

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038578**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.17

(21) Номер заявки
202000021

(22) Дата подачи заявки
2018.06.28

(51) Int. Cl. **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 1/84 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)

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

(31) **2017122806**

(32) **2017.06.28**

(33) **RU**

(43) **2020.04.30**

(86) **PCT/RU2018/050071**

(87) **WO 2019/004878 2019.01.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ
МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА
МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)
(RU)**

(72) Изобретатель:

**Замятнин Андрей Александрович,
Зерний Евгений Юрьевич, Гороховец
Неонила Васильевна, Кузнецова
Наталья Викторовна, Макаров
Владимир Алексеевич, Савватеева
Людмила Владимировна, Тарасов
Вадим Владимирович (RU)**

(74) Представитель:

Куприянова О.И. (RU)

(56) **RU-C2-2603054**

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

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

(57) 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 препаратов белка тритикаина-альфа, состоящих из фрагмента тритикаина-альфа пшеницы, и способам их получения. Изобретение может быть использовано в исследовательских целях для изучения функционирования папаинподобных 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 gami B (DE3) и клеток *P.pastoris* штамма GS115 плазмидными ДНК pET15-6HIS-Triticain- α -GM, pET15-Triticain- α -GM-6HIS и pPIC9-Triticain- α -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.

B1**038578****038578****B1**

Область техники

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 использовано в исследовательских целях для изучения функционирования папаинподобных цистеиновых протеиназ, а также в медицине для разработки ферментных терапевтических препаратов.

Уровень техники

Тритикаины (triticain- α , - β , - γ) - высококонсервативные папаин-подобные цистеиновые эндопротеазы пшеницы, состоящие из сигнального (лидерного) пептида, удаляющегося при активации пропептидного домена, гранулин-подобного домена [GenBank AB267407] 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 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 стадийноспецифическом расщеплении и посттрансляционных модификациях запасящихся белков [А. Capocchi, М. Cinollo, L. Galleschi, et al. J Agric Food Chem, 2000, 48, 6271-79, Т. Okamoto, Т. Shimada, I. Hara-Nishimura, et al. Plant Physiol, 2003, 132, 1892-1900]. Среди папаинподобных цистеиновых протеиназ растений наиболее широко изучены ферменты риса и ячменя - оризаины (oryzain- α , - β , - γ) и эндопептидазы ЕРВ (barley cysteine proteinase B-1, -2) [А. Mikkonen, I Porali, М. Cercos, et al. Plant Mol Biol, 1996, 31(2), 239-54, Н. Kondo, К. Abe, I. Nishimura, et 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 папаинподобных 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 глютеинов) 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 (глютенная энтеропатия) представляет собой комплексное воспалительное заболевание человека, которое развивается при наличии соответствующей генетической предрасположенности в ответ на обогащенные 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 ЕР-В2 (proEP-B2) в *E.coli*. [Н. Vora, J. McIntire, P. Kumar, et al. Biotechnol Bioeng, 2007, 1, 98(1), 177-85, заявка WO 2008115428 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 С2, 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 про-

цессе 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 полнозернового 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) 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, 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 папаинподобных цистеиновых протеиназ, рекомбинантной экспрессией в бактериальной системе, заключающимся в том, что проводят культивирование клеток *E.coli* штамма Rosetta gami B (DE3), трансформированных плазмидами pET15-6HIS-Triticain- α -GM или pET15-Triticain- α -GM-6HIS, содержащими последовательности ДНК, кодирующие белки с SEQ ID NO:2-3 соответственно, в среде LB с добавлением 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 мМ 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 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, полученную после центрифугирования лизатов соответствующую 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 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 pET15b.

