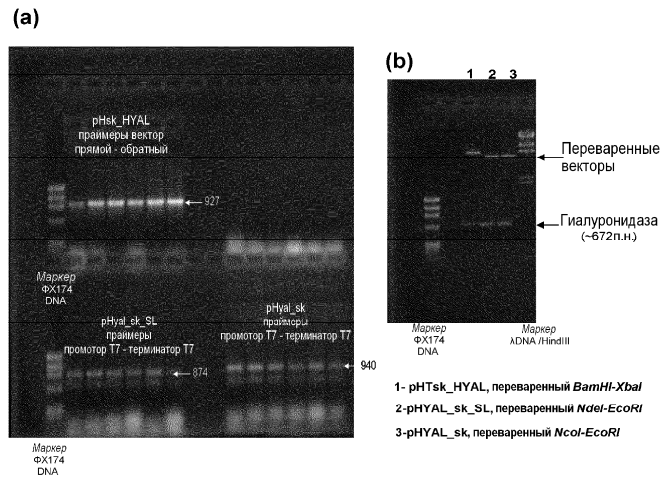
Фиг. 7(a)



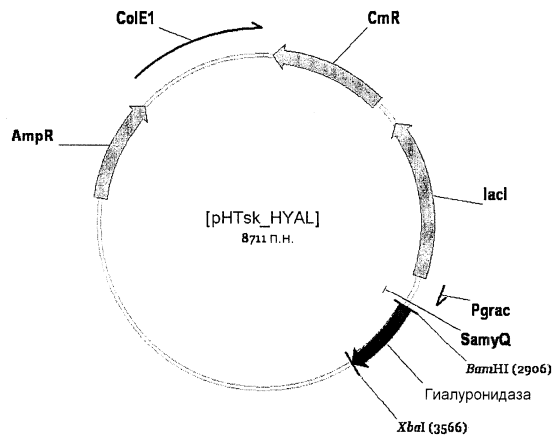
Фиг. 7(b)



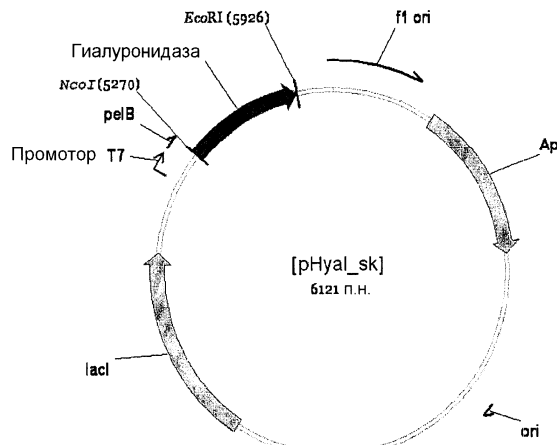
Фиг. 8



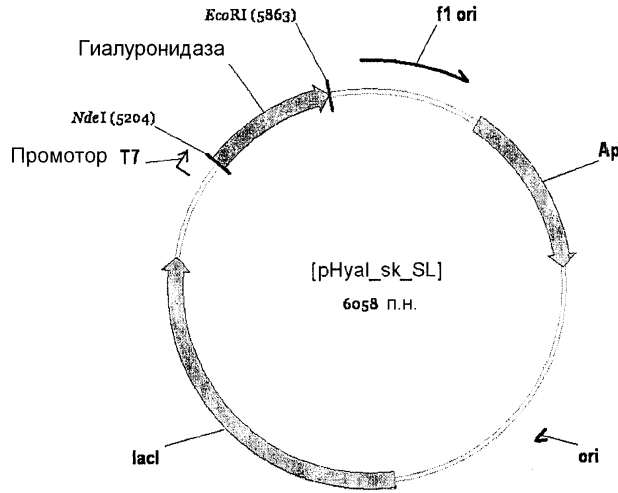
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

[pHTsk_HYAL]

