

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202193314 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.21(22) Дата подачи заявки
2020.07.08(51) Int. Cl. C12N 9/52 (2006.01)
C12N 15/76 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
A23L 29/00 (2016.01)
A61K 38/48 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНОЙ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ РЕКОМБИНАНТНУЮ ЭНДОПЕПТИДАЗУ

(31) 102019000012942; 62/878,369

(32) 2019.07.25

(33) IT; US

(86) PCT/EP2020/069297

(87) WO 2021/013553 2021.01.28

(71) Заявитель:
HEMISIS LIMITED (IE)

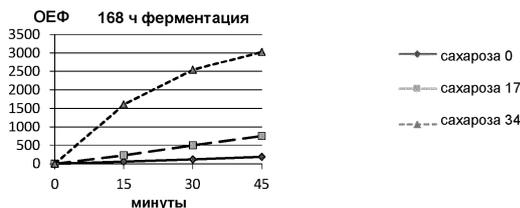
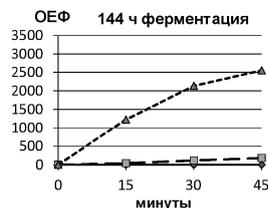
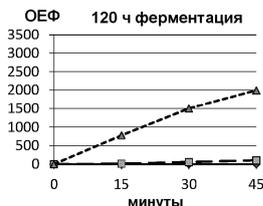
(72) Изобретатель:

Таравелла Анна, Каренци Джакомо,
Сигурта Алессандро, Кавалетти
Линда (IT)

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу изготовления ферментного препарата, содержащего по меньшей мере одну рекомбинантную эндопептидазу Actinoallomurus с глютеназной активностью, с высокими выходами и пригодного для применения у человека. Настоящее изобретение также относится к рекомбинантному вектору экспрессии для экспрессии представляющей интерес рекомбинантной эндопептидазы (эндопептидаз) и к клетке-хозяину *S. lividans*, содержащей указанный вектор. Более того, настоящее изобретение относится к ферментному препарату, полученному с помощью указанного способа, к составам указанного ферментного препарата и вариантам его клинического применения.



A1

202193314

202193314

A1

семейству серин-карбоксипептидаз S53 с каталитической триадой, образованной аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой и серином в положениях 156, 160 и 329, соответственно. N-концевой сигнальный пептид был идентифицирован путем анализа с помощью сервера *signalP 4.1* между положениями 27 и 28, и было предсказано, что зрелая форма начиналась с положения 74, что привело к зрелому ферменту массой 32,5 кДа, как и ожидалось. Зрелая форма нативной E40 представляет собой полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1.

Существует большой интерес к разработке эффективных и недорогих способов изготовления указанных эндопептидаз *Actinoallomurus*, обладающих глутеназной активностью, в частности, E40, имеющей последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1.

В дальнейшем E40 используется для определения эндопептидазы, имеющей последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1, т.е. эндопептидазы, имеющей последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 1, или ее производного, имеющего последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1; типичное производное E40 представляет собой меченую E40, такую как эндопептидаза, имеющая последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2.

Технология рекомбинантной ДНК (рДНК) обеспечивает в значительной степени эффективный набор технических платформ для контролируемого и масштабируемого получения представляющих интерес полипептидов с помощью относительно недорогих процедур. В настоящее время рекомбинантные белки получают в клетках *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, в клетках насекомых, хомяков и млекопитающих. Однако существует потребность в улучшении получения больших количеств рекомбинантных белков; кроме того, существуют очень строгие требования, которые необходимо соблюдать при получении белков для применения у человека, например, для применения в качестве пищевых добавок и/или в качестве лекарственных средств для предотвращения и/или лечения заболеваний человека.

Таким образом, настоящее изобретение направлено на обеспечение улучшенного способа эффективного и недорогого изготовления ферментного препарата, который содержит по меньшей мере одну из эндопептидаз *Actinoallomurus*, раскрытых в WO2013083338, в качестве рекомбинантных белков, причем необязательно помимо того, что указанный ферментный препарат имеет подходящий состав, он также подходит для применения у человека.

Стрептомицеты считаются безопасным источником белков для применения в пищевом тракте человека. Два примера пищевых ферментов, полученных из *Streptomyces*

spp, представляют собой: изомеразы глюкозы, используемые для получения фруктозного сиропа¹², и широко используемую трансглутаминазу из *S. mobaraensis*, используемую в пищевой промышленности благодаря своим свойствам улучшать текстуру и общее качество готовых пищевых продуктов, таких как переработанные мясные и рыбные продукты, а также молочные продукты и выпечка¹³.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что *Streptomyces lividans* является особенно предпочтительной клеткой-хозяином для применения в улучшенном способе согласно настоящему изобретению.

Таким образом, согласно настоящему изобретению предложен способ получения ферментного препарата, который содержит по меньшей мере одну рекомбинантную эндопептидазу *Actinoallomurus* с глютеназной активностью, в клетках-хозяевах *S. lividans*, причем указанный способ характеризуется фазой культивирования указанных клеток-хозяев, экспрессирующих представляющую интерес рекомбинантную эндопептидазу(ы) *Actinoallomurus*, в условиях ферментации с последующей фазой выделения супернатанта культуральной среды клетки-хозяина, содержащего полученную рекомбинантную эндопептидазу(ы); предпочтительно за указанной фазой выделения следует фаза очистки из указанного супернатанта готового ферментного препарата, содержащего рекомбинантную эндопептидазу(ы) *Actinoallomurus* с глютеназной активностью, представляющей интерес.

Известно, что клетки *S. lividans* являются эффективными клетками-хозяевами для получения рекомбинантных белков, поскольку рекомбинантные белки, экспрессируемые указанными клетками, могут быть непосредственно секретированы и высвобождены в культуральную среду. Однако разные белки получают в *S. lividans* с очень разными выходами и этот результат непредсказуем¹². Более того, клетки *S. lividans* продуцируют высокие уровни вторичных метаболитов, в частности, антибиотиков¹², что ставит под угрозу возможность установления *S. lividans* в качестве подходящей клеточной фабрики для изготовления ферментных препаратов, предназначенных для дополнения физиологических пищеварительных ферментов.

Способ согласно настоящему изобретению обеспечивает ферментный препарат, который содержит большие количества целевой рекомбинантной глютеназы. Неожиданно, несмотря на культивирование клеток-хозяев в условиях ферментации, ферментный препарат, полученный с помощью способа согласно настоящему изобретению, по существу не содержит потенциальных вредных вторичных метаболитов, высвобождаемых из *S. lividans*, таких как, например, антибиотики, которые были бы нормативно неприемлемыми для потребления человеком в составе пищевого продукта, пищевых

добавок или фармацевтических составов; ферментный препарат, полученный с помощью способа согласно настоящему изобретению, пригоден для применения у человека (необязательно в дополнение к надлежащему составу указанного препарата).

Краткое описание изобретения

5 Настоящее изобретение относится к способу изготовления ферментного препарата, содержащего по меньшей мере одну рекомбинантную эндопептидазу *Actinoallomurus* с глутеназной активностью, характеризующийся тем, что партию клеток-хозяев *S. lividans*, способных экспрессировать рекомбинантную эндопептидазу *Actinoallomurus*, культивируют в условиях ферментации в среде содержащий по меньшей мере 30%
10 (масс./об.) сахарозы, затем ферментный препарат выделяют и очищают из супернатанта культуры клеток-хозяев. Ферментный препарат получают с высокими выходами с помощью способа согласно настоящему изобретению, и он по существу не содержит антибиотиков, что делает его пригодным для применения у человека. Термин «по существу не содержит» антибиотиков означает, что антибиотики не детектируются в
15 ферментном препарате ни в микробиологическом анализе, ни в количественном анализе методом ВЭЖХ.

Настоящее изобретение также относится к указанному ферментному препарату, полученному с помощью указанного способа, составам указанного ферментного
20 препарата, подходящим для применения у человека, рекомбинантному вектору экспрессии, несущему нуклеиновую кислоту, кодирующую рекомбинантную эндопептидазу(ы) *Actinoallomurus*, и клетку-хозяина *S. lividans*, содержащую указанный рекомбинантный вектор экспрессии и стабильно экспрессирующую указанную рекомбинантную эндопептидазу(ы) *Actinoallomurus*. Более того, настоящее изобретение относится к вариантам клинического применения ферментного препарата и его составов.
25 Предпочтительно по меньшей мере одна представляющая интерес эндопептидаза *Actinoallomurus*, обладающая глутеназной активностью, представляет собой E40 или ее производное, имеющее последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1.

Краткое описание графических материалов

Фигура 1. Активность фракции супернатанта культуры *Actinoallomurus* A8, содержащей нативную E40. **А:** относительная активность по отношению к субстрату
30 sucAlaAlaProPhe-AMC (sucAAPF-AMC) при различных значениях pH (оптимум - 100% активность - при pH 5). **В:** Расщепление глиаина через 2 часа инкубации при 37°C, pH 3. Гель, окрашенный Кумасси бриллиантовым синим R250; Дорожка 1: только глиаин, дорожка 2: глиаин + фракция супернатанта, содержащего E40.

35 **Фигура 2.** Карта вектора pIJ86, несущего ген, кодирующий E40 (рекомбинантный

вектор экспрессии pIJ86/e40).

Фигура 3. Рекombинантная E40 (SEQ ID NO: 2), полученная погружной ферментацией *S. lividans* TK24/pIJ86/e40 в колбах (панели А-С) или в 15-литровом биореакторе с последующей очисткой (панели D-E). **А:** активность в отношении субстрата sucAAPF-AMC при pH 5 образцов супернатантов, взятых в разное время ферментации (♦72, ▲96, ●168, ■192 часа ферментации) из продуцирующего *S. lividans* TK24/pIJ86/E40 (E40, непрерывная линия), и отсутствие активности образцов супернатантов, взятых из контрольного штамма с пустым вектором pIJ86 (ctr, пунктирные линии). Активность показана как относительные единицы флуоресценции (ОЕФ, ось Y), продуцируемой с течением времени (ось X). **В:** относительная активность (%) образца супернатанта E40 через 168 часов ферментации при различных pH: оптимум (100% активность) достигается при pH 5. **С:** зимография 168-часового образца супернатанта E40 при pH 5 с использованием того же субстрата, что и на панели А, и визуализированная в УФ-свете. **Д:** профиль ферментного препарата, содержащего рекомбинантную E40, очищенную из продукта ферментации объемом 15 л; дорожка 1: готовый ферментный препарат, содержащий рекомбинантную E40, окрашенный Кумасси (стрелка указывает на рекомбинантную E40), дорожка 2: зимография, как на С, дорожка 3: полоса гидролиза желатина после 2 часов расщепления при 37°C и pH 5, визуализированная после окрашивания желатинового субстрата с использованием Кумасси. **Е:** относительная активность (%) рекомбинантной E40 в очищенном ферментном препарате при различных значениях pH (от 2 до 8), оцененная с использованием субстрата suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA.

Фигура 4. Активность рекомбинантной E40 оценивали в отсутствие или в присутствии пищеварительных протеаз пепсина (P) (панели А-С) при pH 4, 4,5 и 5 и трипсина (T) (панели D-E, E') при pH 6 и 7. Реакции начинали путем добавления субстрата к образцам ферментного препарата, содержащим только фермент E40 (линия ①), фермент и P (линия ②) фермент и T (линия ④), а также путем добавления только P или T (линии ③ и ⑤), соответственно). Каждое условие реакции было протестировано с двумя повторами, планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение. Панель E' представляет собой увеличение E. Ось X: время инкубации (минуты), ось Y: единицы поглощения, считанные при 410 нм. (Значения R² составляют 0,9948, 0,9976, 0,9978, 0,9639, 0,9994 для E40 по отдельности и 0,993, 0,9975, 0,9982: 0,9661, 0,9994 для E40+P/T для pH 4, 4,5, 5, 6 и 7, соответственно).

Фигура 5. ЖХ/МС-профиль расщепления 33-членного пептида рекомбинантной E40 при pH 5 и 37°C, при этом молярное соотношение E40 и 33-членного пептида составляет 1:48. **А:** только полноразмерный пептид (трехзарядный ион [(M⁺3H⁺)³⁺=1304,68]). a=14,75;

1304,63. **В-Е:** Динамика расщепления 33-членного пептида в результате активности E40. b=13,07, 1010,27; c=14,84, 1304,46; d=14,99, 1304,50; e=15,13, 1304,14; f=7,80, 842,11; g=8,02, 842,34; h=8,24, 842,36; i=11,62, 244,16; l=11,84, 1086,38; m=12,38, 745,13; n=13,17, 956,23; o=7,52, 842,38; p=11,59, 1086,51; q=12,12, 745,22; r=6,66, 842,37; s=11,45, 1086,48; t=11,93, 745,23. Пептидные фрагменты, образующиеся при расщеплении, указаны стрелками. **Г:** схематическая визуализация сайтов расщепления E40, выведенных из конечных остаточных пептидов.

Фигура 6. Анализ методом ВЭЖХ глиаина, инкубированного с рекомбинантной E40 при различном времени инкубации до 240 мин. В момент времени 0 глиаин элюируется в соответствии с гидрофобностью в виде ω -, α - и γ -глиаина.

Фигура 7. А: Распознавание глиаина, обработанного E40, в глиаин-реактивных Т-клеточных линиях, полученных из биопсий тощей кишки 5 различных субъектов, страдающих целиакией (образцы А-Н). Положительные контроли: продукты расщепления необработанного глиаина (образцы I и L) и фитогемагглютинин (ФГА). Каждая панель представляет собой типичный эксперимент из трех, проведенных для каждой Т-клеточной линии. **В:** Иммуностимулирующая активность глиаина, очищенного из гексаплоидной пшеницы, на Т-клетках кишечника человека после расщепления E40, показанная в виде процента Т-клеточного ответа на продукты расщепления глиаина, обработанного только E40 (образцы А-В) или E40 в присутствии желудочно-кишечных протеаз (образцы С-Н), при расщеплении на E40-необработанные продукты расщепления глиаина (образец I), в условиях, указанных в Таблице 1. Продукты ферментативного расщепления глиаина дезамидировали путем обработки tTG и анализировали их способность стимулировать Т-клетки кишечника. Активацию Т-клеток определяли путем измерений продукции IFN- γ . Все продукты расщепления глиаина анализировали при 50 и 100 мкг/мл. Данные представляют собой средние ответы Т-клеточных линий от 5 разных пациентов, страдающих целиакией. Для оценки статистической значимости использовали непарный t-критерий Стьюдента. *= $p < 0,05$

Фигура 8: Анализ ферментного препарата, содержащего рекомбинантную E40, методом электрофореза в ДСН-ПААГ (SDS-PAGE). Пронумерованные полосы вырезали и анализировали с помощью протеомного анализа.

Фигура 9: А: SDS-PAGE показал разрушение белков арахиса рекомбинантной E40; **В:** анализ методом ВЭЖХ белков арахиса, инкубированных с рекомбинантной E40 (1:20 фермент:субстрат, e:s) при различном времени инкубации до 120 мин; для каждой временной точки результаты ВЭЖХ необработанных образцов показаны на верхней панели, в то время как на нижней панели показаны образцы, обработанные E40.

Фигура 10: Продукция E40 в *S. lividans* в присутствии/отсутствии сахарозы. Протеолитическую активность анализировали в супернатанте культур *S. lividans* ТК24/pIJ86/E40, выращенных в среде Р без сахарозы (◆, Suc0) или с 17% (■, Suc17), или 34% сахарозы (▲, Suc34). Образцы отбирают в различных временных точках ферментации: **А:** 120 ч; **В:** 144 ч; **С:** 168 ч. Активность показана в виде относительных единиц флуоресценции (ОЕФ, ось Y), продуцируемой с течением времени (минуты, ось X).

