

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА , ОПУБЛИКОВАННАЯ В
СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(43) Дата международной публикации
03 января 2019 (03.01.2019)

WIPO

(10) Номер международной публикации

WO 2019/004878 A 1

(51) Международная патентная классификация :
C12N 9/50 (2006.01) C12N 15/81 (2006.01)
C12N 15/57 (2006.01) C12R 1/19 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) C12R 1/84 (2006.01)
C12N 75/70 (2006.01)

(21) Номер международной заявки : PCT/RU20 18/050071

(22) Дата международной подачи :
28 июня 2018 (28.06.2018)

(25) Язык подачи : Русский

(26) Язык публикации : Русский

(30) Данные о приоритете :
2017122806 28 июня 2017 (28.06.2017) RU

(71) Заявитель : ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕР-
ВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕ-
ДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М.
СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРА-

НЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕ -
НОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ) (FEDERAL STATE
AUTONOMOUS EDUCATIONAL INSTITUTION OF
HIGHER EDUCATION I.M. SECHENOV FIRST
MOSCOW STATE MEDICAL UNIVERSITY OF THE
MINISTRY OF HEALTHCARE OF THE RUSSIAN
FEDERATION (SECHENOVSKIY UNIVERSITY))
[RU/RU]; ул. Трубецкая , д. 8, стр. 2, Москва , 119991,
Moscow (RU).

(72) Изобретатели : ЗАМЯТНИН , Андрей Александро -
вич (ZAMYATNIN, **Andrey Aleksandrovich**); Ленин -
ский проспект , д. 44, кв. 107, Москва , 119334, Moscow
(RU). ЗЕРНИЙ , Евгений Юрьевич (ZERNIY, **Evgeniy
Yurievich**); ул. Паустовского , д. 4, кв. 173, Москва ,
117463, Moscow (RU). ГОРОХОВЕЦ , Неонила Ва-
сильевна (GOROKHOVETS, **Neonila Vasilievna**);
ул. Лобачевского , д. 2, кв. 118, Москва , 119415,
Moscow (RU). КУЗНЕЦОВА , Наталья Викторовна
(KUZNETCOVA, **Natalia Viktorovna**); Алымов пер.,
д. 13, кв. 42, Москва , 107258, Moscow (RU). МАКА -
РОВ , Владимир Алексеевич (MAKAROV, **Vladimir**

(54) Title: PREPARATION OF WHEAT CYSTEINE PROTEASE TRITICAIN-ALPHA PRODUCED IN SOLUBLE FORM AND METHOD OF PRODUCING SAME

(54) Название изобретения : ПРЕПАРАТ ЦИСТЕИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ПШЕНИЦЫ ТРИТИКАИНА -АЛЬФА ,
ПОЛУЧЕННОЙ В РАСТВОРИМОЙ ФОРМЕ , И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА

(57) Abstract: The invention relates to the field of molecular biology, preparative biochemistry, biotechnology, and biopharmacology, namely to the creation of recombinant proteins of the family of wheat (*Triticum aestivum*) cysteine proteases in soluble form, and preparations of the protein triticain-alpha consisting of a fragment of wheat triticain-alpha and methods for the production thereof. The invention can be used for research purposes to study the functioning of papain-like cysteine proteases, as well as in medicine for developing therapeutic enzyme preparations, and is a method of producing, in soluble form, recombinant functionally active variants of wheat (*Triticum aestivum*) cysteine proteases, including the engineering of plasmid DNA for cloning in expression systems of *E. coli* and *P. Pastoris*. By transforming cells of *E. coli* of the strain Rossetta garni B (DE3) and cells of *P. pastoris* of the strain GS1 15 by means of plasmid DNA pET15-6HIS-triticain-a-GM, pET15-triticain-a-GM-6HIS, and pPIC9-triticain-a-GM respectively, truncated producing strains of wheat triticain-alpha are obtained, with subsequent culturing of host cells, separation of expressing protein, and purification by chromatographic methods. The invention allows variants of a biologically active fragment of wheat protease to be produced in soluble form in bacteria and yeast expression systems and allows the preparation triticain-alpha to be produced with a high, stable output, purity level and functional activity.

(57) Реферат : Изобретение относится к области молекулярной биологии , препаративной биохимии , биотехнологии , биофармакологии , а именно к созданию рекомбинантных белков семейства цистеиновых протеиназ пшеницы (*Triticum aestivum*) в растворимой форме и препараты белка тритикаина -альфа, состоящие из фрагмента тритикаина -альфа пшеницы и способов их получения . Изобретение может быть использовано в исследовательских целях для изучения функционирования папаин -подобных цистеиновых протеиназ , а также в медицине для разработки ферментных терапевтических препаратов , и представляет собой способ получения в растворимой форме рекомбинантных функционально активных вариантов цистеиновой протеазы пшеницы *Triticum aestivum*, включающий конструирование плазмидных ДНК для клонирования в экспрессионных системах *E. coli* и *P. pastoris*. Путем трансформации клеток *E. coli* штамма Rosetta garni B (DE3) и клеток *P. pastoris* штамма GS1 15 плазмидными ДНК pET15-6HIS-Triticain-a-GM, pET15-Triticain-a-GM-6HIS и pPIC9- Triticain-a-GM соответственно , получены штаммы - продуценты усеченной формы тритикаина -альфа пшеницы , с последующим культивированием клеток -хозяев , выделением экспрессирующегося белка и очисткой хроматографическими методами . Изобретение обеспечивает возможность получения вариантов биологически активного фрагмента протеазы пшеницы в растворимой форме в бактериальной и дрожжевой экспрессионных системах , а также получение препарата тритикаина -альфа с высоким и стабильным выходом , уровнем очистки и функциональной активности .



W^o 2019/004878 A1

Alekseevich); ул. 43 Армии , д. 9, кв. 90, Подольск , 142121, Podolsk (RU). САВВАТЕЕВА , Людмила Владимировна (**SAWATEEVA, Liudmila Vladimirovna**); Ташкентская ул., д. 19, кв. 69, Москва , 109444, Moscow (RU). ТАРАСОВ , Вадим Владимирович (**TARASOV, Vadim Vladimir ovich**); Хорошевское шоссе , д. 58, кв. 22, Москва , 123007, Moscow (RU).

(74) Агент : КУПРИЯНОВА , Ольга Ивановна (**KUPRIYANOVA, Olga Ivanovna**); ул. Трубецкая , д. 8, стр. 2, Москва , 119991, Moscow (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны) : АЕ, АG, АL, АМ, АО, АТ, АU, АZ, ВА, ВВ, ВG, ВН, ВN, ВR, ВW, ВY, ВZ, СА, СH, СL, СN, СO, СR, СU, СZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована :

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- до истечения срока для изменения формулы изобретения и с повторной публикацией в случае получения изменений (правило 48.2(h))
- с перечнем последовательностей в соответствии с Правилom 5.2(a)

ПРЕПАРАТ ЦИСТЕИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ПШЕНИЦЫ ТРИТИКАИНА -
АЛЬФА , ПОЛУЧЕННОЙ В РАСТВОРИМОЙ ФОРМЕ , И СПОСОБ
ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА

Область техники

5 Изобретение относится к области молекулярной биологии , препаративной биохимии , биотехнологии , биофармакологии , а именно к созданию способов получения рекомбинантных белков семейства цистеиновых протеиназ пшеницы (*Triticum aestivum*) в растворимой форме и препараты белка тритикаина -альфа, состоящие из фрагмента тритикаина -альфа пшеницы . Изобретение может быть
10 использовано в исследовательских целях для изучения функционирования папаин -подобных цистеиновых протеиназ , а также в медицине для разработки ферментных терапевтических препаратов .

Уровень техники

Тритикаины (triticain- α , - β , - γ) - высококонсервативные папаин -подобные
15 цистеиновые эндопротеазы пшеницы , состоящие из сигнального (лидерного) пептида , удаляющегося при активации про -пептидного домена , гранулин -подобного домена [GenBank A В 267407] и каталитического домена с каталитической триадой Cys-His-Asn [Т. Kiyosaki, Т. Asakura, I. Matsumoto, et al. J Plant Physiol, 2009, 1, 166(1), 101-6]. Цистеиновые протеиназы распространены в растениях и
20 экспрессируются в их различных органах [К. Muntz, М.А. Belozersky, Y.E. Dunaevsky, et al. J Exp Bot, 2001, 52, 1741-52, J.Q. Ling, Т. Kojima, М. Shiraiwa, et al. Biochim Biophys Acta, 2003, 1627, 129-39]. Предполагается , что эти ферменты участвуют в стадиейспецифическом расщеплении и пост -трансляционных модификациях запасующих белков [A. Capocchi, М. Cinollo, L. Galleschi, et al. JAgric
25 Food Chem, 2000,48, 6271-79, Т. Okamoto, Т. Shimada, I. Hara-Nishimura, et al. Plant Physiol, 2003, 132, 1892-1900]. Среди папаин -подобных цистеиновых протеиназ растений наиболее широко изучены ферменты риса и ячменя - оризаины (oryzain- α , - β , - γ) и эндопептидазы EPB (barley cysteine proteinase B-1, -2) [A. Mikkonen, I Porali, М. Cercos, et al. Plant Mol Biol, 1996, 31(2), 239-54, Н. Kondo, К. Abe, I. Nishimura, et
30 al. J Biol Chem, 1990, 15, 265(26), 15832-37], однако протеазы пшеницы начали изучать относительно недавно [Т. Kiyosaki, Т. Asakura, I. Matsumoto, et al. J Plant Physiol, 2009, 1, 166(1), 101-6, Т. Kiyosaki, I. Matsumoto, Т. Asakura, et al. FEBS J, 2007, 274, 1908-17].