2601	AAGGATCAAT	GATTCAAAA	CGAAGCGGA	CAGTTTCGT	CAGACTGTG	CTTATGTGA	CGCTGTATT	TGTACGTTG	CGATTACAA	AAACATACG
	TTCCATGTA	CTAACTTTT	CTTTGCGCT	GTCAAGCAA	GTGTGACAC	GAATACAGT	CGACAAATA	ACACTCAAC	GGCTAATTT	TTTGTGTCG
	BamH1									
42	A G E N G A I T T F D G P V A A E R F S A D T T L E A A F L									
2701	CGTAGATCC	GGCGGGAGA	ACGGCGCAC	GACGACCTC	GACGGCCCG	TGGCCCGCA	CAGGTTCCG	GGGACGCA	CAGCTGAGC	CGCTTCTC
	GCATCTAGG	CGGCCCCCT	TGGCGGCTG	CTCTGGAAG	CTGGCCGGC	ACCGGCGGT	CTCCAGTGG	CGCTGTGGT	GTGACCTCG	GGGAAGGAG
42	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	AAGCGACT	CGGACGAA	CCAGCGGCG	ACCATCTAC	AGGCGGTAC	GTCCGGCAC	GGCGCGGCG	TGACGTGAT	CTCCGACAC	CGGGCACT
	TTTCTGGA	GCCTCTCTT	GGTGCAGCG	TGGTAGATG	TCCGGCAAT	CAGCCCGCTG	CGCGCGCGG	ACTTGCATA	GAGCTGTGG	GGCCCTGGA
42	S A W 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 I S									
2901	CGGCACTA	CTCTCCGG	ACCGACGCG	CGCGCGCAC	CGTGAAGTC	ACCCACCGG	GGTACGCGA	CGGCTCGAC	AAGGACCGG	CGCGCTGCG
	GGGGTACAT	GGAGAGGCG	TGGCTTGGC	GGCGCGCTG	GGACTCTAG	TGGGTGGCG	CGATGGGCT	GGGAGGCGG	TTCTTGGCG	GGGGGACAG
42	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	GTCCGACT	CGGTTGGCG	GCAGCGCGC	CGAGGGATC	TAGCTCAGG	CGACGAGGG	CGGACCGAG	GGCACTGA	TGCGCTTGG	CAGCAGACG
	CGAGCTGGG	GGCACCGCG	CGTGGCGCG	GGTCCGATG	ATGCACTGC	GCCTTGGCG	GGCTTGGTC	CGGTGACT	AGCGGACCG	GTGTGTGTC
42	G I 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 O R G D									
3101	GGCTGGAG	ACTTCTGCT	CAGGGGACG	GGTCCATCG	GGTGGCAAT	CGACCGCGG	GGGCGCGCG	GGGCGAGT	CGCACTCTC	CAGGGGCGG
	CGGACTTCC	TGAAGACGA	GTCCCGTGG	CGGGGTAGC	CGCAAGCTA	GTGGGCGCG	CGGTGGGGG	CGGGGTCTA	GGTGTAGAG	GTGGCGCGC
42	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	AGCGCTTCC	CGGCTCTCG	GTGGAGGCT	CGTACGACT	CGGCAAGCC	GGACGGTAC	CGAGCTGGT	GGAACTTGG	GGCGCGCGG	CGCTTACCG
	TGGGGAGCG	GGGGAGGAC	CAGCTCCGA	GGCTTGGCG	GGCTTGGCG	GGCTTGGCG	GTCCGACGA	CGTGTGAGC	CGCGCGCGG	GGGACATCG
	XbaI									
42	A S G G A L L W R S N G T V T T I A P A									
3301	GTGGGGCG	CGCTTCTGT	GGCGGGCTC	CAGGGGAGG	GTCCAGACA	TGGCCCGCG	GTGACTAGA	GTGACGCTC	CGGGGGAGC	CGGCTAATG
	CAGCCCGCG	GGGACAGCA	CGGGCGGAG	GTTCGCTGC	CAGTCTGCT	AGCTGGCGG	CAGTCACTT	CAGTCTAGG	GGCCCGCTG	GGGCAATAC

Последовательность, принадлежащая вектору pHT43

Фиг. 13(a)

[pHyal_sk]