Фигура 11: Продукция E40 в *Pichia pastoris*. Протеолитическую активность анализировали в супернатанте культур рекомбинантных *P.pastoris* через 50 или 96 часов после индукции экспрессии E40. Активность показана как увеличение поглощения (ось Y; милли-единицы поглощения, милли-ед.погл.) в зависимости от времени (ось X; минуты). **А и С:** образцы из культур, выращенных при pH 6 без сахарозы или с 34% сахарозы, соответственно; **В и D:** образцы из культур, выращенных при pH 7 без сахарозы или с 34% сахарозы, соответственно.

Фигура 12: Продукция E40 в *Escherichia coli*. Протеолитическую активность анализировали в неочищенном экстракте, полученном из клеток *E. coli*, трансформированных для экспрессии E40. Протеолитическая активность в супернатанте культур *S. lividans* ТК24/pIJ86/E40, выращенных в соответствии с настоящим изобретением, представлена на графике для сравнения. Активность показана как относительные единицы флуоресценции (ОЕФ, ось Y), продуцируемой с течением времени (минуты, ось X).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способу получения ферментного препарата, содержащего зрелую форму по меньшей мере одной рекомбинантной эндопептидазы *Actinoallomurus* с глютеназной активностью, включающий последовательно: культивирование рекомбинантной клетки-хозяина *Streptomyces lividans*, предпочтительно штамма ТК24, в культуральной среде в условиях ферментации, причем указанная рекомбинантная клетка-хозяин содержит рекомбинантный вектор экспрессии для гетерологичной экспрессии по меньшей мере одной рекомбинантной эндопептидазы *Actinoallomurus*, при этом указанный рекомбинантный вектор экспрессии содержит полинуклеотид, кодирующий указанную по меньшей мере одну рекомбинантную эндопептидазу *Actinoallomurus*, функционально связанный к регуляторными последовательностями, способными направлять экспрессию указанной по меньшей мере одной рекомбинантной эндопептидазы *Actinoallomurus* в рекомбинантной клетке-хозяине; выделение супернатанта культуральной среды и очистку из указанного супернатанта

ферментного препарата, содержащего зрелую форму по меньшей мере одной рекомбинантной эндопептидазы *Actinoallomurus*.

По меньшей мере одна рекомбинантная эндопептидаза *Actinoallomurus* в ферментном препарате, полученном с помощью способа согласно настоящему изобретению, предпочтительно выбрана из группы, состоящей из: эндопептидазы 40 (E40), имеющей последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1; биологически активного фрагмента E40; встречающегося в природе аллельного варианта E40; и эндопептидазы, имеющей последовательность, которая по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90% или 95% идентична SEQ ID NO: 1.

10 Термин «ферментный (или ферментативный) препарат» используется в настоящем документе для обозначения продукта, полученного по завершении способа согласно настоящему изобретению, содержащего (обогащенного) по меньшей мере одну рекомбинантную эндопептидазу *Actinoallomurus*, обладающую глютеназной активностью; причем указанный продукт может представлять собой композицию, дополнительно
15 включающую другие компоненты.

Термин «биологически активный фрагмент» относится к частям эндопептидаз согласно настоящему изобретению, которые сохраняют специфическую глютеназную активность.

«Биологически активный фрагмент» эндопептидазы в соответствии с настоящим изобретением может быть идентифицирован, например, путем: выделения полинуклеотида, кодирующего фрагмент эндопептидаз, имеющих последовательность SEQ ID NO: 3 или 4 (например, полинуклеотидной части полинуклеотидов, имеющих последовательность SEQ ID NO: 5 или 6), экспрессии кодируемого фрагмента эндопептидазы (например, путем рекомбинантной экспрессии *in vitro*) и проверки с
25 помощью подходящего анализа, обладает ли указанный фрагмент эндопептидазы такой же глютеназной активностью, что и эндопептидазы; подходящий анализ представляет собой, например, любой из анализов ферментативной активности, раскрытых в примерах в настоящем документе.

Способ согласно настоящему изобретению также включает получение ферментного
30 препарата, содержащего по меньшей мере одну рекомбинантную эндопептидазу(ы) *Actinoallomurus* с глютеназной активностью, путем введения в клетку-хозяина *S. lividans* рекомбинантного вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, имеющий последовательность, которая отличается от последовательностей нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 5 или 6 из-за вырожденности генетического кода и, таким образом, кодирует
35 те же эндопептидазы, что и кодируемые полинуклеотидом, имеющим последовательность

SEQ ID NO: 5 или 6.

Эндопептидазы, полученные с помощью способа согласно настоящему изобретению, могут иметь последовательность, которая содержит изменения в аминокислотных остатках, которые не являются существенными для биологической активности эндопептидазы. «Биологическая активность» в этом контексте представляет собой природную или нормальную функцию нативных эндопептидаз *Actinoallomurus*, имеющих последовательность SEQ ID NO: 3, например, она представляет собой способность разрушать глютеносвязывающие белки.

Способ согласно настоящему изобретению включает получение ферментного препарата, содержащего по меньшей мере одну рекомбинантную эндопептидазу, последовательность которой имеет по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90% или 95% идентичности с SEQ ID NO: 1. Термины «идентичность» и «гомология», когда они относятся к нуклеотидной или аминокислотной последовательности, используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к степени, в которой две полинуклеотидные или полипептидные последовательности идентичны или гомологичны по остаткам на протяжении конкретной сравниваемой области. Выравнивание и процент идентичности или гомологии можно определить с использованием любой подходящей программы пакета программного обеспечения, известной в данной области техники, например, описанной в Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel F.M. et al., «Commercially Available Software», Current Protocols in Molecular, 1987, Supplement 30, Section 7.7.18, Table 7.7.1). Предпочтительные программы включают программу GCG Pileup, FASTA (Pearson R. and Lipman DJ «Improved Tools for Biological Sequence Analysis» Proc. Natl., Acad. Sci. USA, 1988, 85, 2444-2448) и BLAST (Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. «Basic local alignment search tool» J. Mol. Biol., 1990, 215, 403–410).

Термин «аллельный вариант» обозначает любую из двух или более альтернативных форм гена, занимающих один и тот же хромосомный локус. Аллельная изменчивость возникает естественным образом посредством мутации и может привести к фенотипическому полиморфизму в популяциях. Генные мутации могут быть молчащими (без изменения кодируемого полипептида) или могут кодировать полипептиды, имеющие измененную аминокислотную последовательность. Термин «аллельный вариант» также относится к белку, кодируемому аллельным вариантом гена.

По меньшей мере одна эндопептидаза ферментного препарата, полученного с помощью способа согласно настоящему изобретению, также может быть функционально слита с другим полипептидом, например, меткой; предпочтительно по меньшей мере одна

эндопептидаза ферментного препарата, полученного с помощью способа согласно настоящему изобретению, представляет собой меченую эндопептидазу, более предпочтительно меченую гистидином эндопептидазу, наиболее предпочтительно меченую на С-конце белка, такую как эндопептидаза, имеющая последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2.

Отмечено, что по меньшей мере одна эндопептидаза *Actinoallomurus* ферментного препарата, полученного с помощью способа согласно настоящему изобретению, находится в зрелой форме, поскольку клетка-хозяин *Streptomyces* способна процессировать экспрессированную эндопептидазу и секретировать ее в культуральную среду в зрелой форме. Например, нативная E40 имеет последовательность SEQ ID NO: 3, и ее зрелая форма имеет последовательность SEQ ID NO: 1. В качестве рекомбинантной эндопептидазы, продуцируемой в клетке-хозяине *S. lividans* в соответствии со способом согласно настоящему изобретению, E40 секретруется в культуральную среду в виде зрелой E40, имеющей последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1, несмотря на то, что в клетку-хозяина была введена вся кодирующая последовательность (SEQ ID NO: 3).

Ферментный препарат согласно настоящему изобретению предпочтительно обогащен указанной по меньшей мере одной рекомбинантной эндопептидазой(ами) *Actinoallomurus*; более предпочтительно ферментный препарат не содержит эндопептидаз, отличных от по меньшей мере одной рекомбинантной эндопептидазы (эндопептидаз) *Actinoallomurus*; например, ферментный препарат предпочтительно не содержит эндопептидаз, происходящих из *S. lividans*.

Клетку-хозяина *S. lividans* культивируют в условиях ферментации в подходящей культуральной среде. Под «условиями ферментации» подразумеваются условия культивирования штамма клетки-хозяина (состав среды, параметры перемешивания, аэрация и температура), подходящие для того, чтобы штамм рос и продуцировал представляющее интерес соединение (рекомбинантную эндопептидазу). В частности, культуральная среда условий ферментации способа согласно настоящему изобретению содержит подходящие питательные вещества неживотного происхождения, источники углерода и азота и неорганические соли и характеризуется тем, что она содержит по меньшей мере 30% (масс./об.) сахарозы (т.е. по меньшей мере 30 г сахарозы на каждые 100 мл среды), предпочтительно примерно 34% сахарозы (масс./об.). Условия ферментации в соответствии с настоящим изобретением таким образом включают культивирование рекомбинантной клетки-хозяина в подходящей культуральной среде, содержащей по меньшей мере 30% (масс./об.) сахарозы; ферментацию рекомбинантных

клеток-хозяев проводят при температуре от 25°C до 30°C, предпочтительно от 28°C до 30°C, более предпочтительно примерно 30°C; ферментацию предпочтительно проводят до тех пор, пока рН культуральной среды не станет больше 7, и/или пока глюкоза в среде не будет полностью израсходована, и/или пока рекомбинантный белок, секретируемый в среду, не будет иметь активность более 8 ед.погл./мин на мл супернатанта, измеренную, как описано в примере 5 в настоящем документе. Предпочтительно ферментацию проводят в течение по меньшей мере 48 часов, предпочтительно в течение по меньшей мере 72 часов, перед выделением супернатанта культуральной среды для последующей очистки.

10 Предпочтительно культуральная среда дополнительно содержит дрожжевой экстракт и соевый пептон. Особенно предпочтительной культуральной средой, используемой в способе согласно настоящему изобретению, является среда Р, содержащая сахарозу (примерно 340 г/л), глюкозу (примерно 20 г/л), дрожжевой экстракт (примерно 3 г/л), соевый пептон (примерно 5 г/л), экстракт солода (примерно 3 г/л) и имеющая рН
15 примерно 6,7.

Предпочтительно способ согласно настоящему изобретению включает первый этап культивирования суспензии спор рекомбинантных клеток-хозяев *S. lividans* в первой среде, содержащей глюкозу, дрожжевой экстракт и соевый пептон, при примерно 30°C в течение 3-7 дней, предпочтительно в течение примерно 4 дней, предшествующий этапу
20 культивирования рекомбинантных клеток-хозяев в условиях ферментации. Более предпочтительно указанная первая среда представляет собой среду V, содержащую глюкозу (примерно 20 г/л), дрожжевой экстракт (примерно 5 г/л), соевый пептон (примерно 10 г/л), NaCl (примерно 1 г/л) и имеющую рН примерно 6,7.

Предпочтительно в культуральные среды добавляют подходящее количество
25 антибиотика для селекции рекомбинантных клеток-хозяев, предпочтительно апрамицина, более предпочтительно при 50 мг/л; необязательно указанный антибиотик добавляют только к среде первого этапа культивирования клеток-хозяев, а не к культуральной среде этапа ферментации.

Клетки-хозяева можно культивировать с помощью мелкомасштабной или
30 крупномасштабной ферментации в лабораторных или промышленных ферментерах.

Рекомбинантная эндопептидаза(ы) может быть выделена непосредственно из культуральной среды, поскольку она секретируется в нее. Супернатант культуральной среды, содержащей рекомбинантную эндопептидазу, может быть выделен способами, известными в данной области техники, например, в дополнение к центрифугированию
35 собранной культуры.

В дополнение к выделению супернатанта способ согласно настоящему изобретению предпочтительно включает один или более этапов очистки ферментного препарата из указанного супернатанта. Культуральную среду, например, можно отфильтровать для отделения микробных тел, а затем фильтрат обработать для сбора рекомбинантной

5 эндопептидазы (эндопептидаз) с помощью одной или более из нескольких процедур, таких как: ультрафильтрация, концентрирование при пониженном давлении, высаливание, осаждение органическим растворителем, диализ, гель-фильтрация, адсорбционная хроматография, ионообменная хроматография, электрофокусирование и сублимационная сушка.

10 Предпочтительно этап(ы) очистки способа согласно настоящему изобретению включает по меньшей мере этап очистки ферментного препарата из выделенного супернатанта с помощью аффинной хроматографии; более предпочтительно он также включает этап ультрафильтрации; наиболее предпочтительно очистка ферментного

15 препарата из супернатанта культуральной среды включает последовательные этапы: фильтрации супернатанта, предпочтительно через бумажный фильтр и/или через капсульные фильтры, имеющие номинальный размер пор от 1,0 мкм до 0,3 мкм, с получением очищенного раствора, содержащего представляющую интерес

20 рекомбинантную эндопептидазу(ы); концентрирование очищенного раствора с помощью ультрафильтрации; очистку ферментного препарата с помощью аффинной хроматографии, предпочтительно с помощью аффинной хроматографии с

25 иммобилизованным металлом (ИМАС), из ультрафильтрованного очищенного раствора с получением посредством этого готового ферментного препарата, содержащего (обогащенного) представляющую интерес рекомбинантную эндопептидазу(ы). Согласно

30 предпочтительным вариантам реализации очистка дополнительно включает: депигментацию фракций, элюированных с помощью аффинной хроматографии, предпочтительно с помощью анионообменной хроматографии на DEAE, концентрирование и обессоливание депигментированных образцов, предпочтительно с

помощью их ультрафильтрации, с получением посредством этого готового ферментного препарата, содержащего (обогащенного) представляющую интерес рекомбинантную

Типичные примеры предпочтительного способа получения рекомбинантных эндопептидаз в соответствии с настоящим изобретением представлены далее в Примерах 2-4 и 15.

Предпочтительно рекомбинантный вектор экспрессии, который вводят в клетку-хозяина для экспрессии представляющей интерес эндопептидазы(эндопептидаз), содержит

35

полинуклеотид, который кодирует E40, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1, или ее производное, предпочтительно полинуклеотид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, кодирующий, соответственно, E40, имеющую последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 3, или E40, меченую на С-конце гистидином, имеющую последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 4; причем 5
указанный полинуклеотид также может иметь последовательность, которая по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90% или 95% идентична SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6. Рекомбинантная клетка-хозяин *S. lividans*, содержащая указанный вектор экспрессии, способна продуцировать представляющую интерес эндопептидазу(ы) и секретировать ее 10
зрелую форму в культуральную среду. Например, зрелая форма E40, имеющая последовательность SEQ ID NO: 3, представляет собой эндопептидазу, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1, и зрелая форма меченой гистидином E40, имеющей последовательность SEQ ID NO: 4, представляет собой эндопептидазу, имеющую последовательность SEQ ID NO: 2.

15 Получение ферментного препарата, содержащего меченую гистидином эндопептидазу, такую как меченая гистидином E40, с помощью способа согласно настоящему изобретению представляет особый интерес. Таким образом, согласно предпочтительному варианту реализации настоящее изобретение относится к способу по п. 1, характеризующемуся тем, что указанный рекомбинантный вектор экспрессии 20
содержит полинуклеотид, кодирующий меченую гистидином E40, имеющую последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2, причем предпочтительно указанный полинуклеотид имеет последовательность SEQ ID NO: 6, и ферментный препарат, очищенный из супернатанта культуральной среды, содержит зрелую форму меченой гистидином E40, имеющей последовательность SEQ ID NO: 4.