Основным преимуществом папаин -подобных цистеиновых протеиназ из семян растений на данный момент является их эндопептидазная активность , в частности , глютеназная активность - способность эффективно гидролизовать пептиды глютена (запасного белка пшеницы , состоящего из смеси мономерных глиадинов и полимерных глютенинов) или родственных запасных белков ржи и ячменя . Это свойство растительных ферментов позволяет считать их перспективными объектами при разработке лекарственных средств для борьбы с целиакией . Целиакия (глютеновая энтеропатия) представляет собой комплексное воспалительное заболевание человека , которое развивается при наличии соответствующей генетической предрасположенности в ответ на обогатщенные остатками пролина и глутамина пептиды , являющиеся продуктами происходящего в пищеварительном тракте частичного протеолиза глютена [N. McGough, J.H. Cummings. Proc Nutr Soc, 2005, 64(4), 434-50, J.S. Leeds, A.D. Hopper, D.S. Sanders. Br Med Bull, 2008, 88(1), 157-70]. Распространенность глютенной энтеропатии во взрослой популяции большинства стран мира оценена как 1:100 - 1:250 или 0.5-1% от общей популяции [WGO - OMGE: Practice guidelines. World Gastroenterology News, 10 (2, 2), 2005, 1-8]. Доказанной эффективной терапией целиакии является пожизненная строгая безглютеновая диета , позволяющая предотвратить развитие осложнений и исключить клинические симптомы заболевания [S. Rashtak, J.A. Murray. Aliment Pharmacol Ther, 2012, 35(7), 768-81]. Однако главным недостатком безглютеновой диеты является сложность ее соблюдения из-за ее ограничительного характера , обусловленного как высокой стоимостью , так и сложностью подбора глютен -несодержащих продуктов питания .

В связи с этим , исследование и разработка способов получения высокоспецифичных протеиназ , стабильных и активных в присутствии эндогенных ферментов желудочно -кишечного тракта человека (т.е. в месте предполагаемого действия лекарственного препарата на их основе) имеет большое значение в терапевтических целях [L.V. Savvateeva, A.A. Zamyatnin. Curr Pharm Des, 2016, 22(16), 2439-49].

Из литературы известен метод получения проэнзимной формы цистеиновой протеиназы ячменя EP-B2 (proEP -B2) в *E.coli*. [H. Vora, J. McIntire, P. Kumar, et al. Biotechnol Bioeng, 2007, 1, 98(1), 177-85, заявка WO20081 15428 A2, 25.09.2008].

В рамках данного изобретения была выбрана протеиназа пшеницы *Triticum aestivum* - тритикаин -альфа , т.к. пшеница играет существенную роль как источник

питания в России, а значит, наиболее подходящая для разработки отечественных терапевтических препаратов для лечения целиакии.

Молекула полноразмерного тритикаина -альфа состоит из 461 аминокислотного остатка с молекулярным весом 50,4 кДа. Впервые фермент был клонирован и экспрессирован в зародыше и алейроновом слое пшеницы для выяснения его роли в процессе созревания семян [Т. Kiyosaki, Т. Asakura, I. Matsumoto, et al. J Plant Physiol, 2009, 1, 166(1), 101-6]. Однако непосредственно белок тритикаин -альфа выделен не был.

Биосинтез рекомбинантного тритикаина -альфа для исследования его протеолитических функций был осуществлен нами ранее [L.V. Savvateeva, N.V. Gorokhovets, V.A. Makarov, et al. Int J Biochem Cell Biol, 2015, 62, 115-24, Патент RU 2603054 C2, 20.11.2016]. В описанном способе рекомбинантный тритикаин -альфа (фрагмент полноразмерного белка) синтезировался в бактериальных клетках в нерастворимой форме, что требовало включения дополнительной, трудно валидируемой, стадии рефолдинга в процессе выделения целевого белка. Также, полученные препараты обладали меньшей активностью, чем полученные препараты в настоящей заявке, а также обладали меньшим выходом при выделении и меньшей чистотой.

Раскрытие изобретения

Задачей, решаемой в рамках настоящей заявки, является расширение ассортимента ферментативных препаратов, с потенциалом использования в качестве лекарственного средства, а также разработка эффективного способа получения высокоочищенного и высокоактивного препарата белка с последующим потенциальным применением в промышленных условиях. Существует необходимость разработки усовершенствованных экономически целесообразных технологий получения таких белков с сохранением высокого качества (степень чистоты, выход и активность) препаратов для исследовательских и прикладных целей.

Техническим результатом настоящего изобретения является получение высокоочищенного и высокоактивного препарата фрагмента протеазы пшеницы тритикаина -альфа, состоящего из пропептидного (продомена) и каталитического доменов полноразмерного тритикаина -альфа пшеницы (т.е. без лидерного пептида и гранулин -подобного домена), в растворимой форме с высоким выходом при

выделении , для фундаментальных и прикладных исследований (в частности , для использования в составе ферментных терапевтических средств).

Поставленная задача решается биологически активным белковым препаратом , обладающим высокой специфической активностью папаин -подобных цистеиновых протеиназ , состоящим из фрагмента (SEQ ID NO:2-4) 5 последовательности тритикаина -альфа (SEQ ID NO:1), экспрессирующегося в растворимой форме , чистота которого составляет не менее 85%. При этом препарат в котором фрагмент тритикаина -альфа содержит гексагистидиновую последовательность на N-конце , имеет последовательность SEQ ID NO:2, препарат , 10 имеющий гексагистидиновую последовательность на C-конце , имеет последовательность SEQ ID NO:3, а препарат , не содержащий гексагистидиновую последовательность на C- и N-концах , имеет последовательность SEQ ID NO:4.

Поставленная задача также решается способом получения биологически активного белкового препарата , обладающего специфической активностью папаин - 15 подобных цистеиновых протеиназ , рекомбинантной экспрессией в бактериальной системе , заключающийся в том , что проводят культивирование клеток *E.coli* штамма Rosetta gami B (DE3), трансформированных плазмидами pET15-6HIS-Triticain-a-GM или pET15-Triticain-a-GM-6HIS, содержащими последовательности ДНК , кодирующие белки с SEQ ID NO:2-3, соответственно , в среде LB с добавлением 20 ампициллина при 37°C в аэробных условиях в течение 12-14 ч, посевным материалом инокулируют питательную среду , растят культуру до достижения оптической плотности A_{600} 0.6-0.8, индуцируют 1 mM изопропилтио - β -D-галактозидом и растят еще 20 ч при 18°C с накоплением растворимой формы белка с SEQ ID NO:2-3; далее осажденные центрифугированием экспрессионные культуры 25 ресуспендируют в 0.02 M фосфатном буфере , pH 8.0, содержащем 0.5 M NaCl и 0.01 M имидазол (буфер А), и гомогенизируют на ультразвуковом дезинтеграторе в течение 1 мин при 4°C, полученную после центрифугирования лизатов соответствующую надосадочную жидкость наносят на колонку с активированной ионами никеля иминодиацетат -сефарозой , уравновешенную буфером А , сорбент 30 последовательно промывают уравновешивающим буфером А , затем белок элюируют буфером А с содержанием 0.3 M имидазола , далее раствор белка диализуют против 0.02 M фосфатного буфера , pH 8.0 и после определения концентрации и протеолитической активности белка с SEQ ID NO:2-3, в полученном препарате , аликвотируют по стеклянным флаконам , замораживают и лиофилизируют . При этом

используют нуклеиновую кислоту , кодирующую белок с SEQ ID NO: 2- 3, а в качестве вектора экспрессии используют вектор на основе pET 15b.

Поставленная задача также решается способом получения биологически активного белкового препарата , обладающим высокой специфической активностью

5 папаин -подобных цистеиновых протеиназ , рекомбинантной экспрессией в дрожжевой системе , заключающийся в том , что проводят культивирование клеток *P.pastoris* штамма GS115 (His^- , $\text{Mut}^+/\text{Mut}^s$), трансформированных плазмидой pPIC9-Triticain-a-GM, содержащей последовательность ДНК , кодирующей белок с SEQ ID NO:4 в среде YPD при 30°C в шейкер -инкубаторе до достижения оптической

10 плотности Абоо 1.5, клеточные суспензии растирают на чашке Петри с минимальной безгистидиновой агаризованной средой и инкубируют при 30°C до появления колоний , затем одной колонией полученных трансформантов *Pichia pastoris* GS1 15/pPIC9-Triticain-a-GM, содержащих одну или две копии фрагмента гена усеченного тритикаина -альфа, инокулируют питательную среду BMGY и

15 наращивают клеточную массу при 30°C в шейкер -инкубаторе до оптической плотности 5 о.е. (Mut^+) или 25 о.е. (Mut^s), осаждают центрифугированием и осадки ресуспендируют в среде BMMY с последующим инкубированием в течение 96 ч при 30°C и 300 об/мин , добавляя каждые 24 ч в качестве индуктора экспрессии метанол до конечной концентрации 0.7%, затем клетки осаждают , отбирают

20 супернатанты ; далее надосадочную культуральную жидкость *Pichia pastoris* GS1 15/pPIC9-Triticain-a-GM фильтруют (0.45 мкм) и диализуют против 0.02 М раствора фосфата натрия , pH 8.0 при 4°C в течение 24 ч, диализат концентрируют и наносят на колонку с сорбентом Sephacryl S-200HR, уравновешенную 0.02 М фосфатным буфером , pH 8.0, содержащим 130 mM NaCl, далее собирают белковые

25 фракции по 6 мл и анализируют на присутствие белка (SEQ ID NO:4) методами электрофоретического анализа и определяют концентрацию и протеолитическую активность , далее биологически активный белковый препарат аликвотируют по стеклянным флаконам , замораживают и лиофилизируют . При этом для реализации способа используют нуклеиновую кислоту , кодирующую белок с

30 последовательностью SEQ ID NO:4 для использования в способе получения биологически активного белкового препарата и вектор экспрессии на основе pPIC9.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 приведена электрофореграмма в 12% полиакриламидном геле в присутствии SDS: лизатов клеток штамма -продуцента *E.coli* Rosetta gami B(DE3) / pET15-6HIS-Triticain-a-GM до индукции (дорожка 1), лизатов клеток штамма -продуцента *E.coli* Rosetta gami B(DE3) / pET15-6HIS-Triticain-a-GM после индукции
5 изопропилтио β -D-галактозидом (дорожка 2); растворимая клеточная фракция (дорожка 3), нерастворимая клеточная фракция (дорожка 4); рекомбинантный усеченный тритикаин -альфа (SEQ ID NO:2, 6HIS-Triticain-a-GM, дорожка 5) после хроматографического выделения; М - белковые маркеры молекулярной массы (кДа).