5101	CTCGATCCG CGAATTAT ACGACTACT ATAGGGGAT TGTGAGCGA TACAAATCC CCTCTAGAA TAAITTTGT TAACTTTAG AAGGAGATAT GAGCTAGGC GCTTTAATA TGTGAGTGA TATCCCTTA ACACTGGCT ATTGTTAGG GAGATCTTT ATTAACAAC APTTGAATTC TTCTCTATA
	hsl ***** A G E N G A T T T
5201	ACATATGAA TACCTGTCG CGAAGCTGC TGTGTGTCG CTGTCTCTG CTGCCAGCC GCGATGCCC ATGCGGGGG AGAACGGCC GACGACGAC TSTATCTTT ATGAGCAGG GCTGGCAGC ACACACAGC GACGAGGAC GACGGTCCG CCGCTAGCG TATGGCCCG TCTTGGCCG CTGTCTCTG
5301	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 TTCGAGGCC CGGTGGCCG CGAGAGTTC AGCGCGACA CCACACTGA GCGCGCTTC CTAGAGAGA CCTGGAGAC GACCCAGCC GCGACACTC AGCTGCCG GCGCCGGCC GCTCTCAGG TCGCCCTGT GGTGTGACT CCGCGGAGG GAGTTCCTT GAGCCCTCTG CTTGGTCCG CCGTGGTGA
5401	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 ACCAGCGCG TACGTGGCC GACGCGCGG CGGTGAGCT GATCTCCAG AACCGGGCA CCTGGGCACT GTACCTCTC GGCACGAGA CCGCGCGCG TGTCCGCC ATCAGCGCC CTGCGGCC GCGACTTGA CTAGAGCTG TTGGGCCCT GAGCCGCTA CATGGAGAG CCGTGGCTCT GCGCGGCC
5501	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 GCCCTGAG ATCCGACG CGGGTAGC CGHGGCTCC GACAGGAGC CCGCGCCCT GTGCTGAGC CTGGGCTGG CCGGACCGC CCGCGCGCG GTGGACTC TAGTGGTGG CCGCATGCG GCTGCCGAG CTGTCTCTG GCGCGCGGA CAGCGAGCT GAGCGCAC GCGCGTGGC CCGGGTCCG
5601	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 ATCTAGTA CCGGACGA CGGCCGAC AAGGGTAC TGTCTCCTT GCGCAGAC ACGGGCTGG ACGACTCTG CCGTACGCG ACCGCGCGA TAGTGCAT GCGCTGCTT GCGGGCTGG TTCCCTTGG ACTAGCGGA CCGTGTGTC TCGCCGACC TGTGAGCA GCGTCCCG TGGCGCGCT
5701	I D V G I D R A A T F R A Q V H I V Q R G D A L A A L L V E G S V R TGGGTCTGG CATGAGCG GCGGACCG CCGCGCGCA GGTCCGATC GTCCAGGCG GCGACGCGT CCGCGCGCT CCGTGGAG CCGTGGTGG AGCCGACC GTAGTGGCG CCGCGTCC GCGCGCGT CCGAGTGTG CAGTCCGCC CCGTGGGA CCGCGCGAG GACACTCTC CGAGCGTCC
5801	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 CATCGGAC GCGCGAGC TACGAGCT GCGGACAG TCGGGCGG GCGCGCTGA CCGTGGCG GCGCGCTG TGGGGCGG CCGCACGCG GTAGCTTC CCGCTGCG ATGCTGCG CCGCTGTC AGCCCGCG CCGGGCAT GCGAGCTC CCGCGGAG CACCGCGCC GAGTTCGCG
	EstRI ***** T V T T I A P A
5901	ACGCTACGA CGAGCGCC GCGGAAA TTGAGCTCC GTGAGAAC TTGGGCCCC ACTCGAGCC CACACCGCC ACCACTGGA TCGGCTGCT TCCAGTCTC GATGCTGG CCGCATTT AACCTGAGC CAGCTGTTC AACCGCGG TGGCTGTGG TGTGGTGGT TGTGACTCT AGCGAGGA
6001	AACAGCGC GAAAGAGC TGGTGGCT GCTGCGCC CTGAGATA ACTAGCTAA CCGTTGGG CCTTACAG GGTGTGGG GGTTTTTTC TTTTCGGG CTTCTCTG ACTCAGCA CCGCGTGG GACTCTTAT TATCTGATT GGGGACCC GAGATTTC CCGACTCC CAAAAAGC
6101	TGAAGGAG AACATATCC GAT ACTTCTCC TTGATAGG CTA