25 Предпочтительно рекомбинантный вектор экспрессии, используемый в способе согласно настоящему изобретению, представляет собой рекомбинантный вектор экспрессии pIJ86. Таким образом, настоящее изобретение также относится к рекомбинантному вектору экспрессии pIJ86, содержащему полипептид, имеющий последовательность, содержащую SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, предпочтительно 30
рекомбинантному вектору экспрессии pIJ86, имеющему последовательность SEQ ID NO: 8.

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантной клетке-хозяину *S. lividans*, предпочтительно штамму TK24, содержащей указанный рекомбинантный вектор экспрессии; более предпочтительно указанная клетка-хозяин относится к штамму DSM 35
33207, полученному, как описано в настоящем документе в соответствии с настоящим

изобретением, и депонированному 17 июля 2019 г. в DSMZ Института Лейбница - Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур GmbH, Инхоффенштрассе 7B 38124 Брауншвейг - Германия, в соответствии с положениями Будапештского договора.

5 Настоящее изобретение также относится к ферментному препарату, полученному с помощью способа согласно настоящему изобретению, содержащему зрелую форму по меньшей мере одной рекомбинантной эндопептидазы *Actinoallomurus*, обладающей глютеназной активностью.

10 В предпочтительном варианте реализации ферментный препарат представлен в форме порошка.

Согласно предпочтительному варианту реализации рекомбинантную эндопептидазу(ы) *Actinoallomurus*, содержащуюся в ферментном препарате, выделяют из супернатанта культуральной среды или из ферментного препарата, полученного после очистки культуральной среды. Настоящее изобретение также относится к выделенной 15 рекомбинантной эндопептидазе *Actinoallomurus*, полученной из супернатанта, выделенного из культуральной среды рекомбинантной клетки-хозяина *S. lividans* в способе согласно настоящему изобретению, или из готового ферментного препарата, полученного после этапа(ов) очистки в соответствии со способом согласно настоящему изобретению. Предпочтительно выделенный рекомбинантный *Actinoallomurus* выбран из 20 группы, состоящей из: рекомбинантной эндопептидазы 40 (E40), имеющей последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1; биологически активного фрагмента E40; встречающегося в природе аллельного варианта E40; и эндопептидазы, имеющей последовательность, которая по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90% или 95% идентична SEQ ID NO: 1. Более предпочтительно это эндопептидаза, имеющая последовательность, 25 состоящую из SEQ ID NO: 1 или 2, или последовательность, которая по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90% или 95% идентична SEQ ID NO: 1 или 2.

Необязательно ферментный препарат, полученный с помощью способа согласно настоящему изобретению, может быть введен перорально непосредственно после очистки 30 субъекту, нуждающемуся в этом. Предпочтительно ферментный препарат или выделенную рекомбинантную эндопептидазу *Actinoallomurus* изготавливают в виде фармацевтического состава, подходящего для применения у человека.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к фармацевтическому составу, содержащему в качестве активного протеолитического ингредиента ферментный препарат или выделенную рекомбинантную эндопептидазу(ы) *Actinoallomurus*, 35 полученную с помощью способов согласно настоящему изобретению.

Предпочтительный фармацевтический состав совместим с путем введения, предусмотренным для него, который в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно представляет собой пероральное введение. Таким образом, фармацевтический состав согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой пероральный фармацевтический состав. Фармацевтические составы в соответствии с настоящим изобретением могут быть приготовлены с соответствующими ингредиентами с получением препарата в жидкой форме, например, в форме раствора, эмульсии, или в твердой форме, такой как таблетки, капсулы, полутвердое вещество или порошок. Фармацевтический состав ферментного препарата может быть введен различными путями, включая пути, особенно подходящие для смешивания с пищевыми продуктами. Рекомбинантная эндопептидаза(ы) *Actinoallomurus* с глютеназной активностью, присутствующая в фармацевтическом составе, может быть активной до или во время приема внутрь, и ее можно обрабатывать, например, путем подходящей инкапсуляции, чтобы контролировать время активности.

Для приготовления подходящего фармацевтического состава в соответствии с настоящим изобретением можно использовать любой способ стабилизации химического или биологического материала, известный в данной области техники, включая способы, основанные на облучении или температурной модуляции или их комбинациях.

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению более предпочтительно изготавливают так, чтобы их активные ингредиенты высвобождались в желудочном соке. Этот тип составов обеспечит оптимальную активность в нужном месте, например, путем высвобождения ферментного препарата согласно настоящему изобретению в желудке субъекта, нуждающегося в этом.

Настоящее изобретение также включает пищевой продукт или пищевую добавку, которая содержит в качестве активного протеолитического ингредиента ферментный препарат или выделенную рекомбинантную эндопептидазу *Actinoallomurus*, полученную с помощью способов согласно настоящему изобретению.

Ферментный препарат или выделенная рекомбинантная эндопептидаза, полученная с помощью способа согласно настоящему изобретению, также может быть изготовлена в виде пищевой добавки, приготовлена, поставлена и распределена, как описано в других предшествующих документах, касающихся области настоящего изобретения (WO2011/077359, WO 2003/068170, WO2005107786). Например, пищевая добавка согласно настоящему изобретению может представлять собой гранулированный продукт, покрытый ферментом или не имеющий покрытия, который можно легко смешивать с пищевыми компонентами; в качестве альтернативы, пищевые добавки согласно

настоящему изобретению могут образовывать компонент предварительной смеси; в качестве альтернативы, пищевые добавки согласно настоящему изобретению могут представлять собой стабилизированную жидкость, суспензию на водной или масляной основе. Фармацевтическая композиция или пищевая добавка согласно настоящему изобретению может быть обеспечена до еды, непосредственно перед едой, во время еды или сразу после еды так, что эндопротеазы ферментной композиции согласно настоящему изобретению высвобождаются или активируются в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, где эндопротеазы могут дополнять ферменты желудка и поджелудочной железы для детоксикации проглоченного глютена и предотвращения проникновения вредных пептидов через слой энтероцитов.

Ферментный препарат также может быть изготовлен в виде пищевого продукта; согласно предпочтительному варианту реализации указанный пищевой продукт представляет собой муку, которую привели в контакт с указанным ферментным препаратом или указанной выделенной рекомбинантной эндопептидазой *Actinoallomurus*, способной разрушать глютен.

В качестве альтернативы, ферментный препарат и выделенные рекомбинантные эндопептидазы *Actinoallomurus* согласно настоящему изобретению также можно использовать для получения гидролизатов белков для пищевых продуктов и/или напитков.

Предпочтительно ферментный препарат, выделенную рекомбинантную эндопептидазу *Actinoallomurus*, фармацевтические составы, пищевой продукт или пищевую добавку согласно настоящему изобретению применяют в лечении и/или предотвращении целиакии или нарушения, ассоциированного с целиакией, или чувствительности к глютену, не связанной с целиакией, предпочтительно любого нарушения, ассоциированного с непереносимостью пептида глиадина, имеющего последовательность SEQ ID NO: 6. Нарушения, ассоциированные с целиакией, включают: спру-целиакию, герпетиформный дерматит, повреждение слизистой оболочки при целиакии и заболевания, являющиеся следствием повреждения слизистой оболочки при целиакии, такие как железодефицитная анемия, остеопороз, диабет 1 типа, аутоиммунный тиреоидит и Т-клеточные лимфомы, ассоциированные с энтеропатией.

Более того, эндопептидазы *Actinoallomurus* с глютеназной активностью также способны предотвращать и/или лечить аллергию и/или непереносимость орехов и/или арахиса. Таким образом, настоящее изобретение также относится к указанному применению.

Таким образом, нарушения, выбранные из группы, состоящей из: целиакии, нарушения, ассоциированного с целиакией, чувствительности к глютену, не связанной с

целиакией, и аллергии или непереносимости орехов и/или арахиса, можно предотвратить и/или лечить путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества ферментного препарата или выделенной рекомбинантной эндопептидазы *Actinoallomurus*, необязательно изготовленной в виде фармацевтического состава, пищевого продукта или пищевой добавки согласно настоящему изобретению, более предпочтительно путем перорального введения.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к способу лечения и/или предотвращения нарушения, выбранного из группы, состоящей из: целиакии, нарушения, ассоциированного с целиакией, чувствительности к глютену, не связанной с целиакией, и аллергии или непереносимости орехов и/или арахиса, путем введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества заявленного ферментного препарата или заявленной выделенной рекомбинантной эндопептидазы *Actinoallomurus*, или заявленного фармацевтического состава, продукта питания или пищевой добавки. В зависимости от пациента и состояния, которое лечат, а также пути введения активное количество может представлять собой дозировку, соответствующую от 0,01 мг до 0,5 мг рекомбинантной эндопептидазы на каждый кг массы тела в сутки, например, примерно 20 мг/сутки для среднего человека. Типичная доза глютеназы у пациентов будет составлять по меньшей мере примерно 1 мг на взрослого, чаще по меньшей мере примерно 10 мг; и предпочтительно по меньшей мере примерно 50 мг; обычно не более примерно 5 г, чаще не более примерно 1 г и предпочтительно не более примерно 500 мг. Дозировки будут соответствующим образом скорректированы для педиатрического состава. У детей эффективная доза может быть ниже, например, по меньшей мере примерно 0,1 мг или 0,5 мг. Специалисты в данной области техники легко поймут, что уровни доз могут варьироваться в зависимости от конкретного фермента, тяжести симптомов и восприимчивости субъекта к побочным эффектам.

ПРИМЕРЫ

Реагенты, использованные в Примерах

Штамм актиномицета *Actinoallomurus A8* получали из коллекции «Fondazione Istituto Insubrico di Ricerca per la Vita». N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-п-нитроанилид (suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA) и N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-7-аминометилкумарин (suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC) получали от Bachem (Бубендорф, Швейцария); пепсин, трипсин, налидиксовую кислоту и апрамицин получали от Sigma-Aldrich (Милан, Италия); маннит получали от Carlo Erba (Корнаредо, Италия); соевую муку получали от Cargill (Падуя, Италия); агар и соевый пептон получали от Conda (Мадрид, Испания); сахарозу и глюкозу получали от VWR (Leuven, Бельгия); экстракты дрожжей и солода получали от BD (Франклин-лейкс,

Нью-Джерси, США) и Costantino (Favria, TO, Италия), соответственно; 33-членный пептид а-глиаина был синтезирован компанией Biotem (Arprieu, Франция); штамм *S. lividans* TK24 и вектор экспрессии pIJ86 получали из Центра Джона Иннеса (Норидж, Великобритания); типовой штамм *Saccharomyces cerevisiae* X4004-3A (номер доступа 5 KR348914) получали от проф. Л. Полледжони (L. Pollegioni).

Пример 1 – активность нативной E40

Нативную E40, имеющую последовательность SEQ ID NO: 3, очищали из фракции супернатанта культуры *Actinoallomurus* A8, выделенной из почвы (нативная E40), как описано в WO2013083338. Нативная E40 проявляет выраженную глютеназную активность 10 в условиях окружающей среды при pH 3-6 с оптимумом при pH 5 (Фигура 1, панель А). В этих условиях белки глиаина полностью расщепляются (Фигура 1, панель В).

Пример 2 – Клонирование гена, кодирующего E40, в вектор экспрессии pIJ86 и вставка в клетку-хозяина *S. lividans* TK24.

Полинуклеотид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 6, кодирующий меченую 15 гистидином E40, амплифицировали из геномной ДНК *Actinoallomurus* A8 с использованием высокоточной полимеразы Phusion (Thermo Scientific, Родано, Милан, Италия) и 0,5 мкМ олигонуклеотидных праймеров (SEQ ID NO: 9 и 10), которые вводили сайты рестрикции BclI и HindIII на 5'- и 3'-концах полинуклеотидной последовательности и один глицин, за которым следуют шесть остатков гистидина, на С-конце эндопептидазы. 20 Условия цикла ПЦР были следующими: 3 минуты при 98°C, затем 10 циклов по 10 с при 98°C, 20 с при 67°C и 50 с при 72°C, 20 циклов по 10 с при 98°C, 70 с при 72°C, с окончательным удлинением при 72°C в течение 5 минут. Продукты ПЦР (SEQ ID NO: 11) очищали из агарозного геля, расщепляли HindIII и BclI и лигировали в пустой вектор pIJ86 (SEQ ID NO: 7), расщепленный HindIII и BamHI, с получением рекомбинантного 25 вектора pIJ86/e40, имеющего последовательность SEQ ID NO: 8 (Фигура 2). Отсутствие мутаций, вызванных ПЦР, в рекомбинантном векторе оценивали с помощью секвенирования ДНК. Вектор pIJ86/e40, несущий e40, имеющую последовательность SEQ ID NO: 6 под контролем сильного конститутивного промотора ermE, использовали для трансформации *E. coli* ET12567/pUZ8002. Конъюгации выполняли в соответствии с Flett *et* 30 *al*¹⁴, используя *E. coli* ET12567 в качестве донора и *S. lividans* TK24¹⁷ в качестве реципиента, с получением таким образом рекомбинантной клетки-хозяина *S. lividans* TK24, несущей ген, кодирующий E40 (клетка-хозяин T24/pIJ86/e40). Смесь для спаривания распределяли на чашки с агаром с маннитом и соевой мукой (8 г/л маннита, 8 г/л соевой муки, 8 г/л агара, MS), содержащие 10 мМ MgCl₂, и инкубировали при 28°C. 35 Через 16-20 часов на поверхность каждой чашки добавляли 1 мл дистиллированной воды,

содержащей 50 мкг/мл налидиксовой кислоты и 30 мкг/мл апрамицина, распределяли с использованием стеклянной палочки и далее инкубировали при 28 °С до появления колоний эксконьюгантов. Эксконьюгантов многократно высевали на агар MS, содержащий налидиксовую кислоту и апрамицин; готовую суспензию спор, приготовленную в соответствии с Kieser *et al*¹⁵, хранили при -80°С в 20% глицерине.

Пример 3 – Экспрессия E40 рекомбинантным штаммом *S. lividans* ТК24

Рекомбинантные клетки-хозяева *S. lividans* ТК24/pIJ86/e40 из Примера 2 инокулировали в колбы Эрленмейера (50 мл), содержащие 20 мл среды V (как указано выше) с добавлением 50 мг/л апрамицина, и инкубировали на ротационном шейкере при 200 об./мин при 30°С. Через 5 дней роста культуру инокулировали в одну колбу Эрленмейера (500 мл), содержащую 100 мл среды P (как определено выше) с добавлением 50 мг/л апрамицина, и инкубировали в тех же условиях в течение 8 дней. В качестве альтернативы, для ферментации в масштабе 15 л 5-дневную культуру, выращенную в среде V, сначала инокулировали в три колбы Эрленмейера объемом 500 мл, содержащие 100 мл среды V, и инкубировали в тех же условиях; затем через 72 часа культуры в колбах собирали, объединяли и использовали для инокуляции ферментера (Biostat Cplus, Sartorius Stedim, Геттинген, Германия), содержащего 15 литров среды P с добавлением 50 мг/л апрамицина. Ферментацию проводили при 30°С в условиях перемешивания при 450 об./мин, и продукцию рекомбинантной E40 контролировали с течением времени путем измерения ферментативной активности в культуральном супернатанте, полученном после центрифугирования при 11000 g в течение 6 минут. Ферментацию останавливали через 94 часа, когда ферментативная активность достигала 1430 Ед. на мл супернатанта (см. пример 5, в котором описан анализ ферментативной активности, использованный в настоящем документе).