На фиг. 2 приведена электрофореграмма в 12% полиакриламидном геле в присутствии SDS: лизатов клеток штамма -продуцента *E.coli* Rosetta gami B(DE3) / Triticain-a-GM-6HIS до индукции (дорожка 1), лизатов клеток штамма -продуцента *E.coli* Rosetta gami B(DE3) / Triticain-a-GM-6HIS после индукции изопропилтио β -D-галактозидом (дорожка 2); растворимая клеточная фракция (дорожка 3), нерастворимая клеточная фракция (дорожка 4); рекомбинантный усеченный
15 тритикаин -альфа (SEQ ID NO:3, Triticain-a-GM-6HIS, дорожка 5) после хроматографического выделения; М - белковые маркеры молекулярной массы (кДа).

На фиг. 3 Рекомбинантный усеченный тритикаин -альфа (SEQ ID NO:4, γ -Triticain-a-GM, экспрессированный в клетках *P.pastoris*) после хроматографического выделения в 14% полиакриламидном геле в присутствии SDS (М - белковые
20 маркеры молекулярной массы, кДа); (М - белковые маркеры молекулярной массы, кДа);

На фиг. 4 приведена гистограмма, демонстрирующая специфическую (протеолитическую) активность вариантов рекомбинантных белков усеченного тритикаина -альфа и папаина (как контроля цистеиновых папаин-подобных
25 протеиназ): 1 - папаин; 2 - рекомбинантный фрагмент тритикаин -альфа из нерастворимой фракции; 3 - усеченный тритикаин -альфа, экспрессированный в клетках *P.pastoris* (SEQ ID NO:4, γ -Triticain-a-GM); 4 - усеченный тритикаин -альфа с N-концевой полигистидиновой последовательностью (SEQ ID NO:2, 6HIS-Triticain- α -GM); 5 - усеченный тритикаин -альфа с C-концевой полигистидиновой
30 последовательностью (SEQ ID NO:3, Triticain-a-GM-6HIS).

Осуществление изобретения

В перечне последовательностей в SEQ ID NO:1 указана аминокислотная и нуклеотидная последовательности рекомбинантного полноразмерного тритикаина -

альфа, экспрессирующегося в *E.coli* (TRIT- α , курсивом выделена последовательность от экспрессионной плазмиды pET -42a(+); курсивом и подчеркиванием выделены сайты узнавания рестриктазами ; подчеркиванием выделен лидерный пептид ; курсивом и цветом выделена каталитическая триада Cys-His-Asn, определяющая принадлежность белка к цистеиновым протеазам ; цветом выделен гранулин -подобный домен ; подчеркиванием выделены сайты узнавания рестриктазами); SEQ ID NO:2 - аминокислотная и нуклеотидная последовательности рекомбинантного усеченного тритикаина -альфа с N-концевой полигистидиновой последовательностью , экспрессирующегося в *E.coli* в растворимой форме (, 6HIS-Triticain-a-GM; курсивом выделена последовательность от экспрессионной плазмиды pET -15b; подчеркиванием выделены сайты узнавания рестриктазами ; курсивом и цветом выделена каталитическая триада Cys-His-Asn, определяющая принадлежность белка к цистеиновым протеазам); SEQ ID NO:3 - аминокислотная и нуклеотидная последовательности рекомбинантного усеченного тритикаина -альфа с C-концевой полигистидиновой последовательностью , экспрессирующегося в *E.coli* в растворимой форме (, Triticain-a-GM-6HIS; курсивом выделена последовательность от экспрессионной плазмиды pET -15b; подчеркиванием выделены сайты узнавания рестриктазами ; курсивом и цветом выделена каталитическая триада Cys-His-Asn, определяющая принадлежность белка к цистеиновым протеазам); SEQ ID NO:4 - аминокислотная и нуклеотидная последовательности рекомбинантного усеченного тритикаина -альфа, экспрессирующегося в *P.pastoris* (, γ -Triticain-a-GM; курсивом выделена последовательность от экспрессионной плазмиды pPIC9; цветом выделен α -фактор ; стрелкой выделен сигнал отщепления α -фактора ; подчеркиванием выделены сайты узнавания рестриктазами);

Настоящее изобретение поясняется конкретными примерами выполнения , которые не ограничивают заявленный объем притязаний , при этом наглядно демонстрируют возможность достижения требуемого технического результата .

Пример 1. Клонирование усеченных фрагментов гена тритикаина -альфа для бактериальной экспрессии белков в растворимой форме .

На основе известной последовательности мРНК пшеницы (*Triticum aestivum*), кодирующей полноразмерный ген тритикаина -альфа (GenBank AV267407), синтезируют комплементарную ДНК (кДНК) с использованием обратной транскриптазы мышинного вируса лейкемии Молони и праймера на 3'-нетранслируемую область мРНК 5'- gggggatccttacgcgctacttttctgccc. Амплификацию

Пример 2. Клонирование фрагмента гена тритикаина -альфа для дрожжевой экспрессии белка в растворимой форме .

Конструирование новой последовательности ДНК , кодирующей усеченный фрагмент гена тритикаина -альфа (γ -Triticain-a-GM, SEQ ID NO:4) для экспрессии в 5 дрожжевой системе , осуществляют на основе плазмидной ДНК pET_TRIT-a в качестве матрицы и праймеров : 5'-tgaattetccatcgtgctgacggg (сайт рестрикции *EcoRI* выделен подчеркиванием) и 5'-attgcggccgcttagcccgcttcgctcgg (сайт рестрикции *NotI* выделен подчеркиванием). Продукт амплификации клонируют в экспрессионный вектор *Pichia pastoris* pPIC9 по указанным сайтам , который позволяет получать 10 целевой белок в секретируемом виде за счет сигнальной последовательности (а-фактора).

Пример 3. Экспрессия фрагмента тритикаина -альфа пшеницы в растворимой форме в *E.coli*.

Штамм *E.coli* Rosetta gami B (DE3), трансформированный плазмидой pET 15- 15 6HIS-Triticain-a-GM выращивают в среде LB (10 г/л триптон , 5 г/л дрожжевой экстракт , 5 г/л NaCl) при 37°C в аэробных условиях с добавлением ампициллина (до конечной концентрации 50 мг/мл) в течение 12-14 ч (посевной материал), инокулируют новую порцию питательной среды в соотношении 1:50, растят культуру до достижения оптической плотности A_{600} 0.6-0.8, охлаждают во льду в 20 течение 15 мин и индуцируют изопропилтио β -D-галактозидом (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ , после чего клетки продолжают инкубировать 20 ч при 18°C . При индукции ИПТГ происходит биосинтез рекомбинантного 6HIS-Triticain-a-GM (SEQ ID NO:2), который накапливается в клетках как в растворимой форме , так и в тельцах включения (фиг.1). Отбирают пробы клеточной суспензии до и после 25 индукции в количестве , соответствующем 0.1 оптических единиц (о.е.), осаждают центрифугированием , суспендируют в лизирующем буфере (0.03 М Трис -HCl, pH 6.8, 10% глицерин , 1% додецилсульфат натрия , 3% меркаптоэтанол , 0.005% бромфеноловый синий), нагревают 5 мин при 95°C, и образцы объемом 20 мкл анализируют электрофорезом в 12% полиакриламидном геле с додецил сульфатом 30 натрия . Гель прокрашивают кумасси R-250 по стандартной методике и сканируют для определения относительного количества белка в полосе целевого белка (фиг.1). По данным сканирования содержание рекомбинантного 6HIS-Triticain-a-GM составляет 15-20% от всех клеточных белков .

Аналогичным образом осуществляют экспрессию фрагмента тритикаина -альфа Triticain-a-GM-6HIS (SEQ ID NO:3), используя трансформированные плазмидой pET15-Triticain-a-GM-6HIS клетки штамма Rosetta gami B (DE3). Результат биосинтеза рекомбинантного белка анализируют электрофорезом в 12% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (фиг.2). По данным сканирования геля содержание рекомбинантного Triticain-a-GM-6HIS составляет 15-20% от всех клеточных белков, причем целевой белок синтезируется в бактериальных клетках исключительно в растворимой форме.

Пример 4. Получение высокоочищенного препарата рекомбинантного фрагмента тритикаина -альфа из *E.coli*.

Очистку целевых белков 6HIS-Triticain-a-GM (SEQ ID NO:2) и Triticain-a-GM-6HIS (SEQ ID NO:3) проводят методом аффинной (металл-хелатной) хроматографии. Получение рекомбинантного 6HIS-Triticain-a-GM и Triticain-a-GM-6HIS из клеток штаммов -продуцентов Rosetta gami B (DE3)/pET15-6HIS-Triticain-a-GM и Rosetta gami B (DE3)/pET15-Triticain-a-GM-6HIS соответственно, включает несколько стадий. Осажденную центрифугированием клеточную биомассу экспрессионной культуры ресуспендируют в 0.02 М фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 0.5 М NaCl и 0.01 М имидазол (буфер А), и гомогенизируют на ультразвуковом дезинтеграторе в течение 1 мин (12x5 с) при 4°C. Полученную после центрифугирования лизата (10000xg, 4°C, 15 мин) надосадочную жидкость наносят на колонку с активированной ионами никеля иминодиацетат-сефарозой, уравновешенную буфером А. Процесс хроматографии проводят на системе BioLogic (BioRad) с детекцией при 280 нм. Сорбент последовательно промывают уравновешивающим буфером А. Связавшийся с сорбентом белок элюируют буфером А с содержанием 0.3 М имидазола. Раствор диализуют против 0.02 М фосфатного буфера, pH 8.0 при 4°C в течение 24 ч, трижды производя замену буфера на свежий. Концентрацию целевого белка определяют с помощью BCA-реагента (бицинхониновой кислоты), аликвотируют по стеклянным флаконам, замораживают и лиофилизируют.

Выход полученных таким способом рекомбинантных вариантов усеченного тритикаина -альфа в растворимой форме составляет не менее 15 мг (15-24 мг) с 1 л для бактериальной культуры Rosetta gami B (DE3)/pET15-6HIS-Triticain-a-GM и не менее 5 мг с 1 л - для Rosetta gami B (DE3)/pET15-Triticain-a-GM-6HIS. Чистота полученных препаратов по данным электрофоретического анализа составляет не

менее 85% (фиг. 1, 2; следует отметить, что целевые белки 6HIS-Triticain-a-GM (SEQ ID NO:2) и Triticain-a-GM-6HIS (SEQ ID NO:3), проявляющие протеолитическую активность, подвергаются автопротеолизу в процессе выделения).