Поставленная задача также решается способом получения биологически активного белкового препарата, обладающим высокой специфической активностью папаинподобных цистеиновых протеиназ, рекомбинантной экспрессией в дрожжевой системе, заключающийся в том, что проводят культивирование клеток *P.pastoris* штамма GS115 (His⁻, Mut⁺/Mut^S), трансформированных плазмидой pPIC9-Triticain- α -GM, содержащей последовательность ДНК, кодирующей белок с SEQ ID NO:4 в среде YPD при 30°C в шейкер-инкубаторе до достижения оптической плотности A_{600} 1.5, клеточные суспензии растирают на чашке Петри с минимальной безгистидиновой агаризованной средой и инокулируют при 30°C до появления колоний, затем одной колонией полученных трансформантов *Pichia pastoris* GS115/pPIC9-Triticain- α -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), 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 супернатанты; далее надосадочную культуральную жидкость *Pichia pastoris* GS115/pPIC9-Triticain- α -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 мМ NaCl, далее собирают белковые

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 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- α -GM до индукции (дорожка 1), лизатов клеток штамма-продуцента *E.coli* Rosetta gami B(DE3)/pET15-6HIS-Triticain- α -GM после индукции 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- α -GM, дорожка 5) после хроматографического выделения; M - 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- α -GM-6HIS до индукции (дорожка 1), лизатов клеток штамма-продуцента *E.coli* Rosetta gami B(DE3)/Triticain- α -GM-6HIS после индукции изопропилтио- β -D-галактозидом (дорожка 2); растворимая клеточная фракция (дорожка 3), нерастворимая клеточная фракция (дорожка 4); рекомбинантный усеченный тритикаин-альфа (SEQ ID NO:3, Triticain- α -GM-6HIS, дорожка 5) после хроматографического выделения; M - белковые маркеры молекулярной массы (кДа).

На фиг. 3 рекомбинантный усеченный тритикаин-альфа (SEQ ID NO:4, γ -Triticain- α -GM, экспрессированный в клетках *P.pastoris*) после хроматографического выделения в 14% полиакриламидном геле в присутствии SDS (M - белковые маркеры молекулярной массы, кДа); (M-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 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- α -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 последовательностью (SEQ ID NO:3, Triticain- α -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- α -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- α -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- α -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 AB267407), синтезируют комплементарную ДНК (кДНК) с

из *E.coli*.

Очистку целевых белков 6HIS-Triticain- α -GM (SEQ ID NO:2) и Triticain- α -GM-6HIS (SEQ ID NO:3) проводят методом аффинной (металл-хелатной) хроматографии. Получение рекомбинантного 6HIS-Triticain- α -GM и Triticain- α -GM-6HIS из клеток штаммов-продуцентов Rosetta gami B (DE3)/pET15-6HIS-Triticain- α -GM и Rosetta gami B (DE3)/pET15-Triticain- α -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 (12 \times 5 с) при 4 $^{\circ}$ C. Полученную после центрифугирования лизата (10000 \times g, 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C в течение 24 ч, трижды производя замену буфера на свежий. Концентрацию целевого белка определяют с помощью ВСА-реактанта (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- α -GM и не менее 5 мг с 1 л - для Rosetta gami B (DE3)/pET15-Triticain- α -GM-6HIS. Чистота полученных препаратов по данным электрофоретического анализа составляет не менее 85% (фиг. 1, 2; следует отметить, что целевые белки 6HIS-Triticain- α -GM (SEQ ID NO:2) и Triticain- α -GM-6HIS (SEQ ID NO:3), проявляющие протеолитическую активность, подвергаются автопротеолизу в процессе выделения).