Пример 4 – Очистка ферментного препарата из супернатанта культуральной среды *S. lividans* ТК24/pIJ86/e40

Собранную культуру *S. lividans* ТК24/pIJ86/e40 из примера 3 центрифугировали в течение 90 мин при 4120 g, выделенный супернатант собирали и фильтровали на бумаге Rapida A (Enrico Bruno, Турин, Италия) и дополнительно дважды очищали на капсулах из полиэфирсульфона Opticap[®] (номинальные размеры пор 1,0 мкм и 0,5 мкм) (Merck, Вимодроне, Италия). Затем очищенный раствор концентрировали в 10 раз с помощью системы ультрафильтрации (TFF1) с использованием целлюлозных касет Pellicon 3 Ultracel TFF (номинальное отсечение по молекулярной массе 10 кДа) и добавляли к 0,5 М NaCl и 50 мМ Na₂HPO₄, pH 7,2. Фермент очищали методом аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом (ИМАС) с использованием смолы Ni Sepharose[®] 6 Fast Flow

(GE Healthcare, Милан, Италия). Колонку ИМАС уравнивали 5 объемами фосфатного буфера (рН 8,0), элюцию проводили 5 объемами 250 мМ имидазола, 50 мМ фосфатного буфера (рН 8,0), элюированные фракции (330 мл) доводили до рН 6,3 муравьиной кислотой и депигментировали с помощью анионообменной хроматографии с DEAE (GE Healthcare). Депигментированные образцы концентрировали и обессоливали с помощью системы ультрафильтрации (TFF2, Pellicon, номинальное отсечение по молекулярной массе 10 кДа). Перед сублимационной сушкой в образец добавляли маннит и трегалозу (15 и 5 мг/мл, соответственно) для улучшения процесса кристаллизации¹⁶.

Содержание белка в очищенном образце составляло 6% (измерено с помощью ВСА-анализа) с 41000 Ед./мг белка, что эквивалентно примерно 8 мг белка/мл культурального супернатанта.

Эффективность способа очистки продемонстрировали с помощью SDS-PAGE, при котором рекомбинантная Е40 мигрировала в основной полосе при ~40 кДа (Фигура 3, панель D, дорожка 1, стрелка). Анализ N-концевой последовательности полосы 40 кДа после SDS-PAGE подтвердил предсказанную зрелую форму рекомбинантной Е40.

Пример 5 – Ферментативная активность ферментного препарата.

Анализы ферментативной активности выполняли в 96-луночных микропланшетах для титрования (прозрачных, с плоским дном) с использованием считывающего устройства для планшетов Infinite 200 PRO (Tecan, Меннедорф, Швейцария). Двадцать микролитров образцов, содержащих Е40 в диапазоне концентраций 10-50 нМ, предварительно инкубировали в течение 5 минут при 37°C, а затем добавляли к 180 мкл 220 мкМ *suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA* в цитратно-фосфатном буфере (0,1 М лимонной кислоты, 0,2 М гидрофосфата натрия, рН 5). Образцы инкубировали в течение 20 минут при 37°C. *pNA* детектировали при 410 нм, считывая с интервалом 5 мин.

Активность фермента определяется по линейному увеличению поглощения с течением времени: 1 единица активности (ед. акт.) определяется как количество фермента, способное высвободить 1 условную единицу поглощения (усл.ед.погл.) за 1 минуту, и измеряется как «условные единицы поглощения, производимые в минуту» (усл.ед.погл./мин):

$$1 \text{ ед. акт.} = \text{усл.ед.погл./мин} = \frac{\text{Поглощение}^{T2} - \text{Поглощение}^{T1}}{T2 - T1}$$

Обычно рассчитывается в интервале 5-15' (T1=5 и T2=15 минут, соответственно).

Чтобы правильно оценить продукцию Е40, любой образец должен быть разбавлен, чтобы получить линейное увеличение поглощения со временем; для образцов супернатантов от используемого в настоящее время продуцента Е40 используется разведение в соотношении 1:40.

Продукция E40 выражается в виде ед. акт./мл супернатанта.

Такой же метод количественного определения E40 используется для образцов, полученных на всех этапах последующего технологического процесса, и выражается как ед. акт./мл или ед. акт./мг для жидких или твердых образцов, соответственно.

5 1 единица (Ед.) определяется как количество фермента, высвобождающее 1 мкмоль рНА в минуту. В наших условиях анализа: ед. погл. на мкмоль рНА=0,006; 1 Ед. = ед. акт./0,006. Активность образца выражали в Единицах фермента на мл (в случае супернатантов) или на мг твердого материала (в случае готового порошкового ферментного препарата, содержащего рекомбинантную E40).

10 Оптимум рН определяли с использованием того же субстрата, который был приготовлен в 0,2 М цитрате аммония при рН 2 или в цитратно-фосфатном буфере в диапазоне рН 3-8, соответственно.

Для зимографического анализа образцы, содержащие E40, подвергали невосстанавливающему SDS-PAGE (12% полиакриламид) при 100 В с использованием
15 системы Tetra-cell Mini-PROTEAN (Bio-Rad, Милан, Италия). Гель дважды промывали цитратно-фосфатным/фосфатным буфером (рН 5,0) и затем инкубировали с тем же буфером, содержащим 100 мкМ *suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC*. Активность E40 визуализировали в геле, подвергнутом воздействию УФ-света.

Протеолитическую активность E40 также оценивали с использованием желатина в
20 качестве субстрата, после проведения электрофореза гель промывали цитратно-фосфатным буфером с рН 5,0 и накладывали на 10% желатиновый гель для зимограммы (Bio-rad), уравновешенный тем же буфером, в течение 10 минут. Два перекрытых геля инкубировали при 37°C в течение 2 часов, затем желатиновый гель окрашивали Кумасси бриллиантовым R250. Расщепление желатина визуализировали после обесцвечивания геля
25 в виде четких полос лизиса, обусловленных протеолитическим действием протеаз, диффундировавших из ПА-геля в зимограмму.

Мониторинг ферментативной активности в супернатанте культур, выращенных в колбах в примере 3, продемонстрировал стабильную и непрерывную продукцию рекомбинантной E40 вплоть до 8 дней ферментации (Фигура 3, панель А). Как и нативная
30 E40, рекомбинантная E40 была активна в диапазоне рН 3-6 с оптимумом при рН 5 (Фигура 3, панель В). Зимографический анализ, проведенный при рН 5, продемонстрировал, что рекомбинантная E40 была единственным активным белком в культуральных супернатантах (Фигура 3, панель С).

35 Рекомбинантная E40 также является единственным белком в очищенном ферментном препарате, полученном в примере 4, который активен в отношении

хромогенного субстрата *suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC* (Фигура 3, панель D, дорожка 2), а также в отношении родového белкового субстрата, такого как желатин (Фигура 3, панель D, дорожка 3), исключая тем самым наличие какой-либо эндопротеазы, отличной от рекомбинантной E40, в готовом очищенном ферментном препарате. Активность очищенного ферментного препарата, содержащего ферментный препарат рекомбинантной E40, при различных значениях pH оценивали с использованием субстрата *suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA*, pH в диапазоне от 2 до 8 (Фигура 3, панель E). В результате он был максимально активен при pH 5, а значительная остаточная активность (~40%) сохранялась при pH 3. Эти результаты предсказывают оптимальное действие в постпрандиальной желудочной среде, когда pH выше 3 в течение более чем часа^{8,9}. Интересно, что рекомбинантная E40 остается существенно активной (приблизительно 50%) при pH 6, что также указывает на пролонгированное действие в постпрандиальном отделе двенадцатиперстной кишки, где pH ниже или равен 6 в течение длительного времени, после еды⁹. В целом, результаты подтверждают полное сходство между нативной и рекомбинантной формой E40. Очищенный ферментный препарат, содержащий рекомбинантную E40, полученный в примере 4 с помощью способа в соответствии с настоящим изобретением, фактически имеет химические/физические свойства и биологическую активность, сравнимые с нативной E40, выделенной из штамма *Actinoallomurus*.

Пример 6 - рекомбинантная E40 устойчива к пищеварительным протеазам.

Затем оценивали устойчивость рекомбинантной E40, полученной с помощью способа согласно настоящему изобретению, к протеолитической активности желудочных (пепсин) и дуоденальных (трипсин) пищеварительных протеаз (Фигура 4) с использованием *suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA* в качестве субстрата. Водные растворы фермента E40 по отдельности или в комбинации с пепсином и/или трипсином (0,2 мг/мл E40, 0,1 мг/мл пепсина или трипсина) разводили в цитратно-фосфатном буфере, содержащем *suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA* при pH 4, 4,5 и 5 для пепсина и при pH 6 и 7 для трипсина. Конечные концентрации в реакционной смеси были: 200 мкМ субстрата, 1-4 нМ E40 для инкубаций при pH от 4 до 5 или 4 нМ и 7 нМ для инкубаций при pH 6 или 7, соответственно (концентрацию E40 корректировали в соответствии с оптимальным pH). Пищеварительную протеазу поддерживали в соотношении 1:2 (масс./масс.) относительно E40.

Реакции (объем 200 мкл в 96-луночных плоскодонных микропланшетах для титрования) проводили в течение 110 минут при 37°C. Поглощение контролировали каждые 10 минут для определения ферментативной активности. Пепсин и трипсин без E40 обрабатывали таким же образом и тестировали в тех же условиях, что и референсный

контроль. Каждый анализ проводили с двумя повторами.

Стоит отметить, что ни пепсин (Фигура 4, панели А-С), ни трипсин (Фигура 4, панели D-E, E') не гидролизуют хромогенный субстрат. Примечательно, что ни добавление пепсина/трипсина, ни кислый рН не влияли на расщепляющую активность E40. Напротив, в присутствии пепсина наблюдали незначительно повышенную активность E40 (Фигура 4, панели А-С), возможно, из-за демаскировки каталитического сайта E40 пепсином. В целом, эти результаты подтверждают устойчивость E40 к основным пищеварительным протеазам человека в физиологических условиях.

Пример 7 – Расщепление иммунодоминантных 33-членных пептидов глиаина с помощью E40. Разрушение 33-членного пептида глиаина контролировали с помощью ЖХ-МС/МС до расщепления рекомбинантной E40 (Фигура 5, панель А) и после этого (Фигура 5, панели В-Е). Расщепление выполняли в 96-луночном микропланшете для титрования с U-образным дном; 33-членный пептид разводили в цитратно-фосфатном буфере (рН 5) до 5 мг/мл, смешивали с ферментным препаратом, содержащим рекомбинантную E40, разведенным в том же буфере (молярное соотношение фермент/субстрат 1:48) и инкубировали при 37°C. В моменты времени 0, 15, 30 и 60 минут отбирали аликвоты (10 мкл) и реакции останавливали кипячением в течение 3 минут перед анализом методом ЖХ-МС/МС.

Образцы анализировали с помощью системы ВЭЖХ Accela Instrument (Thermo Fisher Scientific, Сан-Хосе, Калифорния, США), соединенной как с УФ-детектором, так и с масс-спектрометром с ионной ловушкой LTQ-XL (Thermo Fisher Scientific). Примечательно, что сразу после начала инкубации наблюдали незначительный гидролиз 33-членного пептида (Фигура 5, панель В, 0 минут); сигнал нативного 33-членного пептида полностью исчезал уже через 15 минут (Фигура 5, панель С). Более конкретно, анализ спектров МС/МС показал, что активность E40 разрушала все 33-членные иммунотоксические последовательности. Сайт расщепления E40 находится между остатками F-P и Q-L глиаина, в результате образуются короткие пептиды, лишенные способности стимулировать Т-клетки (Фигура 5, F)³. Этот результат также наблюдали при более разбавленной концентрации E40 (1:96, молярное соотношение): в этом случае полное разрушение 33-членного пептида происходило за 30 минут (не показано).

Пример 8 – Расщепление цельного глиаина с помощью E40. Способность E40 гидролизовать вредные пептиды в цельных глиаиновых белках оценивали с помощью анализа методом ВЭЖХ (Фигура 6). Глиадин экстрагировали из цельной муки *Triticum aestivum* (сорт Sagittario) в соответствии с Mamone *et al*⁴. Глиадин (1 мг) растворяли в 1 мл 0,1 М ацетата аммония, рН 4, и инкубировали с ферментами E40 (фермент:субстрат, 1:20)

при 37°C в разные моменты времени (0, 15, 30, 60, 120, 240 минут). Ферментативный гидролиз останавливали кипячением образцов в течение 5 минут. Образцы лиофилизировали и хранили при -40°C до дальнейшего химического анализа.

SDS-PAGE выполняли на системе Tetra-cell Mini-PROTEAN (Bio-Rad, Милан, Италия). Образцы расщепленного глиаина растворяли в буфере Лэмли (0,125 М трис-НСl, рН 6,8, 5% ДСН, 20% глицерина, 0,02% бромфенолового синего) и наносили на готовый 12% акриламидный гель (Bio-Rad). Электрофорез проводили в невосстанавливающих условиях, исключая β-меркаптоэтанол в буфере Лэмли. Белковые полосы визуализировали с использованием SilverBlue™ (Кумасси бриллиантовый синий G-250) и оцифровывали с использованием сканера LABScan (Amersham Bioscience/GE Healthcare, Упсала, Швеция). ОФ-ВЭЖХ проводили на ОФ-ВЭЖХ с использованием модульной системы HP 1100 Agilent Technology (Пало-Альто, Калифорния, США). Образцы расщепленного глиаина суспендировали в 0,1% ТФУ и разделяли на колонке C18 (Aeris PEPTIDE, 3,6 мкм, внутренний диаметр 250×2,10 мм, Phenomenex, Торранс, Калифорния, США). Элюент А представлял собой 0,1% ТФУ (об./об.) в воде Milli-Q, элюент В представлял собой 0,1% ТФУ (об./об.) в ацетонитриле. Колонку уравнивали при 5% В. Пептиды разделяли, применяя линейный 5-70% градиент В в течение 90 минут при скорости потока 0,2 мл/мин. Хроматографическое разделение выполняли при 37°C с использованием термостатического держателя колонки. Выходящий из колонки поток контролировали при 220 и 280 нм с помощью детектора УФ-видимого света.

Из-за сложной смеси цельных глиаинов расщепление ферментным препаратом, содержащим рекомбинантную E40 (молярное соотношение 1:48), продляли до 240 минут инкубации (Фигура 6, панель В-Г). Образец нерасщепленного глиаина анализировали в качестве референсного контроля (Фигура 6, панель А). Как и ожидалось, хроматографический профиль значительно изменился, поскольку пики, относящиеся к α-, β- и γ-глиаину, заметно уменьшились через 30 мин (Фигура 6, панель С) и исчезли между 60 и 120 мин расщепления E40 (Фигура 6, панели D и E). Профили продуктов расщепления через 180 мин и 240 мин (Фигура 6, панели F и G) были сходными, что указывает на отсутствие дальнейшего разрушения.

Пример 9 – Протеолитическое разрушение гуморальных и Т-клеточных эпитопов глютена с помощью E40. Затем оценивали, эффективно ли ферментативная активность рекомбинантной E40 нейтрализует: i) способность белков глютена связывать антитела G12, и ii) стимуляцию опосредуемого Т-клетками иммунного ответа, измеряемую по высвобождению IFN-γ. С этой целью белки глиаина суспендировали в 1

мл 0,1 М ацетата аммония и расщепляли только E40 или E40, инкубированной совместно с желудочно-кишечными протеазами, пепсином и трипсином/химотрипсином, при различных рН и в различных временных точках, как подробно описано в Таблице. 1.