5 Пример 5. Экспрессия фрагмента тритикаина -альфа пшеницы в растворимой форме в *P.pastoris*.

Для трансформации клеток *Pichia pastoris* дрожжевой экспрессионной плазмидой pPIC9-Triticain-a-GM был использован ауксотрофный по гистидину штамм *Pichia pastoris* GS115 (His⁻, Mut⁺). Плазмиду pPIC9-Triticain-a-GM линеаризуют по сайту *Bgl*U. Трансформацию клеток *Pichia pastoris* проводят 10 методом электропорации. Клетки штамма GS115 высевают на чашку с агаризованной средой YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% глюкоза) и инкубируют при 30°C 2 дня до появления отдельных колоний. Одной колонией инокулируют 5 мл среды YPD в колбе объемом 50 мл и наращивают клетки в течение ночи при 30°C в шейкер-инкубаторе при 300 об/мин. Далее 200 мл свежей 15 среды YPD засевают 0.2 мл ночной культуры и снова наращивают клетки в течение ночи при 30°C в шейкер-инкубаторе до достижения оптической плотности клеточной суспензии A_{600} 1.5. Клетки осаждают центрифугированием (1500x g, 5 мин, 4°C), осадок дважды промывают 200 мл и 100 мл охлажденной во льду стерильной воды соответственно, после чего клетки снова осаждают и 20 ресуспенсируют в 8 мл холодного 1 М сорбита. Затем клетки снова осаждают и ресуспенсируют в 0.6 мл ледяного 1 М сорбита. 40 мкл клеточной суспензии смешивают с 5 мкг линеаризованной плазмиды в 10 мкл буфера TE (0.01 М Трис - HCl, 0.001 М ЭДТА, pH 8.0). Смесь помещают в охлажденную 2 мм кювету и охлаждают во льду 5 мин. Затем кювету помещают в отсек шоковой камеры 25 электропоратора и генерируют единичный импульс. Кювету извлекают из камеры и быстро добавляют 1 мл ледяного 1 М сорбита. Содержимое кюветы переносят в стерильные микропробирки. По 100, 300 и 600 мкл клеточной суспензии, трансформированной линеаризованной плазмидой pPIC9-Triticain-a-GM, растирают на чашке Петри с минимальной безгистидиновой агаризованной средой. Для 30 контроля выживаемости по 10 мкл клеточных суспензий после электропорации суспендируют в 100 мкл 1 М сорбита и по 10 мкл растирают на чашках Петри с агаризованной YPD средой. Чашки инкубируют при 30°C до появления колоний (2-4 дня).

В зависимости от способа рекомбинации и локуса встраивания линеаризованной плазмиды трансформированные клетки *Pichia pastoris* GS115 (Mut^+) могут приобретать Mut^s фенотип. Для подтверждения Mut^+ и Mut^s фенотипов трансформантов колонии высевают на чашки с минимальной агаризованной средой, содержащей метанол и глюкозу (ММ и MD соответственно), подразумевая, что дрожжевые клетки фенотипа Mut^s делятся в ММ среде медленнее, чем в MD среде (что визуально определяется сравнением размеров колоний на ММ и MD чашках через 2-3 суток инкубации при 30°C). Точную принадлежность дрожжевых трансформантов к Mut^+ или Mut^s фенотипу подтверждают методом полимеразной цепной реакции. Для этого из выбранных клонов с ММ и MD чашек выделяют ДНК и анализируют методом ПЦР с использованием прямого 5' AOX1 (gactggtccaattgacaagc) и обратного 3' AOX1 (gcaaatggcattctgacatcc) праймеров при условиях амплификации: 95°C 3 мин, денатурация 95°C 30 с, 30 циклов, отжиг 54°C 30 с, элонгация 72°C 2 мин, затем 72°C 5 мин. Пробы анализируют методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. По размерам ампликонов ДНК клонов Mut^+ и Mut^s фенотипа (2140 п.н. и 1476 п.н. соответственно) выявляют преобладающий фенотип (Mut^+). Полученные трансформанты *Pichia pastoris* GS115/pPIC9-Triticain-a-GM содержат как минимум одну копию фрагмента гена тритикаина -альфа. По результатам анализа отбирают несколько клонов Mut^+ и Mut^s фенотипов для экспрессии целевого рекомбинантного белка.

Для получения двойных трансформантов линеаризованную по сайту рестрикции *Sai*I плазмиду pPIC9K-Triticain-a-GM трансформировали в полученные ранее клетки *Pichia pastoris* GS115/pPIC9-Triticain-a-GM (Mut^+ и Mut^s). Отбор двойных трансформантов проводили на генетицин-содержащей среде (0,15 мг/мл).

Для исследования способности трансформантов *P.pastoris* Mut^+ и Mut^s фенотипов секретировать γ -Triticain-a-GM (SEQ ID NO:4) одной колонией каждого клона трансформанта и контрольных штаммов со свежих чашек инокулируют 4 мл среды BMGY (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % биотин, 1% глицерин, 0.1 М фосфат калия, pH 6.0). Клеточную массу наращивают при 30°C в шейкер-инкубаторе при 300 об/мин до достижения A_{600} 1 о.е. (для Mut^+) и A_{600} 5 о.е. (для Mut^s). Для AOX-контролируемой индукции экспрессии клеточные суспензии в объеме, содержащем 5 о.е. (Mut^+) или 25 о.е. (Mut^s), осаждают центрифугированием и осадки ресуспендируют в 5 мл среды BMMY (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон,

1.34% YNB, 4×10^{-5} % биотин, 0.5% метанол, 0.1 М фосфат калия, pH 6.0). Клетки инкубируют в течение 96 ч при 30°C и 300 об/мин. Каждые 24 ч добавляют метанол до конечной концентрации 0.7%. После окончания инкубации клетки осаждают центрифугированием (4000xg, 5 мин, 4°C). Супернатанты отбирают, замораживают в жидком азоте и хранят при -70°C до последующего анализа. Наличие рекомбинантного γ -Triticain-a-GM в супернатантах клеточной культуры *P. pastoris* определяют методом электрофореза в 14% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия.

Пример 6. Получение высокоочищенного рекомбинантного γ -Triticain-a-GM из *Pichia pastoris*.

Надосадочную культуральную жидкость *Pichia pastoris* GS115/pPIC9-Triticain-a-GM фильтруют (0.45 мкм) и диализуют против 0.02 М раствора фосфата натрия, pH 8.0 при 4°C в течение 24 ч, трижды производя замену буфера на свежий. Диализат концентрируют ультрафильтрацией на ячейке Amicon с мембраной RC-10 (Millipore) и наносят на колонку с сорбентом Sephacryl S-200HR, уравновешенную 0.02 М фосфатным буфером, pH 8.0, содержащем 130 мМ NaCl. Процесс гель-фильтрации проводят со скоростью 0,5 мл/мин, фракции по 6 мл собирают и анализируют на присутствие целевого белка методами электрофоретического анализа и определения протеолитической активности. Очищенный белок концентрируют на ячейке Amicon с мембраной RC-10 (Millipore), определяют концентрацию с помощью BCA-реагента (бицинхоновой кислоты), аликвотируют по стеклянным флаконам, замораживают и лиофилизируют.

Выход полученного таким способом рекомбинантного γ -Triticain-a-GM (SEQ ID NO:4) составляет 80-300 мг с 1 л дрожжевой культуры (с чистотой не менее 90% по данным электрофоретического анализа, фиг. 3; следует отметить, что целевой белок γ -Triticain-a-GM (SEQ ID NO:4) в процессе секреции подвергается автопротеолизу).

Пример 7. Определение протеолитической активности вариантов рекомбинантных белков усеченного тритикаина -альфа (6HIS-Triticain-a-GM, Triticain-a-GM-6HIS и γ -Triticain-a-GM).

Ферментативную (протеолитическую) активность рекомбинантного усеченного тритикаина -альфа определяют по способности гидролизовать синтетический модельный пептидный субстрат PLVQ-AMK, конъюгированный с 7-Амино-4-метилкумарином (AMK), с определением продуктов гидролиза по

интенсивности флуоресценции свободного АМК . Последовательность и структура выбранного пептида PLVQ (пролин -лейцин -валин -глутамин), представляющего собой фрагмент глютена , являются оптимальными для связывания и гидролиза тритикаином -альфа [заявка WO20081 15428 A 2, 25.09.2008].

5 Анализ проводят при 25°С в реакционной смеси , состоящей из 20 нМ целевого белка (рекомбинантного тритикаина -альфа) и 50 мкМ PLVQ-АМК в 200 мМ ацетатном буфере , рН 5.6, содержащем 100 мМ NaCl, 15 мМ 2-меркаптоэтанол , 0.6 мМ ЭДТА , 0.5 % ДМСО . Количество гидролизованного субстрата PLVQ-АМК определяют по интенсивности флуоресценции свободного АМК с использованием

10 многорежимного автоматического спектрофлуориметра при длине волны возбуждения флуоресценции , равной 360 нм, и длине волны испускания флуоресценции , равной 460 нм. Скорость реакции определяли по графику зависимости количества субстрата (моль) от времени гидролиза (с) с последующей обработкой полученных данных с применением метода линейной регрессии . Для

15 репрезентативности данные по специфической активности представлены в виде гистограммы (фиг .4).

Сравнивали активность полученных препаратов усеченного тритикаина -альфа , полученного в растворимой форме , с препаратами усеченного тритикаина -альфа , полученного ранее в нашей лаборатории в нерастворимой форме и папаином .