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

Для трансформации клеток *Pichia pastoris* дрожжевой экспрессионной плазмидой pPIC9-Triticain- α -GM был использован ауксотрофный по гистидину штамм *Pichia pastoris* GS115 (His⁻, Mut⁺). Плазмиду pPIC9-Triticain- α -GM линеаризуют по сайту BglIII. Трансформацию клеток *Pichia pastoris* проводят методом электропорации. Клетки штамма GS115 высевают на чашку с агаризованной средой YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% глюкоза) и инкубируют при 30 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C в шейкер-инкубаторе при 300 об/мин. Далее 200 мл свежей среды YPD засевают 0.2 мл ночной культуры и снова наращивают клетки в течение ночи при 30 $^{\circ}$ C в шейкер-инкубаторе до достижения оптической плотности клеточной суспензии A₆₀₀ 1.5. Клетки осаждают центрифугированием (1500 \times g, 5 мин, 4 $^{\circ}$ C), осадок дважды промывают 200 мл и 100 мл охлажденной во льду стерильной воды соответственно, после чего клетки снова осаждают и ресуспендируют в 8 мл холодного 1 М сорбита. Затем клетки снова осаждают и ресуспендируют 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 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- α -GM, растирают на чашке Петри с минимальной безгистидиновой агаризованной средой. Для 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 $^{\circ}$ 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 (MM и MD соответственно), подразумевая, что дрожжевые клетки фенотипа Mut^S делятся в MM среде медленнее, чем в MD среде (что визуально определяется сравнением размеров колоний на MM и MD чашках через 2-3 суток инкубации при 30 $^{\circ}$ C). Точную принадлежность дрожжевых трансформантов к Mut⁺ или Mut^S фенотипу подтверждают методом полимеразной цепной реакции. Для этого из выбранных клонов с MM и MD чашек выделяют ДНК и анализируют методом ПЦР с использованием прямого 5'AOX1 (gactgttccaattgacaagc) и обратного 3'AOX1 (gcaaatggcattctgacatcc) праймеров при условиях амплификации: 95 $^{\circ}$ C 3 мин, денатурация 95 $^{\circ}$ C 30 с, 30 циклов, отжиг 54 $^{\circ}$ C 30 с, элонгация 72 $^{\circ}$ C 2 мин, затем 72 $^{\circ}$ 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- α -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 линейализованную по сайту рестрикции SalI плазмиду pPIC9K-Triticain- α -GM трансформировали в полученные ранее клетки *Pichia pastoris* GS115/pPIC9-Triticain- α -GM (Mut⁺ и Mut^S). Отбор двойных трансформантов проводили на генетицинсодержащей среде (0,15 мг/мл).

Для исследования способности трансформантов *P. pastoris* Mut⁺ и Mut^S фенотипов секретировать γ -Triticain- α -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 A₆₀₀ 1 о.е. (для Mut⁺) и A₆₀₀ 5 о.е. (для Mut^S). Для АOX-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 (4000×g, 5 мин, 4°C). Супернатанты отбирают, замораживают в жидком азоте и хранят при -70°C до последующего анализа. Наличие рекомбинантного γ -Triticain- α -GM в супернатантах клеточной культуры *P. pastoris* определяют методом электрофореза в 14% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия.

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

Надосадочную культуральную жидкость *Pichia pastoris* GS115/pPIC9-Triticain- α -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 ВСА-реагента (бицинониновой кислоты), аликвотируют по стеклянным флаконам, замораживают и лиофилизируют.

Выход полученного таким способом рекомбинантного γ -Triticain- α -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- α -GM (SEQ ID NO:4) в процессе секреции подвергается автопротеолизу).

Пример 7. Определение протеолитической активности вариантов рекомбинантных белков усеченного тритикаина-альфа (6HIS-Triticain- α -GM, Triticain- α -GM-6HIS и γ -Triticain- α -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 AMK. Последовательность и структура выбранного пептида PLVQ (пролин-лейцин-валин-глутамин), представляющего собой фрагмент глютена, являются оптимальными для связывания и гидролиза тритикаином-альфа [заявка WO 2008115428 A2, 25.09.2008].

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

Активность белковых препаратов усеченного тритикаина-альфа, полученного в растворимой форме 6HIS-Triticain- α -GM (SEQ ID NO:2) и Triticain- α -GM-6HIS (SEQ ID NO:3) значительно превысила активность препарата усеченного тритикаина-альфа 6HIS-Triticain- α -GM, полученного в нерастворимой форме, а также папаина, что является существенным преимуществом препаратов, полученных нами в рамках данной заявки. Активность препарата усеченного тритикаина-альфа γ -Triticain- α -GM (SEQ ID NO:4), полученного в дрожжевой экспрессионной системе, оказалась ниже, чем активность препарата усеченного тритикаина-альфа 6HIS-Triticain- α -GM, полученного в нерастворимой форме, и папаина, однако при-