Образец продуктов расщепления глиаина	Условие гидролиза в желудке	Условие гидролиза в двенадцатиперстной кишке
A	E40 (1 ч) (рН 4)	
B	E40 (2 ч) (рН 4)	
C	E40 + пепсин (1 ч) (рН 4)	
D	E40 + пепсин (2 ч) (рН 4)	
E	E40 + пепсин (2 ч) (рН 4)	Трипсин + химотрипсин (2 ч) (рН 6)
F	E40 + пепсин (2 ч) (рН 4)	Трипсин + химотрипсин (4 ч) (рН 6)
G	E40 + пепсин (1 ч) (рН 4)	Трипсин + химотрипсин (2 ч) (рН 6)
H	E40 + пепсин (1 ч) (рН 4)	Трипсин + химотрипсин (4 ч) (рН 6)
I	Пепсин (2 ч) (рН 4)	Трипсин + химотрипсин (4 ч) (рН 6)
L	Пепсин (2 ч) (рН 4)	Трипсин + химотрипсин (4 ч) (рН 7)

Таблица 1.

5 Все ферменты добавляли в массовом соотношении 1:20 (фермент:белок) и инкубировали при 37°C, при указанных значениях рН и времени инкубации. Глиаины, расщепленные E40/пепсином/химотрипсином, дезамидировали с помощью tTGase (Sigma Aldrich), как описано ранее⁴. В общих чертах, продукты ферментативного расщепления глиаина (500 мкг/мл) инкубировали с 2 Ед. tTG морской свинки (Т-5398, Sigma, Сент-Луис, Миссури, США) при 37 °С в течение 2 часов в ФСБ с 1 ммоль/л CaCl₂.

Для оценки влияния расщепления E40 на иммунологический потенциал пшеницы содержание глютена в образцах A-L определяли с помощью моноклональных антител, специфичных в отношении последовательности QRQLPY (ИФА – G12)¹⁰.

15 По сравнению с необработанными образцами глиаина (образцы I и L), образец, расщепленный E40 (образцы от A до H), показал резкое снижение содержания глютена, значительно ниже 20 м.д. (Таблица 2).

Образец продукта расщепления глиаина	м.д. (нг/мл)
A	1,72
B	2,26
C	5,23
D	5,42

E	4,09
F	2,68
G	1,68
H	2,05
I	>800
L	>800

Таблица 2

Чтобы оценить способность препаратов глиадины активировать Т-клеточный ответ, различные продукты ферментативного расщепления глиадины (образцы А-L на Фигурах 7А и 7В), дезамидированные путем обработки tTG, анализировали на линиях CD4⁺ Т-клеток, ранее установленных из биопсий кишечника пациентов, страдающих целиакией¹¹ (Таблица 3).

Пациенты	Диагноз	Возраст	Распознавание пептида
CD №1	Атрофическая	6 лет	DQ2,5-глия-γ1
CD №2	Потенциальная целиакия	2 года и 7 месяцев	DQ2,5-глия-α1,2; ω1,2
CD №3	Атрофическая	3 года и 8 месяцев	DQ2,5-глия-ω1,2; γ26-членный
CD №4	Атрофическая	15 лет	DQ2,5-глия-ω1,2; γ26-членный
CD №5	Ремиссия	18 лет	DQ2,5-глия-α1,2

Таблица 3

В общих чертах, мононуклеарные клетки кишечника стимулировали облученными аутологичными мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) и дезамидированным глиадином, расщепленным пепсином-химотрипсином, экстрагированным из гексаплоидной пшеницы. Растущие Т-клетки поддерживали в культуре путем повторной стимуляции гетерологичными облученными МКПК и ФГА, а также IL-2 в качестве фактора роста. Пептидную специфичность TCL оценивали путем анализа их реактивности в отношении панели иммуногенных пептидов глютена и выявили большой репертуар распознавания пептидов. В функциональных анализах иммунный ответ TCL на продукты ферментативного расщепления глиадины (образцы А-L, Таблица 1 и Фигура 7А и В) анализировали путем детектирования продукции IFN-γ. Т-клетки (3×10⁴) инкубировали совместно с линиями облученных аутологичных EBV-трансформированных В-лимфобластных клеток (В-LCL, 1×10⁵) в 200 мкл полной среды (X-Vivo15 с добавлением 5% сыворотки человека и антибиотиков пенициллина и стрептомицина, все реагенты были поставлены Lonza-BioWhittaker, Вервье, Бельгия) в 96-луночных планшетах с U-образным дном. После инкубации в течение 48 часов

супернатанты клеток (50 мкл) собирали для определения IFN- γ . Каждый препарат антигена анализировали с двумя повторами и по меньшей мере в трех независимых экспериментах для каждой Т-клеточной линии. IFN- γ измеряли с помощью классического ИФА в формате «сэндвич» с использованием очищенных и конъюгированных с биотином антител к IFN- γ , приобретенных у Mabtech (Nacka Strand, Швеция). Чувствительность анализа составила 32 пг/мл.

Как и ожидалось, все Т-клеточные линии продуцировали высокий уровень IFN- γ при воздействии глиаина, расщепленного пепсином-химотрипсином/трипсином (образцы I и L из Таблицы 1, Фигура 7А и Фигура 7В). Наоборот, во всех исследованных экспериментальных условиях в Т-клетках, подвергшихся воздействию расщепленных E40 глиадинов, не было измерено детектируемой продукции IFN- γ (образцы А-Н в Таблице 1 и Фигура 7А и Фигура 7В).

Пример 10 – Расщепление пищевых продуктов на основе глютена (хлеб) *in vitro*

Чтобы оценить эффективность фермента E40 в качестве пероральной добавки для устранения потребления глютена у пациентов, применяли модель перорально-желудочного пищеварения *in vitro*. Этап расщепления хлеба (*T. aestivum*) проводили в моделируемом физиологическом условии, включая пероральное жевание и присутствие пищеварительных желудочных ферментов. Время расщепления выбирали в соответствии со средним временем прохождения химуса по отделам желудка. Ферментный препарат E40 добавляли в начале имитируемой желудочной фазы. Разрушение Т-клеточных эпитопов и токсичных пептидов тестировали с использованием моноклональных антител (конкурентный ИФА-R5) в соответствии с рекомендациями производителя и рекомендациями для АОАС.

По сравнению с образцами, не обработанными E40, расщепленный хлеб, включая образец с E40, показал резкое снижение содержания глютена, значительно ниже 20 м.д. (Таблица 4).

Образец расщепленного хлеба	м.д. (нг/мл)
Продукт перорально-желудочного расщепления	303,0
Продукт перорально-желудочного-E40 расщепления	16,2

Таблица 4

Пример 11 – Расщепление *in vitro* белков арахиса, инкубированных с рекомбинантной E40 (1:20, e:s)

Разрушение белков арахиса, инкубированных в присутствии рекомбинантной E40, оценивали с помощью анализа методом SDS-PAGE и ВЭЖХ. Результаты показаны на Фигуре 9 (А: анализ SDS-PAGE; В: анализ ВЭЖХ).

Пример 12 – Протеомный анализ рекомбинантной E40.

Также выполняли тщательный протеомный анализ ферментного препарата, полученного из *S. lividans* в соответствии со способом согласно настоящему изобретению. Образец ферментного препарата анализировали методом SDS-PAGE (Фигура 8), затем дорожки вырезали и расщепляли трипсином, а смесь пептидов анализировали с помощью ЖХ-МС/МС. Масс-спектры обрабатывали с помощью программного обеспечения Proteome Discoverer, которое выявило идентичность белка (белков) в каждой полосе геля (Таблица 5).

Полоса геля	Ранг	№ доступа	Nemesys				Мол. масса белка	pI белк	Вид	Название белка
			Уник. №	% ков	Наилучшая оценка дискриминанта	Наилучшее ожидаемое значение				
1	1	Q9ZBU3	11	21,0	8,35	$7,4 \times 10^{-15}$	61099,2	6,5	STRCO	Неохарактеризованный белок
	2	Q9S2NO	9	38,3	6,04	$1,4 \times 10^{-10}$	19219,8	4,7	STRCO	Бактериоферритин
	3	Q54410	7	14,9	4,99	$1,2 \times 10^{-8}$	58273,9	8,5	STRLI	Трипептидиламинопептидаза
2	1	A0A076MH05	18	34,4	7,34	$5,5 \times 10^{-13}$	42792,4	6,3	STRLI	Глицерофосфорилдиэфирфосфодиэстераза
	2	Q54410	11	20,7	6,65	$1,1 \times 10^{-11}$	58273,9	8,5	STRLI	Трипептидиламинопептидаза
3	1	O69935	22	29,4	5,87	$2,9 \times 10^{-10}$	63258,4	6,5	STRCO	Предполагаемая гамма-глутамилтранспептидаза (предполагаемый секретируемый белок)
	2	A0A076LZL8	14	27,2	6,76	$6,5 \times 10^{-12}$	57422,7	6,5	STRLI	Неохарактеризованный белок
	3	Q54410	13	29,4	5,19	$5,4 \times 10^{-9}$	58273,9	8,5	STRLI	Трипептидиламинопептидаза
	4	Q8CJI8	9	21,9	7,31	$6,1 \times 10^{-13}$	42675,2	6,3	STRCO	Предполагаемая глицерофосфорилдиэфирфосфодиэстераза
4	Не идентифицировано									
5	1	Q54344	4	9,2	6,57	$1,5 \times 10^{-11}$	55425,9	5,5	STRLI	Эстераза
	1	Q54344	13	24,0	7,73	$1,0 \times 10^{-13}$	55425,9	5,5	STRLI	Эстераза

6	2	D6EF89	10	35, 9	6,15	$8,6 \times 10^{-11}$	36594, 8	6,6	STRLI	Оксидоредуктаза
7	Не идентифицировано									

Таблица 5

Протеомный анализ подтвердил, что рекомбинантный белок E40 мигрирует в основной полосе при ~ 45 кДа (Фигура 8, полоса 4). SDS-PAGE также выявил наличие дополнительных, хотя и менее интенсивных полос. Эти полосы были отнесены к белкам *Streptomyces lividans*, которые не были полностью удалены в процессе очистки. Некоторые из этих примесей представляют собой протеазы, но ни одна из них не обладает глютенными свойствами, это подтверждает, что рекомбинантная E40 является единственным белком, обладающим активностью против глютена в готовом ферментном препарате.

10 **Пример 13 - Микробиологический анализ порошков ферментного препарата на этапах ферментации и последующего технологического процесса**

Как известно, *S. lividans* ТК24 потенциально может продуцировать актинородин (ACT), ундецилпродигиозин (UDP) и кальций-зависимый антибиотик (CDA), в частности, при выращивании в условиях ферментации. Анализ микроразведения в бульоне, стандартизированный Институтом клинических и лабораторных стандартов (CLSI), затем использовали для оценки наличия антибиотика в образцах, полученных из ферментных препаратов, полученных с помощью способа согласно настоящему изобретению. Антимикробную активность тестировали на тестовых микроорганизмах (test-mo), которые, как известно, не проявляют устойчивости к антибиотикам: *Staphylococcus aureus* ATCC6538 (представитель Gram+); *Escherichia coli* L47 (коллекция Lepetit; представитель Gram-); *Candida albicans* L145 (коллекция Lepetit; представитель дрожжей).

Двукратное последовательное разведение образцов, подлежащих тестированию, выполняли в стерильных 96-луночных микропланшетах, затем инокулировали тестовые микроорганизмы в их соответствующей среде (конечный объем 100 мкл/лунку); каждое определение проводили с тремя повторами. Затем инокулированные микропланшеты инкубировали в течение 18, 20 и 24 ч для *E. coli*, *S. aureus* и *C. albicans*, соответственно, при 35°C. Антимикробную активность образцов с неизвестной «антимикробной» концентрацией измеряли как конечную точку, т. е. максимальное разведение, ингибирующее рост тестового штамма; его определяли путем визуального осмотра микропланшетов с помощью увеличительного зеркала.

Для контроля анализа использовали стандартные соединения: ципрофлоксацин (активность против G⁺ и G⁻), даптомицин (только Gram⁺), амфотерицин В (только *C.*

albicans); кроме того, тестировали апрамицин (G+ и G-), поскольку он используется в способе ферментации, а также имидазол, поскольку его можно использовать для элюирования E40 из никелевой смолы.

Стандартные соединения тестировали в диапазоне концентраций от 128 до 0,125 мкг/мл, за исключением имидазола, использованного в диапазоне концентраций от 0,35 мМ до 250 мМ; их антимикробная активность, выраженная в виде МИС (минимальной ингибирующей концентрации), показана в Таблице 6 ниже.

	МИС (минимальная ингибирующая концентрация; мкг/мл)		
	<i>S. aureus</i> ATCC6538	<i>E. coli</i> L47	<i>C. albicans</i> L145
Апрамицин	8	8	>128
Ципрофлоксацин	0,25	0,03	>128
Даптомицин	0,5	>128	>128
Амфотерицин В	>128	>128	0,5
Имидазол (мМ)	125	125	3,9

Таблица 6

Затем подтверждали активность трех партий порошка ферментного препарата E40 (F30, F34 и F35): все три проанализированные партии не проявляли антимикробной активности при самой высокой протестированной концентрации (разведение образца 1:4, что соответствует 2,5 мг/мл конечной концентрации порошка), это свидетельствует о том, что в ферментном препарате отсутствуют антибиотики. В контрольных лунках, содержащих образцы порошка E40 в неинокулированных средах (то есть без тестового микроорганизма), рост микробов не наблюдался.

Также тестировали антимикробную активность образцов, полученных в результате цикла ферментации *S.lividans* ТК24/pIJ86/e40 в масштабе 15 л, с последующими этапами очистки в соответствии с настоящим изобретением (Таблицы 7-9).

Этап очистки ферментного препарата	КОНЕЧНАЯ ТОЧКА		
	<i>S. aureus</i> ATC6538		
	Повторы		
Супернатант HV	<1:2	<1:2	<1:2
IMAC-E1	<1:4	<1:4	<1:4
DEAE-FT	<1:4	<1:4	<1:4
TFF2	<1:4	<1:4	<1:4
SN 24 ч	<1:4		
SN 50 ч	<1:4		

SN 69 ч	<1:4		
SN 90 ч	<1:4		
SN 115 ч	<1:4		
Среда с апрамицином	1:4, примерно 12,5 мкг/мл апрамицина		

Таблица 7

Этап очистки ферментного препарата	КОНЕЧНАЯ ТОЧКА		
	<i>E. coli</i> L47		
	Повторы		
Супернатант HV	1:2	1:2	1:2
IMAC-E1	1:4	1:4	1:4
DEAE-FT	<1:4	<1:4	<1:4
TFF2	<1:4	<1:4	<1:4
SN 24 ч	<1:4		
SN 50 ч	<1:4		
SN 69 ч	<1:4		
SN 90 ч	<1:4		
SN 115 ч	<1:4		
Среда с апрамицином	1:4, примерно 12,5 мкг/мл апрамицина		

Таблица 8

Этап очистки ферментного препарата	КОНЕЧНАЯ ТОЧКА		
	<i>C. albicans</i> L145		
	Повторы		
Супернатант HV	1:2	1:2	1:2
IMAC-E1	1:32	1:32	1:32
DEAE-FT	1:32	1:32	1:32
TFF2	<1:4	<1:4	<1:4
SN 24 ч	<1:4		
SN 50 ч	<1:4		
SN 69 ч	<1:4		
SN 90 ч	<1:4		
SN 115 ч	<1:4		

Среда с апрамицином

не тестировали

Таблица 9

Супернатант собранной культуры (HV) (полученный центрифугированием при 17664 g в течение 30 минут) показал незначительную активность против *E. coli* и *C. albicans*, что может быть связано с наличием ундецилпродигиозина (UDP), как и ожидалось на основании известного профиля его активности. Противокандидозная активность, показанная ИМАС-элюированным E1 и проточной фракцией с DEAE, несомненно, связана с имидазолом; низкая активность элюата ИМАС против *E. coli*, возможно, все еще связана с остаточным присутствием UDP. Конечный диафильтранный образец TFF2 не имел никакой детектируемой антимикробной активности. Что касается апрамицина, то его наличие не было выявлено при сборе культуры, несмотря на то, что он был добавлен в продуктивную среду при 50 мкг/мл, и его МИС составила 8 мкг/мл как против *S. aureus*, так и против *E. coli*. Вероятно, это связано с разложением и/или трансформацией под действием ферментов.