20 Активность белковых препаратов усеченного тритикаина -альфа , полученного в растворимой форме 6HIS-Triticain-a-GM (SEQ ID NO:2) и Triticain-a-GM-6HIS (SEQ ID NO:3) значительно превысила активность препарата усеченного тритикаина -альфа 6HIS-Triticain-a-GM, полученного в нерастворимой форме , а также папаина , что является существенным преимуществом препаратов , полученных

25 нами в рамках данной заявки . Активность препарата усеченного тритикаина -альфа γ -Triticain-a-GM (SEQ ID NO:4), полученного в дрожжевой экспрессионной системе , оказалась ниже , чем активность препарата усеченного тритикаина -альфа 6HIS-Triticain-a-GM, полученного в нерастворимой форме , и папаина , однако , принимая во внимание высокое содержание в препарате и высокий выход при экспрессии

30 белка γ -Triticain-a-GM, такой результат также является промышленно применимым и технически значимым .

Преимуществами заявленного технического решения являются , во-первых , получение протеолитически активного препарата тритикаина -альфа , состоящего из

пропептидного (продомена) и каталитического доменов полноразмерного тритикаина -альфа пшеницы, который может быть использован для создания новых более эффективных лекарственных энзиматических средств, а также в исследовательских целях, в частности, для изучения функционирования папаин-подобных цистеиновых протеиназ; во-вторых, возможность получения вариантов протеолитически активного тритикаина -альфа в растворимой форме как в бактериальных, так и в дрожжевых клетках; в-третьих, упрощенная методика выделения вариантов рекомбинантного белка из *E.coli* за счет исключения стадии рефолдинга *in vitro*, т.е. времязатратной и сложно валидируемой процедуры, что в

5

10

последствии послужит основой для создания ферментных лекарственных средств в терапии некоторых заболеваний (в частности, целиакии).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биологически активный белковый препарат, обладающий специфической активностью папаин-подобных цистеиновых протеиназ, характеризующийся тем, что белок экспрессируется в растворимой форме и представляет собой
5 аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:2-4.

2. Способ получения биологически активного белкового препарата по п.1, обладающего специфической активностью папаин-подобных цистеиновых протеиназ, характеризующийся тем, что включает трансформацию клеток плазмидами, содержащими ДНК, кодирующую белок с аминокислотной
10 последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2-4, культивирование и выделение биологически активного препарата.

3. Способ по п. 2, характеризующийся тем, что для трансформации плазмидами, содержащими последовательности ДНК, кодирующие белки с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:2-3, используют
15 клетки *E.coli* штамма Rosetta gami B (DE3), в качестве среды культивирования используют среду LB с добавлением ампициллина и инкубируют при 37°C в аэробных условиях в течение 12-14 ч, посевным материалом инокулируют питательную среду, растят культуру до достижения оптической плотности A_{600} 0.6-0.8, индуцируют 1 мМ изопропилтио- β -D-галактозидом и растят еще 20 ч при 18°C с
20 накоплением растворимой формы белка, а выделение биологически активного препарата осуществляют осаждением путем центрифугирования экспрессионной культуры, после чего осадок ресуспендируют в 0.02 М фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 0.5 М NaCl и 0.01 М имидазол (буфер А), и гомогенизируют на ультразвуковом дезинтеграторе в течение 1 мин при 4°C, полученный лизат
25 центрифугируют, надосадочную жидкость наносят на колонку с активированной ионами никеля иминодиацетат-сефарозой, уравновешенную буфером А, сорбент последовательно промывают уравновешивающим буфером А, затем белок элюируют буфером А с содержанием 0.3 М имидазола, далее раствор белка диализуют против 0.02 М фосфатного буфера, pH 8.0 и после определения концентрации и
30 протеолитической активности белка в полученном препарате, аликвотируют по стеклянным флаконам, замораживают и лиофилизируют.

4. Способ по п. 2, характеризующийся тем, что для трансформации плазмидой, содержащей последовательность ДНК, кодирующую белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:4, используют клетки *P.pastoris*

штамма GS115, в качестве среды культивирования используют среду YPD и инкубируют при 30°C в шейкер -инкубаторе до достижения оптической плотности А600 1.5, клеточные суспензии растирают на чашке Петри с минимальной безгистидиновой агаризованной средой и инкубируют при 30°C до появления колоний, затем одной колонией полученных трансформантов *Pichia pastoris* GS1 15/pPIC9-Triticain-a-GM, содержащих одну или две копии фрагмента гена усеченного тритикаина -альфа, инокулируют питательную среду BMGY и наращивают клеточную массу при 30°C в шейкер -инкубаторе до оптической плотности 5 о.е. (Mut⁺) или 25 о.е. (Mut^s), выделение биологически активного препарата осуществляют осаждением путем центрифугирования, полученный осадок ресуспендируют в среде BMMY с последующим инкубированием в течение 96 ч при 30°C и 300 об/мин, добавляя каждые 24 ч в качестве индуктора экспрессии метанол до конечной концентрации 0.7%, затем клетки осаждают, отбирают супернатанты; далее надосадочную культуральную жидкость фильтруют (0.45 мкм) и диализуют против 0.02 М раствора фосфата натрия, pH 8.0 при 4°C в течение 24 ч, диализат концентрируют и наносят на колонку с сорбентом Sephacryl S-200HR, уравновешенную 0.02 М фосфатным буфером, pH 8.0, содержащим 130 мМ NaCl, далее собирают белковые фракции по 6 мл и анализируют на присутствие белка методами электрофоретического анализа и определяют концентрацию и протеолитическую активность, далее биологически активный белковый препарат аликвотируют по стеклянным флаконам, замораживают и лиофилизируют.

5. Нуклеиновая кислота, кодирующая биологически активный белковый препарат, обладающий специфической активностью папаин -подобных цистеиновых протеиназ, по п.1, характеризующаяся тем, что предназначена для использования в способе по п.2.

6. Вектор экспрессии, характеризующийся тем, что содержит нуклеиновую кислоту по п.5 для использования в способе по п.2.

7. Вектор экспрессии по п.6, характеризующийся тем, что представляет собой вектор на основе pET 15b или pPIC9.

8. Клетка -хозяин, характеризующаяся тем, что содержит нуклеиновую кислоту по п.5, кодирующую биологически активный белковый препарат по п.1, для использования в способе по п.2.

9. Клетка -хозяин по п.8, характеризующаяся тем, что представляет собой клетку *E.coli* штамма Rosetta gami B (DE3) или *P.pastoris* штамма GS115.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

<120> ПРЕПАРАТ ЦИСТЕИНОВОЙ ПРОТЕИНАЗЫ ПШЕНИЦЫ ТРИТИКАИНА АЛЬФА , ПОЛУЧЕННОЙ В РАСТВОРИМОЙ ФОРМЕ , И СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА

<160> SEQ ID NO:1

Met His His His His His His Ala
cat atg cat cat cat cat cat cat gcc
Ndel

Met Arg Ser Ser Met Ala Leu Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Leu Ala Ala Ala Ala Ala
atg agg age tec atg gcc etc ttg gcg gcg gcg ctg ctg ctg ctg gtg tgc ctg gcg gcg gcg gcg

Asp Met Ser Ile Val Ser Tyr Gly Glu Arg Ser Glu Glu Glu Val Arg Arg Met Tyr Ala Glu Trp
gac atg teg ate gtg tgc tac ggg gag egg age gag gag gag gtg egg egg atg tac gcc gag tgg

Met Ser Glu His Arg Arg Thr Tyr Asn Ala H e Gly Glu Glu Glu Arg Arg Phe Glu Val Phe Arg
atg tec gag cac cgc agg acg tac aac gcc ate ggc gag gag gag cgc cgc ttc gag gtc ttc agg

Asp Asn Leu Arg Tyr Ile Asp Gin His Asn Ala Ala Ala Asp Ala Gly Leu His Ser Phe Arg Leu
gac aac etc cgc tac ate gag cag cac aac gcc gcc gcc gag gcc ggg etc cac tec ttc cgc etc

Gly Leu Asn Arg Phe Ala Asp Leu Thr Asn Glu Glu Tyr Arg Ser Thr Tyr Leu Gly Ala Arg Thr
ggc etc aac cgc ttc gcc gac etc acc aac gag gag tac cgc age acg tac ctg ggc gcc egg acc

Lys Pro Asp Arg Glu Arg Lys Leu Ser Ala Arg Tyr Gin Ala Asp Asp Asn Glu Glu Leu Pro Glu
aag ccg gac egg gag egg aag etc age gcc agg tac cag gcc gag gac aac gag gag ctg ccg gag

Thr Val Asp Trp Arg Lys Lys Gly Ala Val Ala Ala H e Lys Asp Gin Gly Gly Cys Gly Ser Cys
acc gtc gac tgg agg aag aag ggg gcc gtt get gcc ate aag gag cag ggc ggc tgc ggg age tgc

Trp Ala Phe Ser Ala H e Ala Ala Val Glu Gly H e Asn Gin H e Val Thr Gly Asp Met H e Pro
tgg get ttc tea gca ata gca get gtt gaa ggc ate aac cag att gtt acg ggc gac atg ate cct

Leu Ser Glu Gin Glu Leu Val Asp Cys Asp Thr Ser Tyr Asn Glu Gly Cys Asn Gly Gly Leu Met
ctg tec gag caa gag ctt gtt gac tgt gac act tea tac aac gag gga tgc aat gga ggt ctg atg

Asp Tyr Ala Phe Glu Phe H e H e Asn Asn Gly Gly H e Asp Ser Glu Glu Asp Tyr Pro Tyr Lys
gac tat gcg ttt gag ttc ate att aac aat ggc ggt ate gac tct gag gag gac tac ccc tac aag

Glu Arg Asp Asn Arg Cys Asp Ala Asn Lys Lys Asn Ala Lys Val Val Thr H e Asp Gly Tyr Glu
gag agg gac aac cgt tgc gat get aac aag aaa aat gcg aag gtt gtt acc att gat ggg tac gag

Asp Val Pro Val Asn Ser Glu Lys Ser Leu Gin Lys Ala Val Ala Asn Gin Pro H e Ser Val Ala
gat gtg ccc gtg aac agt gag aag agt ctg cag aag gca gtt gca aac cag ccc ate agt gtt gcg

Ile Glu Ala Gly Gly Arg Ala Phe Gin Leu Tyr Lys Ser Gly H e Phe Thr Gly Thr Cys Gly Thr
att gag get ggt ggc agg gca ttc cag etc tac aaa tcg ggt ate ttc act gga acc tgt gga aca