Последовательность, принадлежащая вектору pET22b(+)

Фиг. 13(b)

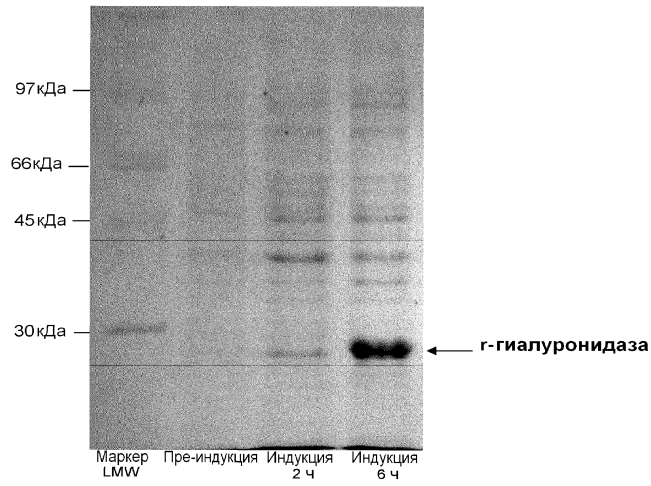
[pHyal_sk_SL]

5101	CTCGATCCG CGAATTAT ACGACTACT ATAGGGGAT TGTGAGCGA TACAAATCC CCTCTAGAA TAAITTTGT TAACTTTAG AAGGAGATAT GAGCTAGGC GCTTTAATA TGTGAGTGA TATCCCTTA ACACTGGCT ATTGTTAGG GAGATCTTT ATTAACAAC APTTGAATTC TTCTCTATA
	hsl ***** 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	ACATATGAA TACCTGTCG CGAAGCTGC TGTGTGTCG CTGTCTCTG CTGCCAGCC GCGATGCCC ATGCGGGGG AGAACGGCC GACGACGAC TSTATCTTT ATGAGCAGG GCTGGCAGC ACACACAGC GACGAGGAC GACGGTCCG CCGCTAGCG TATGGCCCG TCTTGGCCG CTGTCTCTG
5301	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 ACGACTGCG AGAGAACCA CCGCGCAC ACTTCCAG CCGGTGCTC GCGCGAGCC GCGCGCTGA ACGTACTC CGACTCCG GCGACTCG TGTGGAGC TGTGTTGCT GCGCGCTGG TAGTGGTTC GCGCATGCG CCGCGTCCG CCGCGCACT TACACTAGG GCTGTGGGC CCGTGGAGC
5401	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 CMTGTGCT CTGCGCAC GAGCGCGC GCGGACCT GAGATGAC CAGCGGGCT ACGCGAGCG CTGCGAGAG GAGCGCGCG CCGTGTGCT GCTACTGA GAGCCCTGG CTTTGGCCG CCGCTGGGA CTTCTAGTGG GTGCGGCCA TCGGCTGCC GAGCTGTT CCGCGCGCG GCGACAGCA
5501	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 CGACTCCG CTGCGCGCA CCGCGCCA GCGACTCT GTCAGCGCA CAGCGCGCC GACAGGCG AACCTAGCG CCGTGGCAA CAGCAGCG GCTGGAGCG CAGCGCGCT GCGCGCGCT CCGTAGATC CAGTGGCGCT GCTTGGCGG CCGTTCGCG TGGACTAG GCGAGCGCTT GTTGTCCCG
5601	L D D F V V K G T G R I G V G I D R A A T F R A Q V H I V Q R G D A CTGAGACT TGTGTCAA GCGACCGC CCGACTCGG TCGGACGA CCGCGCGCC ACGCGCGCG CCGAGTCCA CATGTGCCAG GCGGCGAGC GACTCTGA AGAGCGAT CCGTGGCG GGTAGCGCC AGCTGAGCT GCGCGCGCG TCGGGGCG GGTTCAGGT GTAGAGGCT GCGCGTCC
5701	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 CCCTGCCG GCTCTGCT GAGGCTCG TAGCATGG GAGCGCGCG ACGGTACCA CCGTGGGA CAGCTGGCG GCGCGCGCC TGTAGCGCT GGAGCGCG CAGGACCA CCGCGAGCC ATGCGTAGC CTTGCGCG TCGCATGCT CCGACTACT GTGAGCGCG CCGCGCGCG ACATGCGAG
	EstRI ***** S G G A L L W R G S N G T V T T I A P A
5801	GGGCGCGC CTGCTGGC GCGCTCCA CCGCAGCT ACGAGATCG CAGCGCGTG AATTCGAG CTGCTGGC AAGCTTGGC CCGACTCG CCCGCGCG GAGCAGCG CCGCGAGTT GCGTGGCAG TGTGCTAG GCGCGCAC TTTAAGTC GAGGAGCTG TCGAGCGCG GCGTGGAGCT
5901	GCACACAC CACCGACT GAGTCCGC TGTACAAA GCGGAAAG AAGCTGAT GCTCTGCG ACCGTGAG AATACTAG ATAACTCT CCTGCTGG TGTGGTGA CTGAGCGC ACGATTGT CCGGCTTCC TCGACTCA CCGAGAGCG TCGGACTCG TATGATCG TATTGGGA