нимая во внимание высокое содержание в препарате и высокий выход при экспрессии белка γ -Triticain- α -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 папаинподобных 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 впоследствии послужит основой для создания ферментных лекарственных средств в терапии некоторых заболеваний (в частности, целиакии).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

2. Способ получения биологически активного белкового препарата по п.1, обладающего специфической активностью папаинподобных цистеиновых протеиназ, характеризующийся тем, что включает трансформацию клеток плазмидами, содержащими ДНК, кодирующую белок с аминокислотной 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 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 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 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 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 A_{600} 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* GS115/pPIC9-Triticain- α -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 папаинподобных цистеиновых протеиназ, по п.1, характеризующаяся тем, что предназначена для использования в способе по п.2.

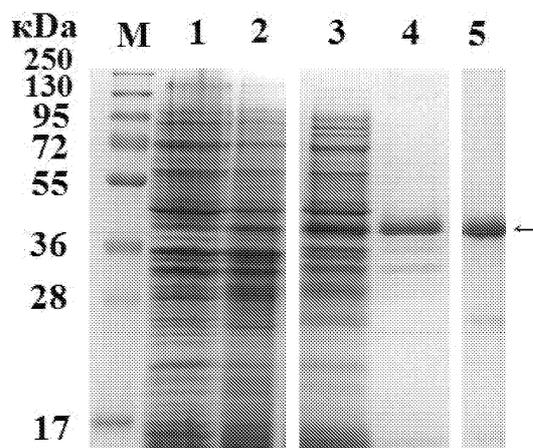
6. Вектор экспрессии, характеризующийся тем, что содержит нуклеиновую кислоту по п.5 для ис-

пользования в способе по п.2.

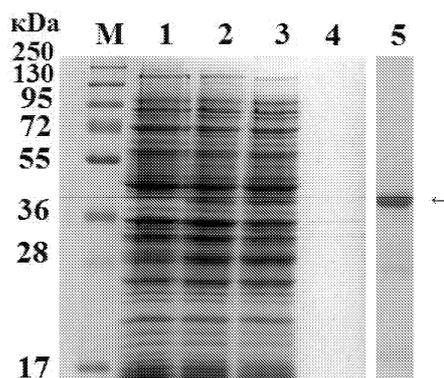
7. Вектор экспрессии по п.6, характеризующийся тем, что представляет собой вектор на основе рЕТ15b или рPIC9.

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.

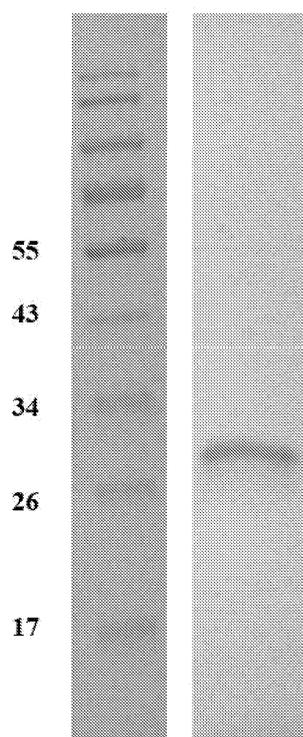


Фиг. 1

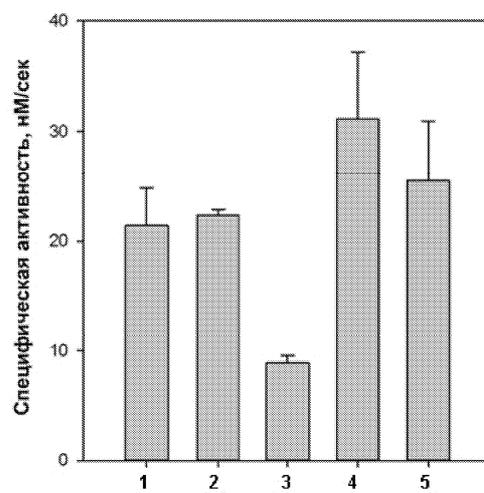


Фиг. 2

кДа



Фиг. 3



Фиг. 4