Ala Leu Asp **III** Gly Val Ala Ala Val Gly Tyr Gly Thr Glu Asn Gly Lys Asp Tyr Trp Leu Val
gca ctt gac cat ggt gtc gcc gcc gtt ggt tat ggt aca gag aac ggc aag gac tac tgg etc gtc

Arg **Asn** Ser Trp Gly Thr Val Trp Gly Glu Asp Gly Tyr H e Arg Met Glu Arg Asn H e Lys Ala
agg aac tec tgg ggt acc gtc tgg gga gag gat ggt tac ate egg atg gag cgt aac ate aag gca

Ser Ser Gly Lys Cys Gly H e Ala Val Glu Pro Ser Tyr Pro Thr Lys Thr Gly Glu Asn Pro Pro
tec agt ggc aaa tgt ggt att gcc gtt gag cct tec tac ccg acg aag acg ggc gag aac ccc cct

Asn Pro Gly Pro Thr Pro Pro Ser Pro Ala Pro Pro Ser Ser Val Cys **III mm Asn Glu mm**
aac ccc ggc cca act cca cca tct ccc gcc cca ccg tct tec gtc tgt gac age tac aac gag tgc

Pro Ala Ser Thr III Cys Cys III I I III I I III Lys III I I I I I I I I Cys Cys
ccc gcg age acg acc tgc tgc tgc ate tac gag tac ggc aag gag tgc ttc gcc tgg ggc tgt tgc

Pro Leu Glu Gly Ala Thr Cys Cys Asp Asp His Tyr Ser Cys Cys Pro His Asn Tyr Pro Ile Cys
 cca etc gag ggt get acc tgc tgc gat gat cac tac age tgc tgc cct cat aac tat ccc ate tgc
 Asn ~~U T~~ Gln ~~m m m m~~ ~~U U~~ Cys Leu Ala Ala Lys Asp Ser Pro Leu Ser Val Lys Ala Gin Arg Arg
 aac acc cag cag gga acc tgc ctt gcg gcc aag gac agt cca ctg tea gtg aag get cag agg cgt
 Thr Leu Ala Lys Pro Ile Gly Ala Phe Ser Val Ile Ala Thr Asp Gly Lys Lys Ser Ser Ala #
 acc ctg gcc aag cct ate ggt get ttc tct gtc att gca act gac ggc aag aaa agt age gcg **taa**

gga tec
BamHI

<160> SEQ ID NO:2

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His
cat atg ggc age age cat cat cat cat cat cac age age ggc ctg gtg ccg cgc ggc age cat
NdeI
 Met Ser Ile Val Ser Tyr Gly Glu Arg Ser Glu Glu Glu Val Arg Arg Met Tyr Ala Glu Trp Met
 atg tcg ate gtg tcg tac ggg gag egg age gag gag gag gtg egg egg atg tac gcc gag tgg atg
 Ser Glu His Arg Arg Thr Tyr Asn Ala Ile Gly Glu Glu Glu Arg Arg Phe Glu Val Phe Arg Asp
 tec gag cac cgc agg acg tac aac gcc ate ggc gag gag gag cgc cgc ttc gag gtc ttc agg gac
 Asn Leu Arg Tyr H e Asp Gin His Asn Ala Ala Ala Asp Ala Gly Leu His Ser Phe Arg Leu Gly
 aac etc cgc tac ate gac cag cac aac gcc gcc gcc gac gcc ggg etc cac tec ttc cgc etc ggc
 Leu Asn Arg Phe Ala Asp Leu Thr Asn Glu Glu Tyr Arg Ser Thr Tyr Leu Gly Ala Arg Thr Lys
 etc aac cgc ttc gcc gac etc acc aac gag gag tac cgc age acg tac ctg ggc gcc egg acc aag
 Pro Asp Arg Glu Arg Lys Leu Ser Ala Arg Tyr Gin Ala Asp Asp Asn Glu Glu Leu Pro Glu Thr
 ccg gac egg gag egg aag etc age gcc agg tac cag gcc gac gac aac gag gag ctg ccg gag acc
 Val Asp Trp Arg Lys Lys Gly Ala Val Ala Ala H e Lys Asp Gin Gly Gly Cys Gly Ser ~~Cys~~ Trp
 gtc gac tgg agg aag aag ggg gcc gtt get gcc ate aag gac cag ggc ggc tgc ggg age tgc tgg
 Ala Phe Ser Ala H e Ala Ala Val Glu Gly H e Asn Gin H e Val Thr Gly Asp Met H e Pro Leu
 get ttc tea gca ata gca get gtt gaa ggc ate aac cag att gtt acg ggc gac atg ate cct ctg
 Ser Glu Gin Glu Leu Val Asp Cys Asp Thr Ser Tyr Asn Glu Gly Cys Asn Gly Gly Leu Met Asp
 tec gag caa gag ctt gtt gac tgt gac act tea tac aac gag gga tgc aat gga ggt ctg atg gac
 Tyr Ala Phe Glu Phe H e H e Asn Asn Gly Gly H e Asp Ser Glu Glu Asp Tyr Pro Tyr Lys Glu
 tat gcg ttt gag ttc ate att aac aat ggc ggt ate gac tct gag gag gac tac ccc tac aag gag
 Arg Asp Asn Arg Cys Asp Ala Asn Lys Lys Asn Ala Lys Val Val Thr H e Asp Gly Tyr Glu Asp
 agg gac aac cgt tgc gat get aac aag aaa aat gcg aag gtt gtt acc att gat ggg tac gag gat
 Val Pro Val Asn Ser Glu Lys Ser Leu Gin Lys Ala Val Ala Asn Gin Pro H e Ser Val Ala H e
 gtg ccc gtg aac agt gag aag agt ctg cag aag gca gtt gca aac cag ccc ate agt gtt gcg att
 Glu Ala Gly Gly Arg Ala Phe Gin Leu Tyr Lys Ser Gly H e Phe Thr Gly Thr Cys Gly Thr Ala
 gag get ggt ggc agg gca ttc cag etc tac aaa tcg ggt ate ttc act gga acc tgt gga **aca** gca
 Leu Asp ~~U U~~ Gly Val Ala Ala Val Gly Tyr Gly Thr Glu Asn Gly Lys Asp Tyr Trp Leu Val Arg
 ctt gac cat ggt gtc gcc gcc gtt ggt tat ggt **aca** gag aac ggc aag gac tac tgg etc gtc agg
~~Asn~~ Ser Trp Gly Thr Val Trp Gly Glu Asp Gly Tyr H e Arg Met Glu Arg Asn H e Lys Ala Ser
 aac tec tgg ggt acc gtc tgg gga gag gat ggt tac ate egg atg gag cgt aac ate aag gca tec
 Ser Gly Lys Cys Gly H e Ala Val Glu Pro Ser Tyr Pro Thr Lys Thr Gly #
 agt ggc aaa tgt ggt att gcc gtt gag cct tec tac ccg acg aag acg ggc taa etc gag
XhoI

<160> SEQ ID NO:3

Met Ala Asp
cc atg gcg dac
NcoI

Met Ser Ile Val Ser Tyr Gly Glu Arg Ser Glu Glu Glu Val Arg Arg Met Tyr Ala Glu Trp Met
atg teg ate gtg tcg tac ggg gag egg age gag gag gag gtg egg egg atg tac gcc gag tgg atg

Ser Glu His Arg Arg Thr Tyr Asn Ala Ile Gly Glu Glu Glu Arg Arg Phe Glu Val Phe Arg Asp
tec gag cac cgc agg acg tac aac gcc ate ggc gag gag gag cgc cgc ttc gag gtc ttc agg gac

Asn Leu Arg Tyr Ile Asp Gin His Asn Ala Ala Ala Asp Ala Gly Leu His Ser Phe Arg Leu Gly
aac etc cgc tac ate gac cag cac aac gcc gcc gcc gag gcc ggg etc cac tec ttc cgc etc ggc

Leu Asn Arg Phe Ala Asp Leu Thr Asn Glu Glu Tyr Arg Ser Thr Tyr Leu Gly Ala Arg Thr Lys
etc aac cgc ttc gcc gac etc acc aac gag gag tac cgc age acg tac ctg ggc gcc egg acc aag

Pro Asp Arg Glu Arg Lys Leu Ser Ala Arg Tyr Gin Ala Asp Asp Asn Glu Glu Leu Pro Glu Thr
ccg gac egg gag egg aag etc age gcc agg tac cag gcc gag gcc aac gag gag ctg ccg gag acc

Val Asp Trp Arg Lys Lys Gly Ala Val Ala Ala H e Lys Asp Gin Gly Gly Cys Gly Ser ~~W~~ Trp
gtc gac tgg agg aag aag ggg gcc gtt get gcc ate aag gag cag ggc ggc tgc ggg age tgc tgg

Ala Phe Ser Ala Ile Ala Ala Val Glu Gly H e Asn Gin H e Val Thr Gly Asp Met H e Pro Leu
get ttc tea gca ata gca get gtt gaa ggc ate aac cag att gtt acg ggc gac atg ate cct ctg

Ser Glu Gin Glu Leu Val Asp Cys Asp Thr Ser Tyr Asn Glu Gly Cys Asn Gly Gly Leu Met Asp
tec gag caa gag ctt gtt gac tgt gac act tea tac aac gag gga tgc aat gga ggt ctg atg gac

Tyr Ala Phe Glu Phe lie lie Asn Asn Gly Gly lie Asp Ser Glu Glu Asp Tyr Pro Tyr Lys Glu
tat cgc ttt gag ttc ate att aac aat ggc ggt ate gac tct gag gag gac tac ccc tac aag gag

Arg Asp Asn Arg Cys Asp Ala Asn Lys Lys Asn Ala Lys Val Val Thr H e Asp Gly Tyr Glu Asp
agg gac aac cgt tgc gat get aac aag aaa aat gcg aag gtt gtt acc att gat ggg tac gag gat

Val Pro Val Asn Ser Glu Lys Ser Leu Gin Lys Ala Val Ala Asn Gin Pro H e Ser Val Ala H e
gtg ccc gtg aac agt gag aag agt ctg cag aag gca gtt gca aac cag ccc ate agt gtt gcg att