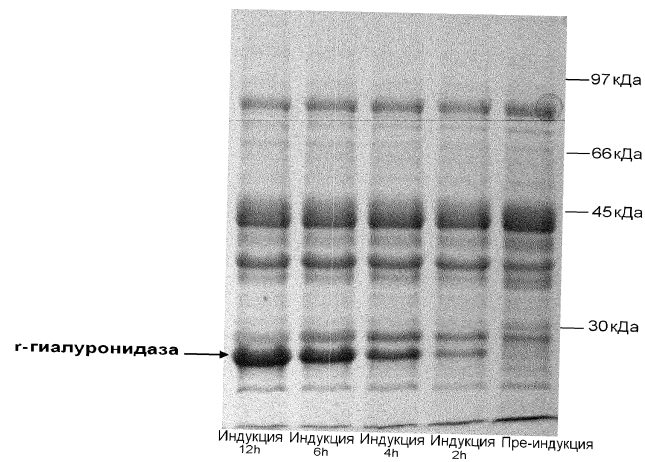
Последовательность, принадлежащая вектору pET21b(+)

Фиг. 13(c)

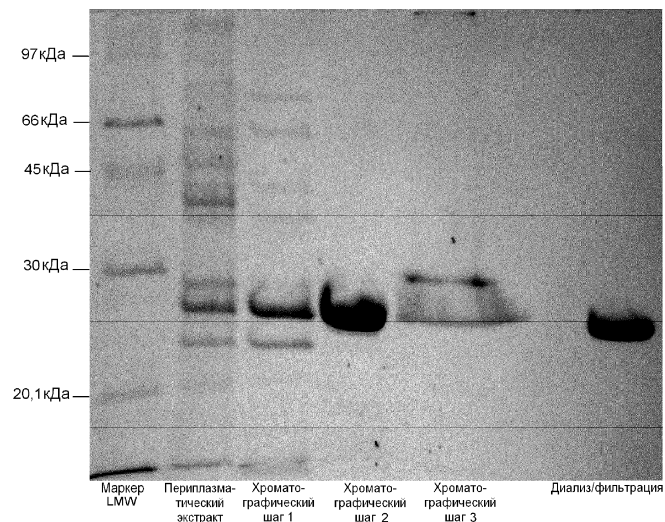
035163



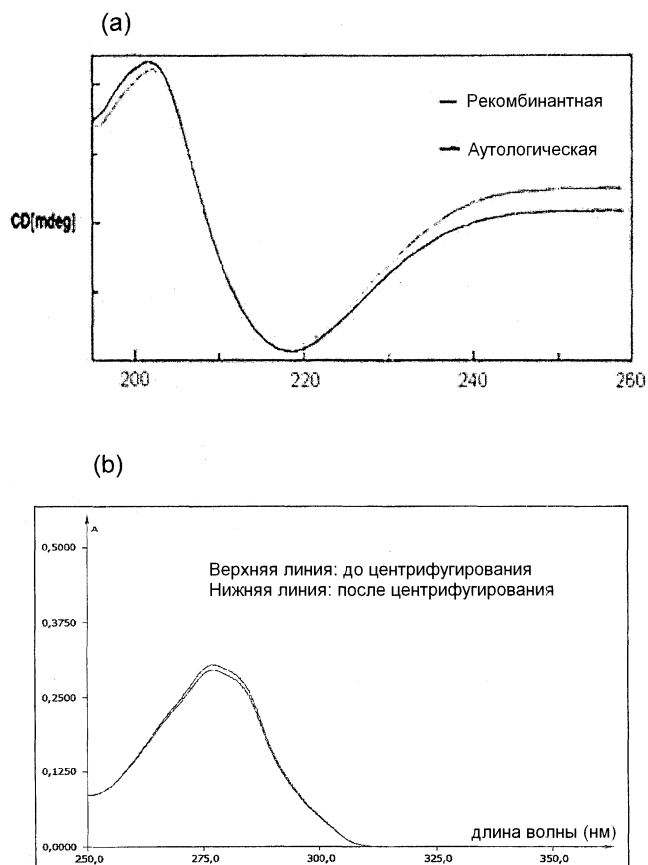
Фиг. 14