Пример 14 – Тестирование наличия вторичных метаболитов в ферментных препаратах E40 и последующих промежуточных продуктах

Для оценки безопасности решающее значение имеет поиск вторичных метаболитов, продуцируемых *S. lividans* ТК24. Следовательно, требуется дозирование потенциально идентифицированных молекул в супернатант ферментации, а также в изготовленный продукт. Для количественного определения выбрали ВЭЖХ/МС, как лучшую методику для оценки наличия АСТ, UDP и даптомицина (DAP, относящегося к классу CDA). Применяли экстракцию антибиотиков с помощью твердофазных методик (твердофазная экстракция, SPE) с использованием смолы Diaion HP-20 (стирол-дивинилбензол), что позволило улучшить количественный анализ. Diaion HP-20 обычно используется для экстракции малых молекул, таких как вторичные метаболиты, пигменты и т. д., с широким диапазоном полярности. Обычно смолу приводят в контакт с водным раствором в соотношении 1:20 по объему в течение 2 часов, затем переносят в колонку, промывают и элюируют возрастающим градиентом метанола в воде. Элюированные экстракты высушивают и затем анализируют методом ВЭЖХ/МС. Использовали колонку, более подходящую для малых молекул и метаболитов (Phenomenex Luna C18, 5 мкм, 2,1×250 мм). Собирают фракции E1 (50% метанол), E2 (100% метанол) и E3 (метанол/изопропанол 90:10). Даптомицин элюируется в E1 и E2, в то время как ундецилпродигиозин (UDP) элюируется в E2 и E3. Выделение даптомицина является количественным, в то время как UDP, как правило, прочно связывается со смолами, фильтрами и мембранами, поэтому выделение было частичным (20-25%).

Поскольку апрамицин не связывается с НР-20, для апрамицина применяли альтернативный метод экстракции. Тестировали слабую катионную смолу Amberlite IRC 50 в форме NH₄ и выявили, что она количественно связывает апрамицин на одном этапе прохождения колонки. Затем полное выделение было достигнуто путем элюирования 0,1 М гидроксидом аммония.

Для экстрагированных образцов по умолчанию использовали колонку для ВЭЖХ Luna C18 с градиентом фазы В от 5 до 90% в течение 30 мин при скорости потока 1,0 мл/мин.

Заключительные тесты с использованием 50 мг ферментных препаратов Е40 в виде порошка (партии F-30, F-34, F-35) были завершены и дали следующие результаты (Таблица 10):

ПОРОШКИ Е40 СОГЛАСНО SPE	АНАЛИЗИРУЕМАЯ ФРАКЦИЯ	ПРЕДЕЛ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ (нг)	МИН. М.Д. (мг/кг)*	F-30	F-34	F-35
АПРАМИЦИН	FT	17,5	0,875	<мин. М.Д.	<мин. М.Д.	<мин. М.Д.
UDP	E2 + E3	0,1	0,005	<мин. М.Д.	<мин. М.Д.	<мин. М.Д.
ДАПТОМИЦИН	E1 + E2	0,6	0,03	<мин. М.Д.	<мин. М.Д.	<мин. М.Д.

Таблица 10 (* на основе анализа 20 мг готового порошка)

Эти данные подтверждают, что ни один из проанализированных антибиотиков не может быть обнаружен в измеримых количествах ни в одной из трех партий порошка ферментного препарата Е40.

Детектирование этих же антибиотиков в ферментационной культуре и на дальнейших последующих этапах очистки контролировали с применением этой методологии. С этой целью устанавливали ферментационную культуру, названную F-46. Ферментационную культуру подвергали следующим этапам очистки в соответствии с предпочтительным вариантом реализации способа согласно настоящему изобретению:

1. Центрифугирование (30' при 17664 g) для выделения образца НV-супернатант
2. Очистка (капсулы Opticар PES с номинальным размером 1,0 и 0,5 мкм)
3. Концентрация TFF1 (с кассетой из регенерированной целлюлозы с отсечением 10 кДа)
4. Аффинная хроматография на основе IMAC Ni
5. Депигментация с помощью ионного обмена на смоле DEAE
6. Концентрация и диафильтрация TFF2 (отсечение 10 кДа)

7. Лиофилизация после добавления вспомогательных веществ с получением готового порошка.

Образцы с каждого этапа анализировали с помощью ВЭЖХ-МС для обнаружения указанных выше антибиотиков по молекулярной массе. Впрыскивали небольшие объемы (12,5 микролитра). В измеримых количествах обнаружили только UDP. Не было детектировано никаких следов других соединений.

Концентрацию ундецилпродигозина (UDP) на каждом этапе количественно определяли с помощью ВЭЖХ-МС (Таблица 11). Как и ожидалось, UDP успешно удаляется во время последующего технологического процесса:

UDP в образцах F-46	ОБЪЕМ МЛ	КОНЦ. нг/мл	ВСЕГО мкг	% ОСТАТК А	ПОЭТАПНОЕ УДАЛЕНИЕ %
1-НВ-супернатант	11260	116,47	1311,50	100,00	-
2-очищенный с Opticar	10500	56,34	591,52	45,10	54,90
3a-TFF1 концентрат	1080	461,46	498,37	38,00	15,75
3b-TFF1 фильтрат	8040	2,04	16,42	1,25	-
4a-ИМАС-элюированный E1 pH 6,3	270	17,73	4,79	0,37	99,04
4b-ИМАС проточная фракция	1080	818,10	883,55	67,37	-
5-DEAE депигментация	254	6,72	1,71	0,13	64,34
6-TFF2 диафильтрация	61	1,31	0,08	0,01	95,32

Таблица 11

В заключение, порошки ферментного препарата, содержащего E40, полученные с

помощью способа согласно настоящему изобретению, не содержат измеримых количеств антибиотиков.

Пример 15

Выполняли две новые ферментации объемом 15 л в соответствии с настоящим изобретением, начиная с посевной культуры в колбах, инкубированных в течение 5 примерно 42 часов. Две культуры, названные F47 и F48, собирали после 99 и 94 часов в условиях ферментации, соответственно. Собранные культуры подвергали центрифугированию (Beckmann J-2-21; ротор JA-10; 10000 об./мин/17700g, 15 мин) и фильтрации на бумаге, после чего супернатант подвергали микрофильтрации (этап 10 очистки) в три последовательных этапа (начиная с фильтрации через фильтр с размером пор 1 мкм, до фильтрации через фильтр с размером пор 0,3 мкм). Затем применяли ультрафильтрацию (TFF1) очищенного раствора с последующей ИМАС-никелевой аффинной хроматографией фильтратов после ультрафильтрации, выполненной с использованием смолы Ni Sepharose 6 FastFlow (GE Healthcare), как описано выше. Затем 15 следовал необязательный этап анионообменной депигментационной хроматографии с DEAE: элюированные фракции после ИМАС доводили до pH 6,3 муравьиной кислотой, переносили в колонку DEAE Sepharose CL-6B, уравновешенную 20 mM формиатом аммония, pH 6,3, и собирали гравиметрическим методом. Устанавливали систему ультрафильтрации для меньших объемов (TFF2-диафильтрация) (номинальный предел 20 молекулярной массы: 10 кДа) для ультрафильтрации элюированной фракции с DEAE, затем порциями добавляли обессоливающий раствор, приготовленный на основе 10 mM формиата аммония, pH 6,3, для удаления оставшегося имидазола. Раствор может стать мутным, что потребует центрифугирования для удаления осадка. Удаленное твердое вещество не включает рекомбинантную E40. Этого можно избежать, сохраняя раствор 25 более разбавленным на этом этапе. К полученному готовому раствору TFF2 добавляли раствор маннита и трегалозы в соотношении 3:1, что соответствует 8 микрограммам общего сахара на ед. акт., а затем сублимировали.

Выход готового порошка составил 1437 мг. Образец готового порошка растворяли в концентрации 10 мг/мл в 20% водном растворе EtOH и проверяли на ферментативную 30 активность и содержание белка, а затем подвергали SDS-PAGE.

ВСА-анализ общего содержания белка дал примерно 14% в готовом порошке партии (100%, если исключить добавленные сахара).

Продукция E40 составляет примерно 25 мг/л супернатанта (примерно 20 мг/л ферментационного объема).

35 Микробиологическую активность указанных препаратов тестировали в более

высокой концентрации 5 мг/мл (исходный раствор 10 мг/мл в dH₂O) и после двукратных последовательных разведений. Активность порошка, полученного из F47/F48, показана в Таблице 12: активность не была обнаружена при самой высокой концентрации, протестированной против любого из проанализированных тестовых микроорганизмов.

	МИС (минимальная ингибирующая концентрация; мг/мл)								
	<i>S. aureus</i> ATCC6538			<i>E. coli</i> L47			<i>C. albicans</i> L145		
Повтор образца	№1	№2	№3	№1	№2	№3	№1	№2	№3
Порошок F47/48	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>5

5 Таблица 12

Этот результат подтверждает, что готовый препарат E40 не содержит детектируемых антибиотиков.

Пример 16

10 Рекомбинантные клетки-хозяева *S. lividans* ТК24/pIJ86/e40 из Примера 2 инокулировали в колбы Эрленмейера (500 мл), содержащие 100 мл среды V (как описано выше) с добавлением 50 мг/л апрамицина, и инкубировали на ротационном шейкере при 200 об./мин при 30°C. Через 4 дня роста культуру использовали для инокуляции трех колб Эрленмейера (500 мл), содержащих 100 мл среды P, как описано выше, содержащей сахарозу при 340 г/л (suc 34) или 170 г/л (suc 17) или не содержащей сахарозы (suc 0),
 15 соответственно. Во все колбы добавляли 50 мг/л апрамицина и инкубировали на ротационном шейкере при 200 об./мин при 30°C до 7 дней. Продукцию E40 контролировали один раз в день после 120 ч ферментации путем измерения ферментативной активности культуральных супернатантов, полученных путем центрифугирования при 16000 g в течение 6 мин. Протеолитическую активность образцов
 20 супернатантов, разведенных 1:81 в буфере для анализа непосредственно перед тестированием, оценивали в лунках микропланшета для титрования по отношению к флуорогенному субстрату suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC (Wachem L-1465; 200 мкМ) в реакционном буфере, содержащем 0,1 М цитрата и 0,2 М фосфата, pH 5 (20 мкл образца в 200 мкл общего реакционного объема). Инкубацию выполняли при 37°C в течение 30
 25 минут. Высвобожденный AMC измеряли с помощью считывающего устройства для микропланшетов Fusion (Perkin Elmer Italia SpA, Монца, Италия) при длине волны возбуждения 360 нм и длине волны испускания 460 нм. Протеолитическую активность определяли как линейное увеличение относительных единиц флуоресценции, продуцируемой с течением времени (ОЕФ/мин), в интервале времени 0-15 минут.
 30 Результаты показаны на Фигуре 10.

Значительное влияние на продукцию E40 оказывает наличие сахарозы в среде,

используемой для ферментации, как показано на Фигуре 10, панели А-С. Протеолитическая активность наблюдается в культурах, выращенных в среде Р с 34% сахарозы, в то время как в среде без сахарозы она по существу отсутствует. В присутствии 17% сахарозы активность является низкой даже после 168 часов ферментации. Результаты приведены для каждого образца в таблице 13 (относительные единицы флуоресценции выражены в минуту на 1 мл супернатанта (ОЕФ/мин/мл) в интервале инкубации 0-15 минут).

Интервал 0-15' ОЕФ/мин/мл	Время ферментации (часы)		
	120	144	168
Suc0	0	0	183
Suc17	47	145	763
Suc34	2583	4085	5353

Таблица 13

Пример 17

В качестве хозяина для гетерологичной экспрессии E40 использовали типовой штамм *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) X4004-3A. Конструировали два разных синтетических гена E40, отличающихся наличием или отсутствием последовательности, кодирующей профермент; в обоих генах нативную сигнальную секреторную последовательность E40 заменяли модифицированной препролидерной последовательностью α -фактора²⁰. Кроме того, в обоих синтетических генах использование кодонов оптимизировали в соответствии с таковым для *S. cerevisiae* с использованием программного обеспечения Codon Optimization Tool. Также к обоим генам добавляли последовательности, соответствующие сайтам рестрикции XbaI и HindIII. Полученные гены, один, кодирующий неактивный предшественник (proE40, SEQ ID NO: 13), а другой, кодирующий зрелый фермент (matE40, SEQ ID NO: 14), клонировали либо в плазмиду для индуцируемой экспрессии pEMBL, либо в плазмиду для конститутивной экспрессии pVT-U, обе несут ген URA3 для ауксотрофной селекции в *S. cerevisiae*^{19,21}, а затем вводили в клетки ElectroMAX DH10B *E. coli* методом электропорации. Трансформантов отбирали на чашках с LB-агаром, содержащим ампициллин (100 мкг/мл), и инкубировали в течение ночи при 37°C. Правильность конструкций подтверждали секвенированием. Трансформантов отбирали на чашках с LB-агаром, содержащим ампициллин (100 мкг/мл), и инкубировали в течение ночи при 37°C. Плазмиды pEMBL/E40 и pVT-U/E40 переносили в штамм-хозяина *S. cerevisiae* X4004-3A с использованием метода с ацетатом лития (Elble, 1992). Клетки высевали на селективные чашки (среда без уридина) и инкубировали при 30°C в течение 5-6 дней.

Одну колонию из клонов *S. cerevisiae*, содержащих гены E40, собирали с селективной чашки, инокулировали в 100 мл минимальной среды (0,68% основы с источником азота для дрожжей, YNB, 2% глюкозы, 50 мг/л аминокислоты L-Lys-L-Met-L-Trp, 67 мМ фосфата калия, pH 6,0) в течение 3 дней при 30°C.

5 Отбирали аликвоту клеток и инокулировали в конечный объем 50 мл минимальной среды в колбе на 500 мл, начиная с OD₆₀₀ нм = 0,25. Инкубацию продолжали до тех пор, пока OD₆₀₀ нм не достигала значения 0,5 (6 часов), затем 8 мл инокулировали в колбу на 500 мл, содержащую 72 мл экспрессионной среды (10 г/л дрожжевого экстракта, 20 г/л пептона и 2% глюкозы для плазмиды pVT-U/E40 или 2% галактозы для плазмиды с индуцируемой экспрессией pEMBL/E40) в течение 10 дней. Для исследований экспрессии белка клетки выращивали при 30°C и собирали в разное время.

Экспрессию рекомбинантной E40 проверяли в культуральных супернатантах с помощью анализа активности с использованием синтетического субстрата suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA по поглощению при 410 нм в ходе инкубации при pH 5 и 37°C. Ферментативную активность выражали в единицах поглощения (ед.погл.) в минуту на мл. Максимальную активность детектировали в супернатанте клеток, трансформированных плазмидой pVT-U/matE40 и выращенных в течение 6 дней: показано значение 0,9 ед.погл./мин/мл. Выполняли параллельное исследование ферментации *S. cerevisiae*, трансформированных четырьмя конструкциями, что привело к сходным уровням экспрессии (0,73 Дед.погл. мин⁻¹ мл⁻¹). На основании этих результатов выполняли анализ методом Вестерн-блоттинга супернатантов клеток, трансформированных плазмидами pVT-U/matE40 и pEMBL/matE40, собранных в разное время. Анализ методом Вестерн-блоттинга показал, что при использовании плазмиды pEMBL-matE40 белок экспрессировался через 6 дней роста; для плазмиды pVT-U/matE40 экспрессию белка детектировали через 3 дня.