Glu Ala Gly Gly Arg Ala Phe Gin Leu Tyr Lys Ser Gly H e Phe Thr Gly Thr Cys Gly Thr Ala
gag get ggt ggc agg gca ttc cag etc tac aaa tcg ggt ate ttc act gga acc tgt gga **aca** gca

Leu Asp ~~His~~ Gly Val Ala Ala Val Gly Tyr Gly Thr Glu Asn Gly Lys Asp Tyr Trp Leu Val Arg
ctt gac cat ggt gtc gcc gcc gtt ggt tat ggt **aca** gag aac ggc aag gac tac tgg etc gtc agg

~~Asn~~ Ser Trp Gly Thr Val Trp Gly Glu Asp Gly Tyr H e Arg Met Glu Arg Asn H e Lys Ala Ser
aac tec tgg ggt acc gtc tgg gga gag gat ggt tac ate egg atg gag cgt aac ate aag gca tec

Ser Gly Lys Cys Gly H e Ala Val Glu Pro Ser Tyr Pro Thr Lys Thr Gly Leu Glu His His His
agt ggc aaa tgt ggt att gcc gtt gag cct tec tac ccg acg aag acg ggc etc **gag cac cac cac**

His His His #
cac cac cac tga etc gag
xhoI

<160> SEQ ID NO:4

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn
atg aga **mm** cct tca att **mm mm** tcaai gtt **mm** ttc gca gca tcc tcc gca **mm** gct gct cca gtc aac

Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gin Ile Pro Ala Glu Ala Val H e Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly
act aca aca gaa gat gaa acg gca caa att ccg gct gaa gct gtc atc ggt tac tea gat tta gaa **mm**

Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe H e Asn Thr Thr
gat ttc gai gti gct gii **mm** cca xti tcc aac agc aca aai aae Tgg ttc **mm** ttt ate aai aci aci

lie Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu Glu Lys Arg^Slu Ala Glu Ala Tyr Val Glu
att gcc agc ~~wti~~ **mm** gti aae gaa gaa **mm** gla tci ctc **mm** aae aga **m m mm** gaa gti tac gta **gaa**
ECORI

Phe Ser H e Val Ser Tyr Gly Glu Arg Ser Glu Glu Glu Val Arg Arg Met Tyr Ala Glu Trp Met Ser
tte tec ate gtg tcg tac ggg gag egg age gag gag gag gtg egg egg atg tac gcc gag tgg atg tec
ECORI

Glu His Arg Arg Thr Tyr Asn Ala H e Gly Glu Glu Glu Arg Arg Phe Glu Val Phe Arg Asp Asn Leu
gag cac cgc agg acg tac aac gcc ate ggc gag gag gag cgc cgc ttc gag gtc ttc agg gac aac etc

Arg Tyr Ile Asp Gin His Asn Ala Ala Ala Asp Ala Gly Leu His Ser Phe Arg Leu Gly Leu Asn Arg
cgc tac ate gac cag cac aac gcc gcc gcc gac gcc ggg etc cac tec ttc cgc etc ggc etc aac cgc

Phe Ala Asp Leu Thr Asn Glu Glu Tyr Arg Ser Thr Tyr Leu Gly Ala Arg Thr Lys Pro Asp Arg Glu
ttc gcc gac etc ace aac gag gag tac cgc age acg tac ctg ggc gcc egg ace aag ccg gac egg gag

Arg Lys Leu Ser Ala Arg Tyr Gin Ala Asp Asp Asn Glu Glu Leu Pro Glu Thr Val Asp Trp Arg Lys
egg aag etc age gcc agg tac cag gcc gac gac aac gag gag ctg ccg gag acc gtc gac tgg agg aag

Lys Gly Ala Val Ala Ala Ile Lys Asp Gin Gly Gly Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Ala H e Ala
aag ggg gcc gtt get gcc ate aag gac cag ggc ggc tgc ggg age tgc tgg get ttc tea gca ata gca

Ala Val Glu Gly H e Asn Gin H e Val Thr Gly Asp Met H e Pro Leu Ser Glu Gin Glu Leu Val Asp
get gtt gaa ggc ate aac cag att gtt acg ggc gac atg ate cct ctg tec gag caa gag ctt gtt gac

Cys Asp Thr Ser Tyr Asn Glu Gly Cys Asn Gly Gly Leu Met Asp Tyr Ala Phe Glu Phe H e H e Asn
tgt gac act tea tac aac gag gga tgc aat gga ggt ctg atg gac tat gcg ttt gag ttc ate att aac

Asn Gly Gly H e Asp Ser Glu Glu Asp Tyr Pro Tyr Lys Glu Arg Asp Asn Arg Cys Asp Ala Asn Lys
aat ggc ggt ate gac tct gag gag gac tac ccc tac aag gag agg gac aac cgt tgc gat get aac aag

Lys Asn Ala Lys Val Val Thr H e Asp Gly Tyr Glu Asp Val Pro Val Asn Ser Glu Lys Ser Leu Gin
aaa aat gcg aag gtt gtt acc att gat ggg tac gag gat gtg ccc gtg aac agt gag aag agt ctg cag

Lys Ala Val Ala Asn Gin Pro H e Ser Val Ala H e Glu Ala Gly Gly Arg Ala Phe Gin Leu Tyr Lys
aag gca gtt gca aac cag ccc ate agt gtt gcg att gag get ggt ggc agg gca ttc cag etc tac aaa

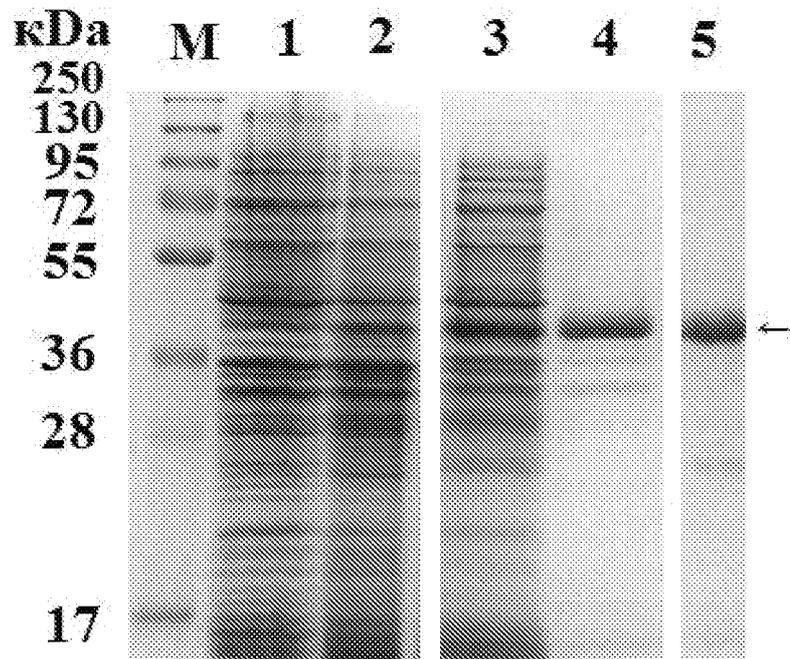
Ser Gly H e Phe Thr Gly Thr Cys Gly Thr Ala Leu Asp His Gly Val Ala Ala Val Gly Tyr Gly Thr
tcg ggt ate ttc act gga acc tgt gga **aca** gca ctt gac cat ggt gtc gcc gcc gtt ggt tat ggt **aca**

Glu Asn Gly Lys Asp Tyr Trp Leu Val Arg Asn Ser Trp Gly Thr Val Trp Gly Glu Asp Gly Tyr H e
gag aac ggc aag gac tac tgg etc gtc agg aac tec tgg ggt acc gtc tgg gga gag gat ggt tac ate

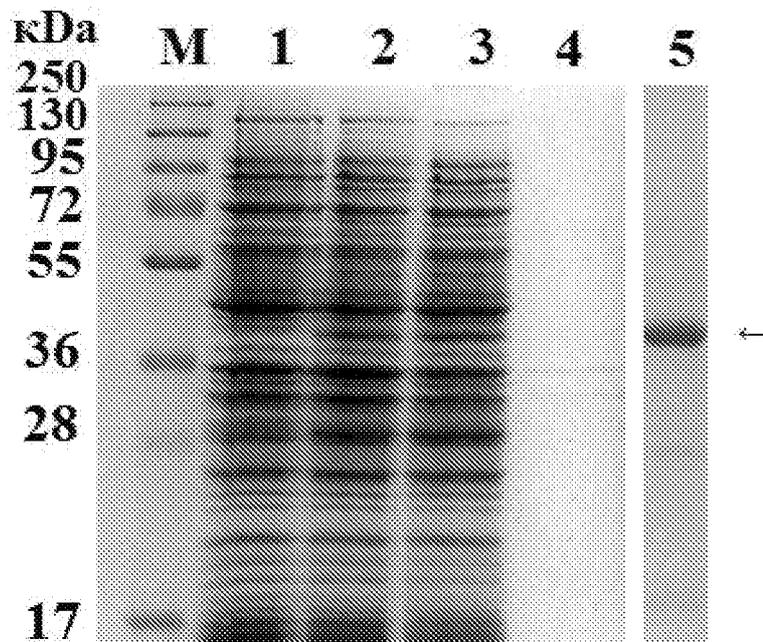
Arg Met Glu Arg Asn H e Lys Ala Ser Ser Gly Lys Cys Gly H e Ala Val Glu Pro Ser Tyr Pro Thr
egg atg gag cgt aac ate aag gca tec agt ggc aaa tgt ggt att gcc gtt gag cct tec tac ccg acg