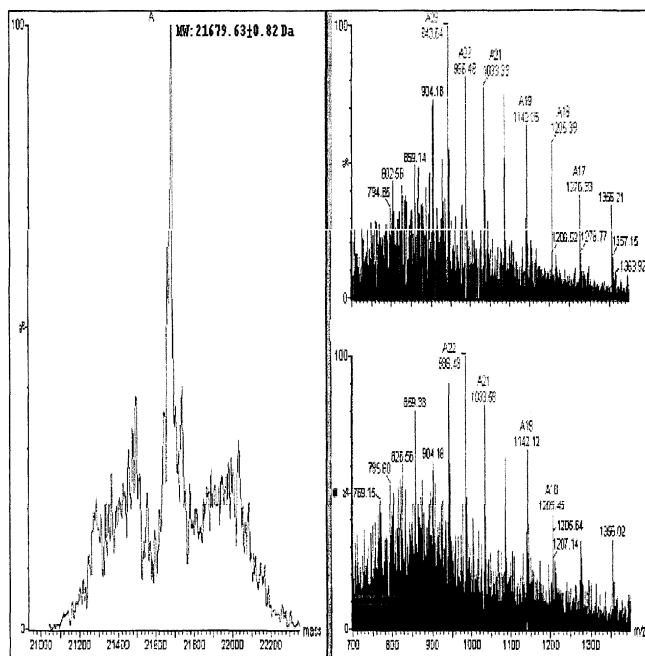
Фиг. 15



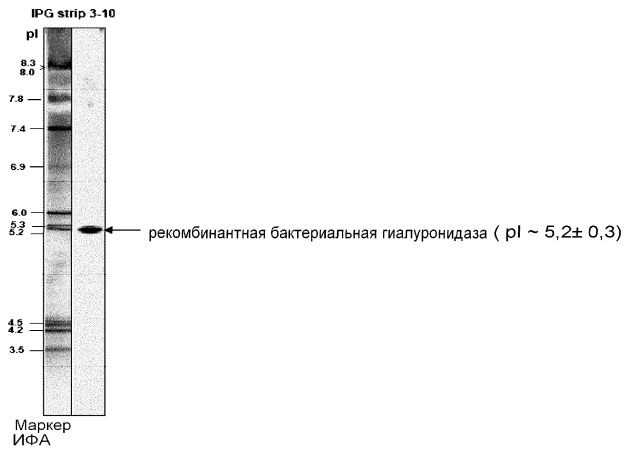
Фиг. 16



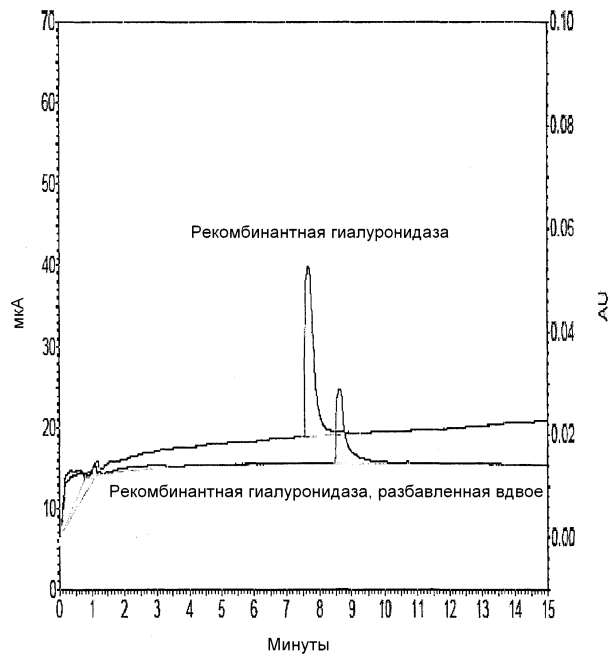
Фиг. 17



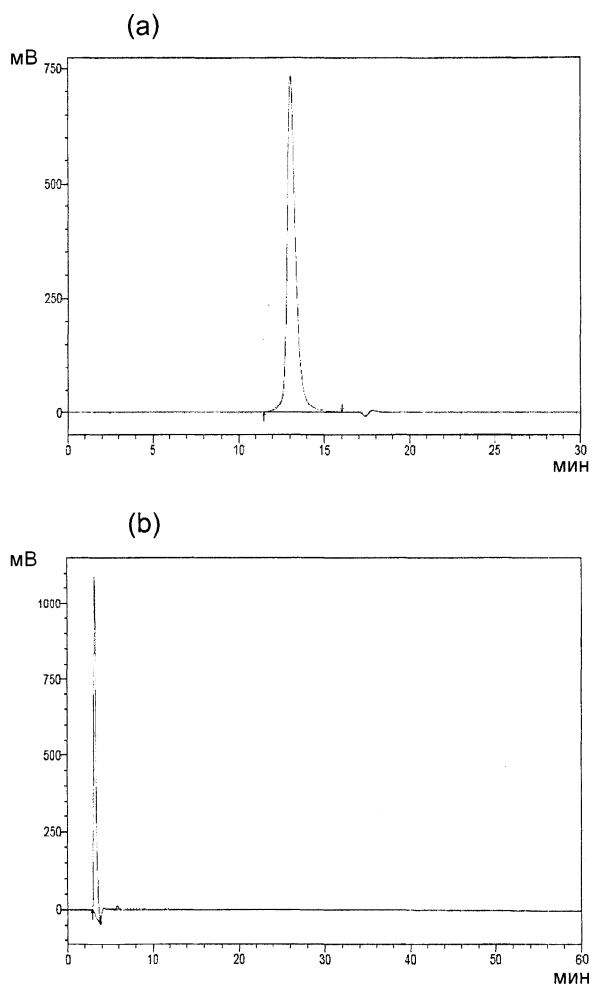
Фиг. 18