Таким образом, *S. cerevisiae* можно использовать в качестве рекомбинантного продуцента E40. Однако полученная умеренная экспрессия рекомбинантной E40 (менее 1 мг E40 на мл супернатанта) в настоящее время делает эту продуцирующую систему непригодной для промышленного использования.

30 В заключение, рекомбинантная экспрессия E40 в клетках-хозяевах *S. lividans* в соответствии со способом согласно настоящему изобретению приводит к секреции активной E40. Все физико-химические характеристики и биологические свойства нативной формы *Actinoallomurus* A8 поддерживаются рекомбинантной глютеназой, например, стабильность и активность при постпрандиальных желудочных pH, 35 устойчивость к расщеплению пепсином, высокая эффективность в интенсивном

разрушении наиболее иммуногенного пептида α -глиадина, такого как обогащенный Pro-Gln 33-членный пептид (SEQ ID NO: 12), а также цельных белков глиадина.

Ферментный препарат, полученный с помощью способа согласно настоящему изобретению, таким образом, обеспечивает большие количества активной рекомбинантной E40 и, кроме того, по существу не содержит антибиотиков, по этой причине он подходит для применения у человека, предпочтительно после надлежащего изготовления в виде фармацевтического состава или пищевой добавки.

Пример 18

Синтетический ген, кодирующий E40 в ее нативной зрелой форме (matE40, SEQ ID NO: 14), клонировали в вектор экспрессии для успешной секреции в дрожжах *Pichia pastoris*, несущий варианты промотора AOX1 для индуцированной метанолом экспрессии (*mut^S*) и препропоследовательность, без повторов Glu-Ala (EAEA), альфа-фактора спаривания из *Saccharomyces cerevisiae* для направления секреции в культуральную среду. В векторе также присутствовал ген устойчивости к зеоцину в качестве маркера селекции. Правильную вставку целевого гена в вектор экспрессии проверяли с помощью анализа рестрикционного профиля, а подлинность генных последовательностей подтверждали секвенированием (LGC Genomics, Берлин, Германия). Очищенную плазмиду в концентрации примерно 1 мкг/мкл использовали для трансформации в штаммы *mut^S* и *mut^S-PDI* (избыточно продуцирующий протеиндисульфидизомеразу) *P. pastoris*, причем последний из них использовали для облегчения правильной укладки белка. Несколько отдельных колоний на штамм (2 штамма *mut^S* и 2 штамма *mut^S-PDI*, несущих вектор, экспрессирующий E40, и соответствующие имитационные штаммы *mut^S* и *mut^S-PDI*) собирали и инокулировали в отдельные лунки планшетов с 96 глубокими лунками, заполненные комплексной средой для культивирования. Оценку продукции выполняли в условиях индукции метанолом с использованием четырех различных условий:

- Комплексная среда при pH 6,0
- Комплексная среда при pH 6,0 с добавлением сахарозы (34% конечное содержание)
- Комплексная среда при pH 7,0
- Комплексная среда при pH 7,0 с добавлением сахарозы (34% конечное содержание)

После начальной фазы роста для получения биомассы экспрессию индуцировали добавлением оптимизированной жидкой смеси, содержащей определенную концентрацию метанола. В это время контрольный образец, состоящий из очищенной E40 в качестве референсного материала, добавляли в известной концентрации в несколько лунок, содержащих имитационные штаммы, в конечной концентрации 200 мкг/мл. В определенные моменты времени выполняли дальнейшую индукцию метанолом.

Контроль	5,8	5,3	5,5	5,5	5,8	5,4	6	5,8
----------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	-----

Таблица 14**Пример 19**

Клетки-хозяева *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) трансформировали рекомбинантной плазмидой для экспрессии рЕТ28b, несущей последовательность E40, как сообщается в WO2013083338. Продукцию E40 трансформированными клетками индуцировали добавлением 0,2 мкМ изопропил- β -D-тиогалактозида (Sigma) и получали экспрессию целевого белка (см. фигуру 4 WO2013083338).

50 мл клеточной культуры *E. coli*, экспрессирующей рекомбинантную E40, подвергали лизису в соответствии с протоколом Invitrogen для нативного лизиса на основе активности лизоцима, как описано в WO2013083338; весь осадок из 50 мл культуры ресуспендировали в 8 мл буферного раствора для лизиса. Протеолитическую активность неочищенного экстракта, полученного после лизиса, тестировали на субстрате сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-АМС (буфер на основе 50 мМ ацетата аммония, рН; 37°C). Активность выраженная в ОЕФ, продуцируемых в минуту 1 мл культуры *E. coli*, продуцирующей E40, показана на фиг. 12. Активность E40, продуцируемой в *E. coli*, очень низкая по сравнению с активностью, полученной для E40, продуцируемой в *S. lividans*, в условиях в соответствии с настоящим изобретением (54 ОЕФ/мин/мл для *E. coli* по сравнению с >5300 ОЕФ/мин/мл с *S. lividans*; см. фиг. 12).

Источники

1. Abadie, V., Sollid, L.M., Barreiro, L.B., Jabri, B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol.* **29**, 493-525 (2011).
- 5 2. Wieser, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* **24**,115-9 (2007).
3. Hausch, F., Shan, L., Santiago, N. A., Gray, G. M., Khosla, C. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **283**, G996–1003 (2002).
- 10 4. Gianfrani, C., Camarca, A., Mazzarella, G., Di Stasio, L., Giardullo, N., Ferranti, P., Picariello, G., Rotondi Aufiero, V., Picascia, S., Troncone, R., Pogna, N., Auricchio, S., Mamone, G. Extensive *in vitro* gastrointestinal digestion markedly reduces the immune-toxicity of Triticum monococcum wheat: implication for celiac disease. *Mol. Nutr. Food Res.* **59**,1844-54 (2015).
- 15 5. Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L. M., Khosla, C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* **297**, 2275–2279 (2002).
6. Kupper, C. Dietary guidelines and implementation for celiac disease. *Gastroenterology* **128**, S121-7 (2005).
- 20 7. Ribeiro, M., Nunes, F.M., Rodriguez-Quijano, M., Carrillo, J.M., Branlard, G., Igrejas, G. Next-generation therapies for celiac disease: The gluten-targeted approaches. *Trends in Food Science & Technology*, **5**, 56-71 (2018).
8. Dressman, J.B., Berardi, R.R., Dermentzoglou, L.C., Russell, T.L., Schmaltz, S.P., Barnett, J.L., Jarvenpaa, K.M. Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharm. Res.* **7**, 756-61 (1990).
- 25 9. Gardner, J.D., Ciociola, A.A., Robinson M. Measurement of meal-stimulated gastric acid secretion by in vivo gastric autotitration. *J. Appl. Physiol.* **92**, 427-34 (2002).
10. Morón, B., Cebolla, A., Manyani, H., Alvarez-Maqueda, M., Megías, M., Thomas Mdel, C., López, M.C., Sousa, C. Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 405-14 (2008).
- 30 11. Sollid, L.M., Qiao, S.W., Anderson, R.P., Gianfrani, C., Koning, F. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics* **64**, 455-60 (2012).
- 35 12. Anné, J., Vrancken, K., Van Mellaert, L., Van Impe, J., & Bernaerts, K. Protein secretion biotechnology in Gram-positive bacteria with special emphasis on *Streptomyces*

lividans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1843(8), 1750–1761 (2014).

13. Kieliszek, M., & Misiewicz, A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica*. **59**, 241–250 (2013).

5 14. Flett, F., Mersinias, V., Smith, C. P. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* **155**, 223–229 (1997).

15. Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M. J., Chater, K. F., Hopwood, D. A. *Practical Streptomyces in Genetics*, (John Innes Foundation, 2000).

10 16. Jena, S., Suryanarayanan, R., Aksan, A.I Mutual Influence of Mannitol and Trehalose on Crystallization Behavior in Frozen Solutions. *Pharm Res.* **33**, 1413-25 (2016).

17. Kriegler M. “Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual” Stockton Press, NY, 1990.

15 18. Christian Rückert, Andreas Albersmeier, Tobias Busche, Sebastian Jaenicke, Anika Winkler, Ólafur H. Friðjónsson, Guðmundur Óli Hreggviðsson, Christophe Lambert, Daniel Badcock, Kristel Bernaerts, Jozef Anne, Anastassios Economou, Jörn Kalinowski “Complete genome sequence of *Streptomyces lividans* TK24” *Journal of Biotechnology*, 2015 (Volume 199, Pages 21-22)

20 19. Cesarini G, Murray JAH. Plasmid vectors carrying the replication origin of filamentous single-stranded phages. In: Setlow JK, editor. *Genetic engineering, principles and methods*. New York: Plenum Press, 1987, pp. 135-154.

20. Tonin F, Melis R, Cordes A, Sanchez-Amat A, Pollegioni L, Rosini E. Comparison of different microbial laccases as tools for industrial uses. *N Biotechnol*, 2016, 33: 387-398.

25 21. Vernet T, Dignard D, Thomas DY. A family of yeast expression vectors containing the phage f1 intergenic region. *Gene*, 1987, 52: 225-233.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения ферментного препарата, содержащего по меньшей мере одну рекомбинантную эндопептидазу *Actinoallomurus*, обладающую глютеназной активностью, предпочтительно в ее зрелой форме, предпочтительно выбранную из группы, состоящей из:

эндопептидазы 40 (E40), имеющей последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1; биологически активного фрагмента E40; встречающегося в природе аллельного варианта E40; и эндопептидазы, имеющей последовательность, которая по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90% или 95% идентична SEQ ID NO: 1;

причем указанный способ последовательно включает:

а) культивирование рекомбинантной клетки-хозяина *Streptomyces lividans*, предпочтительно штамма ТК24, в культуральной среде в условиях ферментации, причем указанная рекомбинантная клетка-хозяин содержит рекомбинантный вектор экспрессии для гетерологичной экспрессии указанной по меньшей мере одной рекомбинантной эндопептидазы *Actinoallomurus*, при этом указанный рекомбинантный вектор экспрессии содержит полинуклеотид, кодирующий указанную по меньшей мере одну рекомбинантную эндопептидазу *Actinoallomurus*, функционально связанный с регуляторными последовательностями, способными управлять экспрессией указанной по меньшей мере одной рекомбинантной эндопептидазы *Actinoallomurus* в указанной рекомбинантной клетке-хозяине;

при этом указанная культуральная среда содержит по меньшей мере 30% (масс./об.) сахарозы;

б) выделение супернатанта указанной культуральной среды, содержащей указанную по меньшей мере одну рекомбинантную эндопептидазу *Actinoallomurus*; и

с) очистку из указанного супернатанта ферментного препарата, содержащего указанную по меньшей мере одну рекомбинантную эндопептидазу *Actinoallomurus*, при этом предпочтительно указанный очищенный ферментный препарат содержит зрелую форму E40, имеющей последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 1, более предпочтительно меченую гистидином E40, имеющую последовательность, содержащую или состоящую из SEQ ID NO: 2;

при этом предпочтительно указанный ферментный препарат представлен в форме порошка.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные условия ферментации включают культивирование указанной рекомбинантной клетки-хозяина при температуре, составляющей от 28°C до 30°C, предпочтительно примерно 30°C.

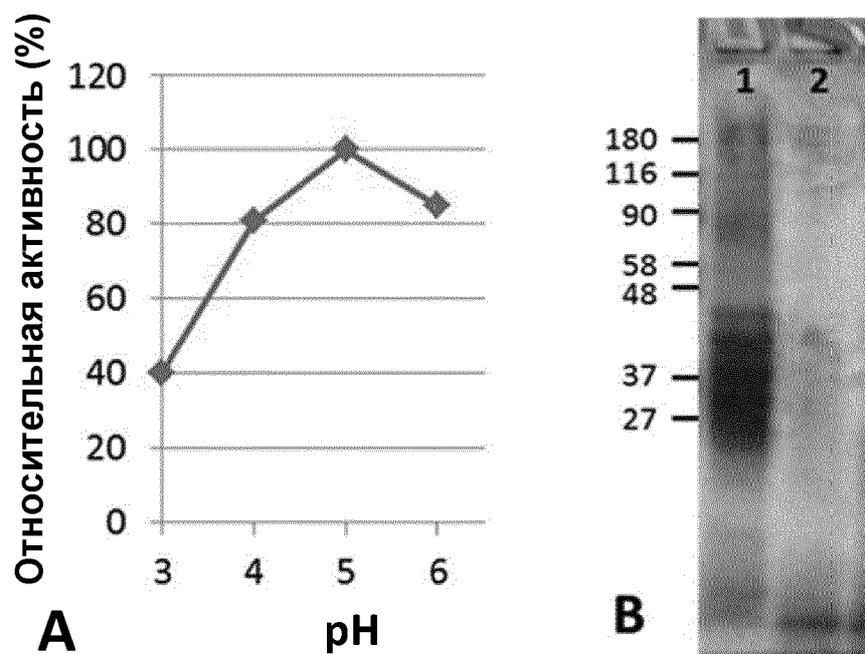
3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что на этапе b) культивирование в условиях ферментации проводят в течение по меньшей мере 48 часов, предпочтительно в течение по меньшей мере 72 часов.
4. Способ по пп. 1-3, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный вектор экспрессии содержит полинуклеотид, кодирующий E40, имеющую последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1, предпочтительно кодирующий E40, имеющую последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4; причем указанный полинуклеотид имеет последовательность SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, или последовательность, имеющую по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90% или 95% идентичности с SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, более предпочтительно указанный полинуклеотид имеет последовательность SEQ ID NO: 6, кодирующую меченую гистидином E40, имеющую последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2; при этом более предпочтительно указанный ферментный препарат, очищенный из указанного супернатанта культуральной среды, содержит зрелую форму меченой гистидином E40, при этом указанная зрелая форма имеет последовательность SEQ ID NO: 2.
5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанный рекомбинантный вектор экспрессии представляет собой рекомбинантный вектор pIJ86, при этом предпочтительно указанный рекомбинантный вектор экспрессии имеет последовательность SEQ ID NO: 8.
6. Ферментный препарат, полученный способом по любому из пп. 1-5.
7. Выделенная рекомбинантная эндопептидаза *Actinoallomurus*, обладающая глютеназной активностью, выделенная из супернатанта культуральной среды, выделенного на этапе c) по любому из пп. 1-5, или из ферментного препарата по п. 5; причем предпочтительно указанная выделенная рекомбинантная эндопептидаза *Actinoallomurus* выбрана из группы, состоящей из: эндопептидазы 40 (E40), имеющей последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1; биологически активного фрагмента E40; встречающегося в природе аллельного варианта E40; и эндопептидазы, имеющей последовательность, которая по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90% или 95% идентична SEQ ID NO: 1.
8. Рекомбинантный вектор экспрессии pIJ86, содержащий полипептид, имеющий последовательность, содержащую SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6, предпочтительно указанный рекомбинантный вектор экспрессии pIJ86 имеет последовательность SEQ ID NO: 8.
9. Рекомбинантная клетка-хозяин *Streptomyces lividans*, предпочтительно штамма ТК24, содержащая рекомбинантный вектор экспрессии по п. 8; предпочтительно

указанная рекомбинантная клетка-хозяин *Streptomyces lividans* относится к штамму DSM 33207.