Lys Thr Gly #
aag acg ggc **taa gcggccgc**
Not1

1/3



Фиг. 1



Фиг. 2

2/3

кДа

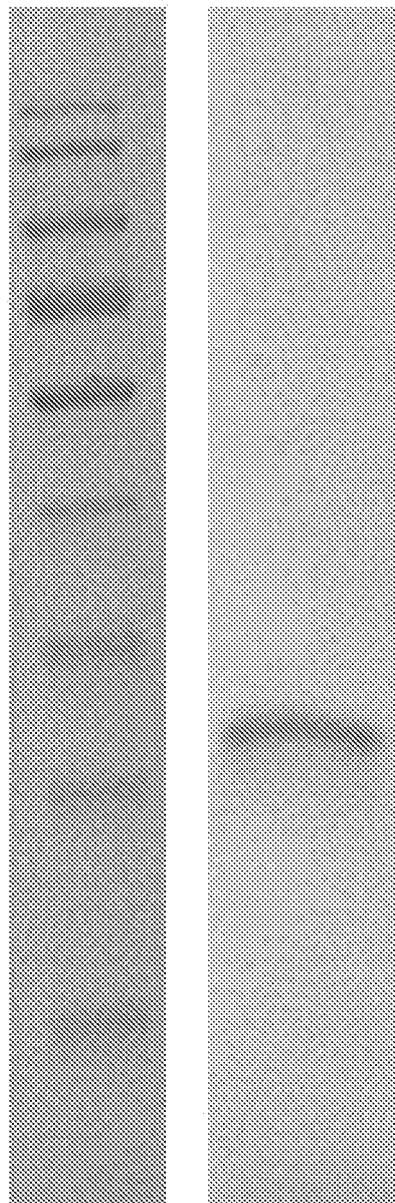
55

43

34

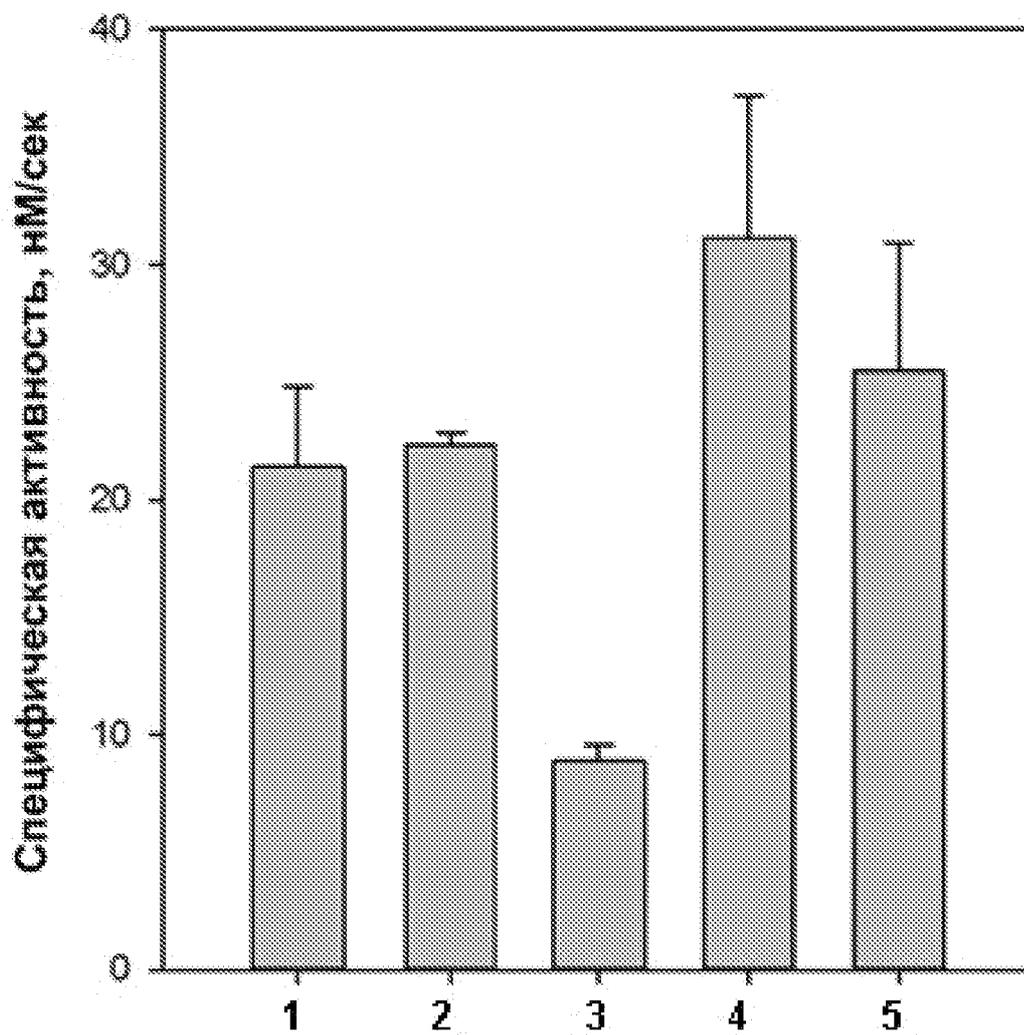
26

17



Фиг. 3

3/3



Фиг. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2018/050071

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER see the supplemental sheet According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C 12N9/50, C12N1 5/57, C 12N1 5/63, C 12N1 5/70, C 12N1 5/81 , C12R1/19, C 12R1/84 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) E-LIBRARY, EAPATIS, ESPACENET, RUPTO, USPTO, WIPO, PATSEARCH, Google, PubMed, NCBI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RU 2603054 C2 (PERVYI MGMU IMENI I.M. SECHENOVA) 20.1 1.2016, abstract, examples 1-4, pclaim1 ,3, SEQ ID NO:	1-9
A	SAVVATEEVA L.V., et al., Glutenase and collagenase activities of wheat cysteine protease Triticain-a: feasibility for enzymatic therapy assays, The international journal of biochemistry & cell biology, 2015, Vol.62, pp.1 15-1 24, abstract, pp.1 16, 117, Fig. 1	1-9
A	VORA H. et al., A scaleable manufacturing process for pro- EP-B2, a cysteine protease from barley indicated for celiac sprue, Biotechnology and bioengineering, 2007, Vol.98, No. 1, pp.1 77-1 85, abstract	1-9
II Further documents are listed in the continuation of Box C. D See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 November 2018 (13.1 1.2018)		Date of mailing of the international search report 29 November 2018 (29.1 1.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/50 (2006.01)
C12N 15/57 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)
C12R 1/84 (2006.01)

<p>A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (см. дополнительный лист)</p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>																									
<p>B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p style="text-align: center;">C12N9/50, C12N15/57, C12N15/63, C12N15/70, C12N15/8 1, C12R1/19, C12R1/84</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p> <p style="text-align: center;">E-LIBRARY, EAPATIS, ESPACENET, RUPTO, USPTO, WIPO, PATSEARCH, Google, PubMed, NCBI</p>																									
<p>C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ :</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Категория *</th> <th>Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th>Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>RU 2603054 C2 (ПЕРВЫЙ МГМУ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА) 20.11.2016, реферат, примеры 1-4, пп.1,3 формулы, SEQ ID NO:2</td> <td style="text-align: center;">1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>SAVVATEEVA L.V., et al., Glutenase and collagenase activities of wheat cysteine protease Triticain-α: feasibility for enzymatic therapy assays, The international journal of biochemistry & cell biology, 2015, Vol.62, pp.115-124, abstract, pp. 116, 117, Fig.1</td> <td style="text-align: center;">1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>VORA H. et al., A scaleable manufacturing process for pro- EP-B2, a cysteine protease from barley indicated for celiac sprue, Biotechnology and bioengineering, 2007, Vol.98, No.1, pp.177-185, abstract</td> <td style="text-align: center;">1-9</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы C. <input checked="" type="checkbox"/> данные о патентах -аналогах указаны в приложении</p> <table border="1"> <tr> <td>* Особые категории ссылочных документов :</td> <td>"T" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</td> </tr> <tr> <td>"A" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</td> <td>"X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</td> </tr> <tr> <td>"E" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</td> <td>"Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</td> </tr> <tr> <td>"L" документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</td> <td>"&" документ, являющийся патентом -аналогом</td> </tr> <tr> <td>"O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</td> <td></td> </tr> </table>		Категория *	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	A	RU 2603054 C2 (ПЕРВЫЙ МГМУ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА) 20.11.2016, реферат, примеры 1-4, пп.1,3 формулы, SEQ ID NO:2	1-9	A	SAVVATEEVA L.V., et al., Glutenase and collagenase activities of wheat cysteine protease Triticain-α: feasibility for enzymatic therapy assays, The international journal of biochemistry & cell biology, 2015, Vol.62, pp.115-124, abstract, pp. 116, 117, Fig.1	1-9	A	VORA H. et al., A scaleable manufacturing process for pro- EP-B2, a cysteine protease from barley indicated for celiac sprue, Biotechnology and bioengineering, 2007, Vol.98, No.1, pp.177-185, abstract	1-9	* Особые категории ссылочных документов :	"T" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение	"A" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	"X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности	"E" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	"Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста	"L" документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	"&" документ, являющийся патентом -аналогом	"O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.		"P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета	
Категория *	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №																							
A	RU 2603054 C2 (ПЕРВЫЙ МГМУ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА) 20.11.2016, реферат, примеры 1-4, пп.1,3 формулы, SEQ ID NO:2	1-9																							
A	SAVVATEEVA L.V., et al., Glutenase and collagenase activities of wheat cysteine protease Triticain-α: feasibility for enzymatic therapy assays, The international journal of biochemistry & cell biology, 2015, Vol.62, pp.115-124, abstract, pp. 116, 117, Fig.1	1-9																							
A	VORA H. et al., A scaleable manufacturing process for pro- EP-B2, a cysteine protease from barley indicated for celiac sprue, Biotechnology and bioengineering, 2007, Vol.98, No.1, pp.177-185, abstract	1-9																							
* Особые категории ссылочных документов :	"T" более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение																								
"A" документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным	"X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности																								
"E" более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее	"Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста																								
"L" документ, подвергающий сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)	"&" документ, являющийся патентом -аналогом																								
"O" документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.																									
"P" документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета																									
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p style="text-align: center;">13 ноября 2018 (13. 11.2018)</p>	<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p style="text-align: center;">29 ноября 2018 (29. 11.2018)</p>																								
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., 30-1, Москва, Г-59, ГСП -3, Россия, 125993 Факс : (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37</p>	<p>Уполномоченное лицо :</p> <p style="text-align: center;">Исмагулова Т.Т.</p> <p>Телефон № (499) 240-25-91</p>																								

C12N 9/50 (2006.01)
C12N 15/57 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
СПЯ 1/19 (2006.01)
C12R 1/84 (2006.01)