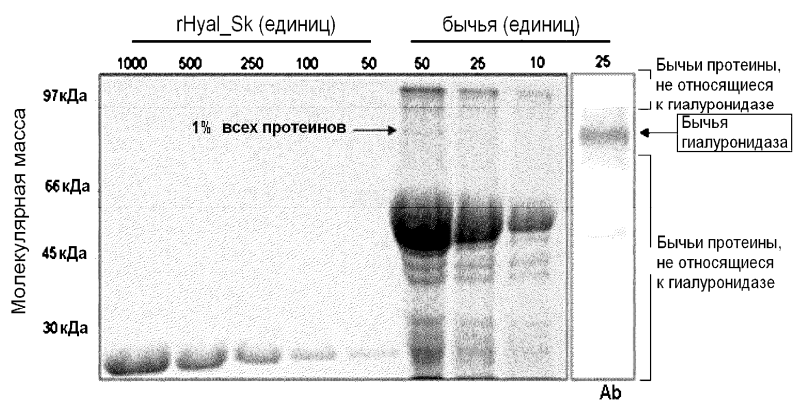
Фиг. 19



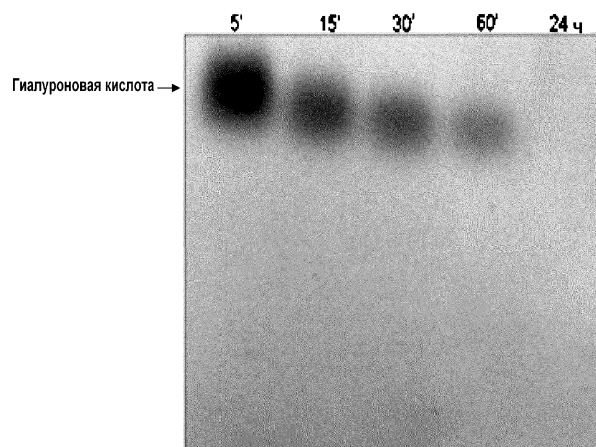
Фиг. 20



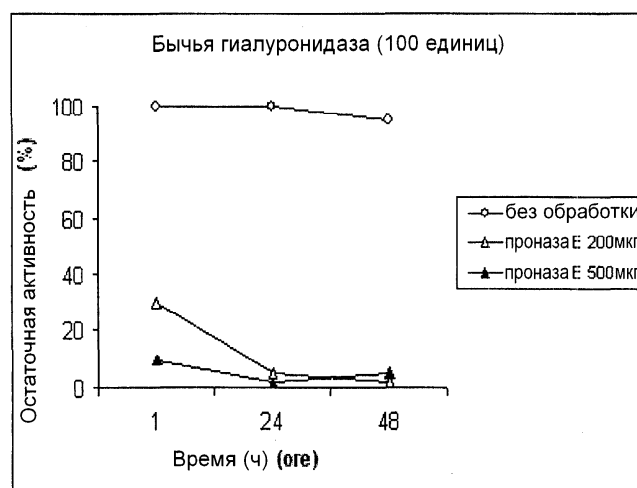
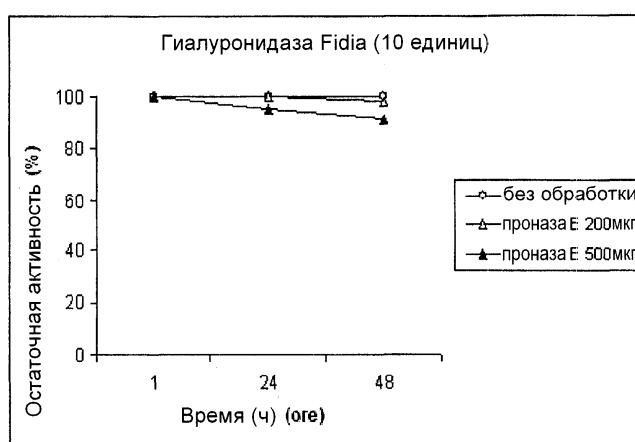
Фиг. 21



Фиг. 22

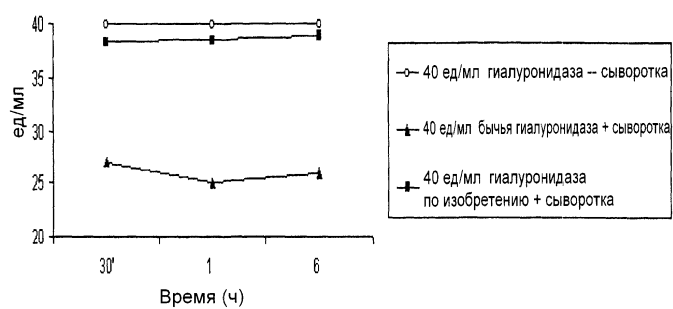


Фиг. 23

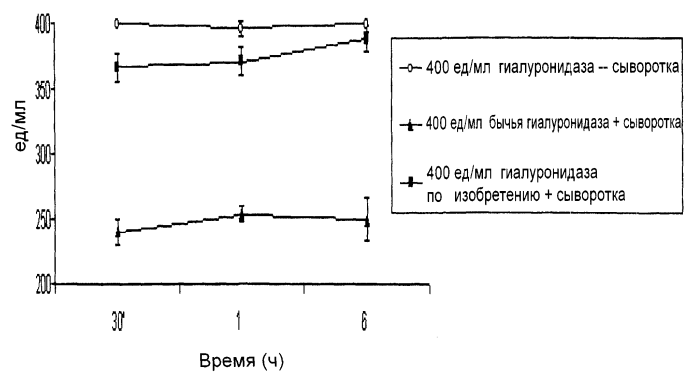


Фиг. 24

Ингибирование активности гиалуронидазы кровью животного



Ингибирование активности гиалуронидазы кровью человека



Фиг. 25