10. Состав, содержащий в качестве активного протеолитического ингредиента ферментный препарат по п. 6 или выделенную рекомбинантную эндопептидазу *Actinoallomurus* по п. 7; предпочтительно указанный состав представляет собой пищевой продукт или пищевую добавку, или фармацевтический состав; более предпочтительно указанный состав представляет собой пищевую добавку или муку, которую привели в контакт с ферментным препаратом по п. 6 или с выделенной рекомбинантной эндопептидазой *Actinoallomurus* по п. 7.

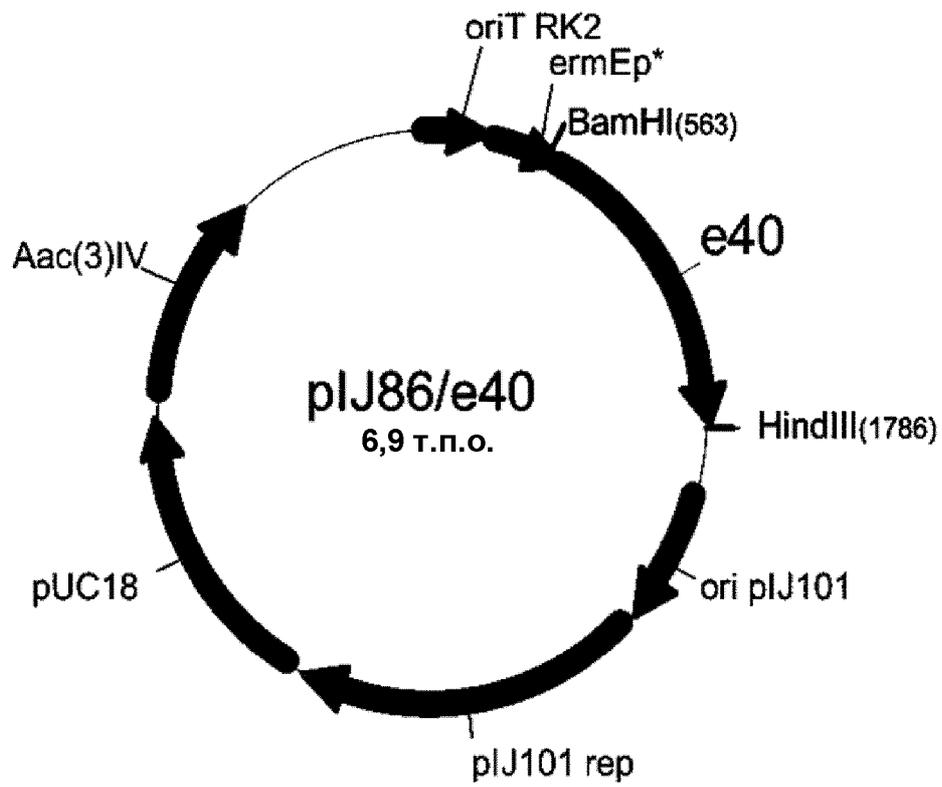
11. Ферментный препарат по п. 6 или выделенная рекомбинантная эндопептидаза *Actinoallomurus* по п. 7, или состав по п. 10 для применения в лечении и/или предотвращении целиакии или нарушения, ассоциированного с целиакией, или чувствительности к глютену, не связанной с целиакией, предпочтительно для применения в лечении и/или предотвращении любого нарушения, ассоциированного с непереносимостью пептида глиадина, имеющего последовательностью SEQ ID NO: 6, или для применения в лечении и/или предотвращении аллергии или непереносимости орехов и/или арахиса.

1/14



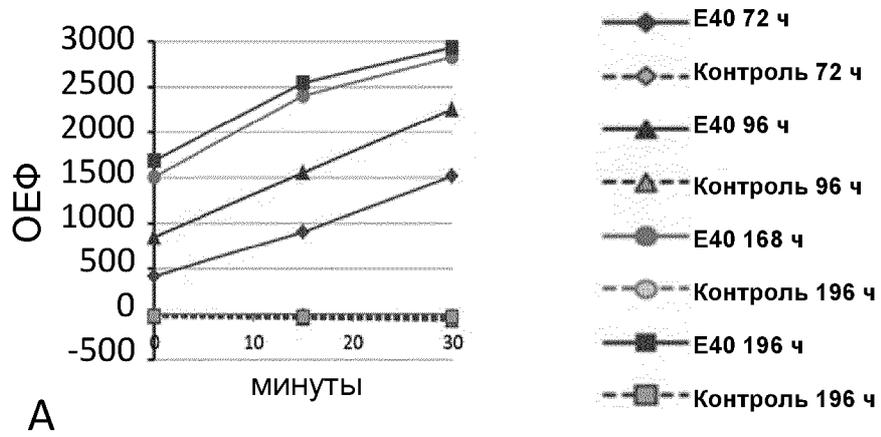
Фиг. 1

2/14

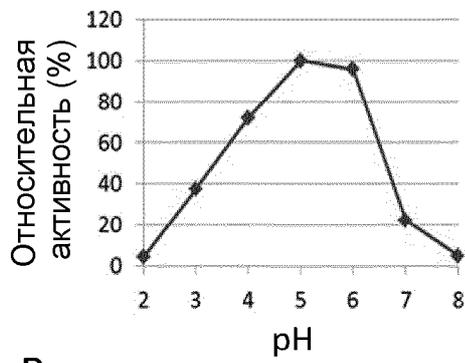


Фиг. 2

3/14



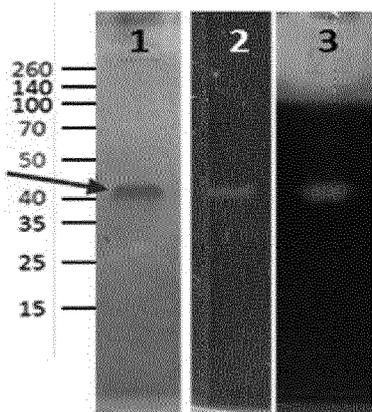
A



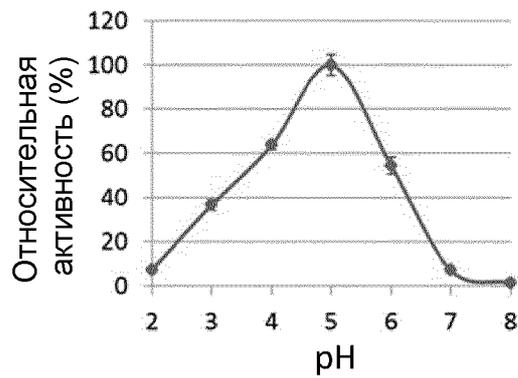
B



C



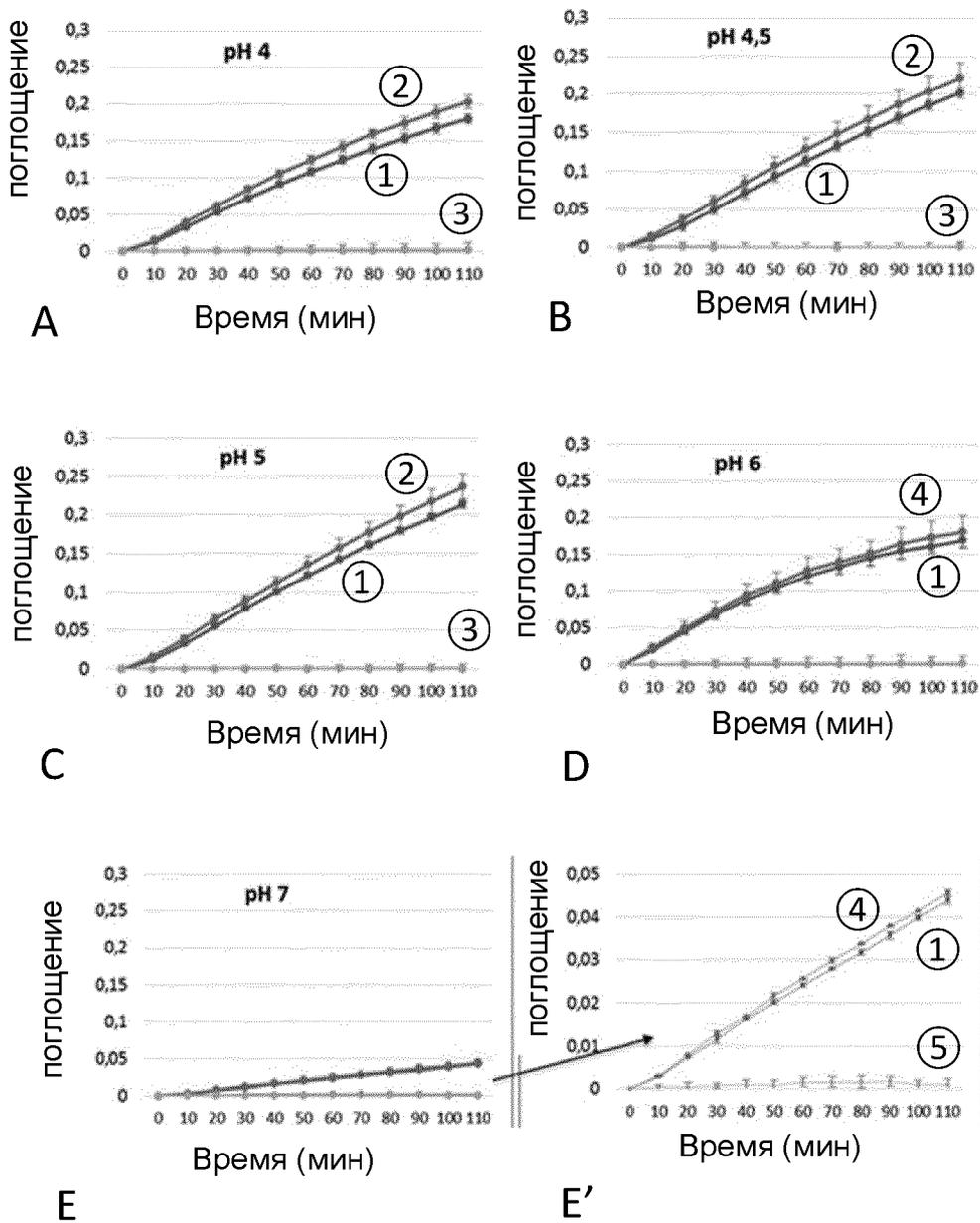
D



E

Фиг. 3

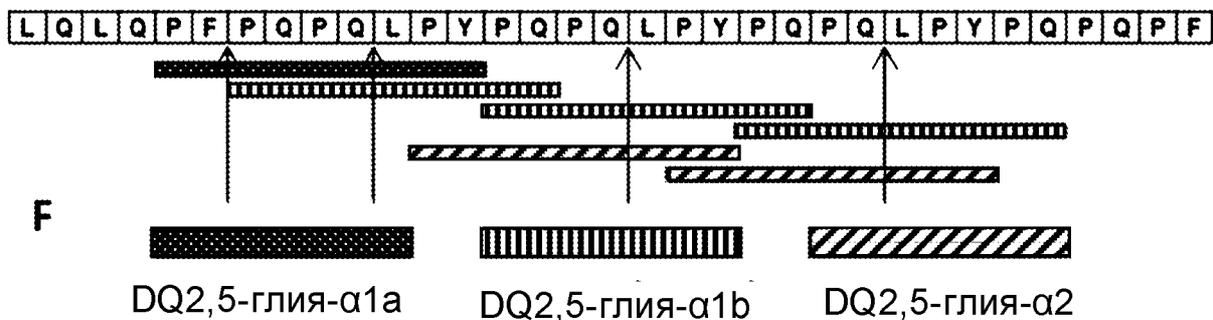
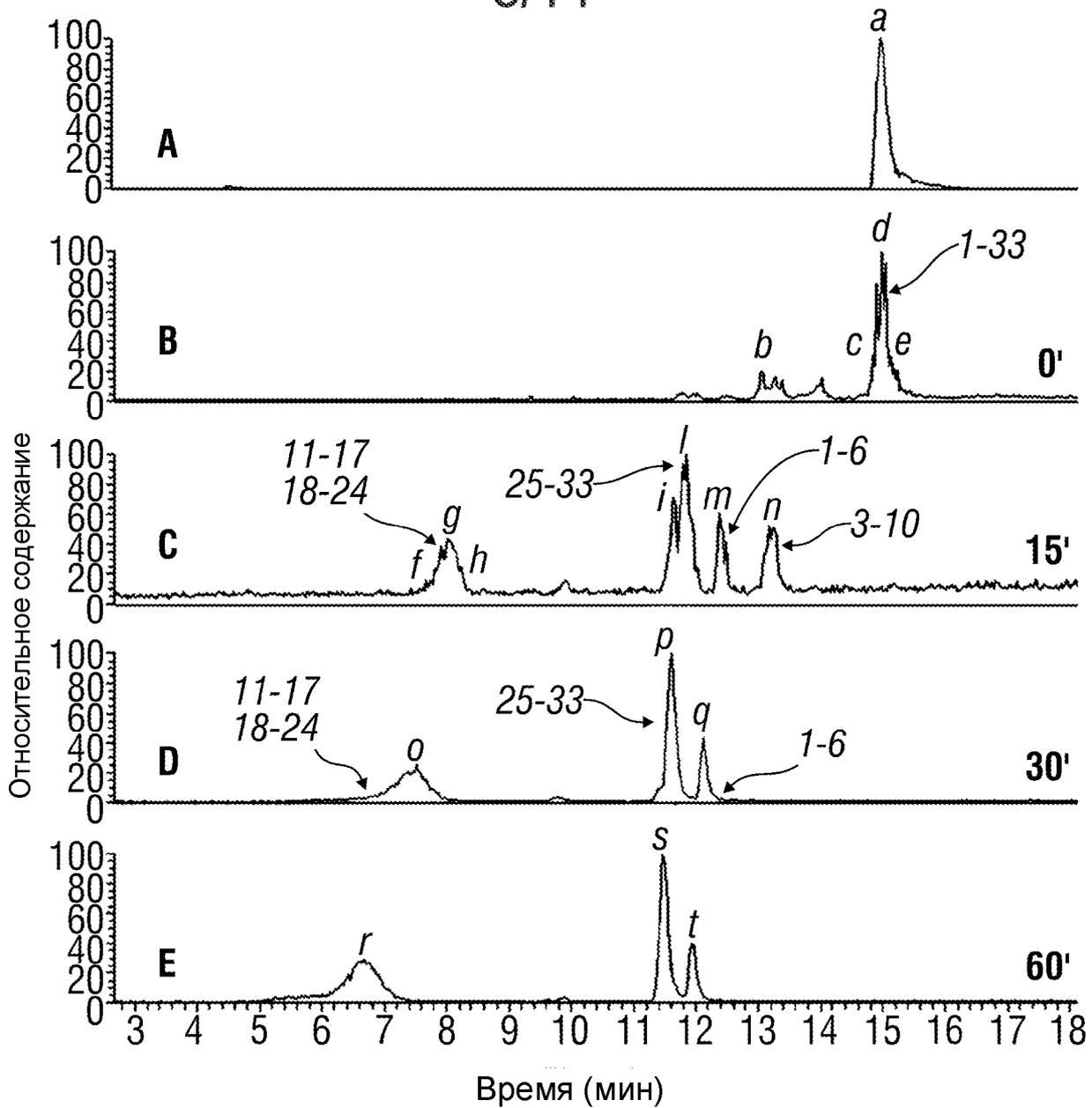
4/14



- ① E40
- ② E40 + Пепсин
- ③ Пепсин
- ④ E40 + Трипсин
- ⑤ Трипсин

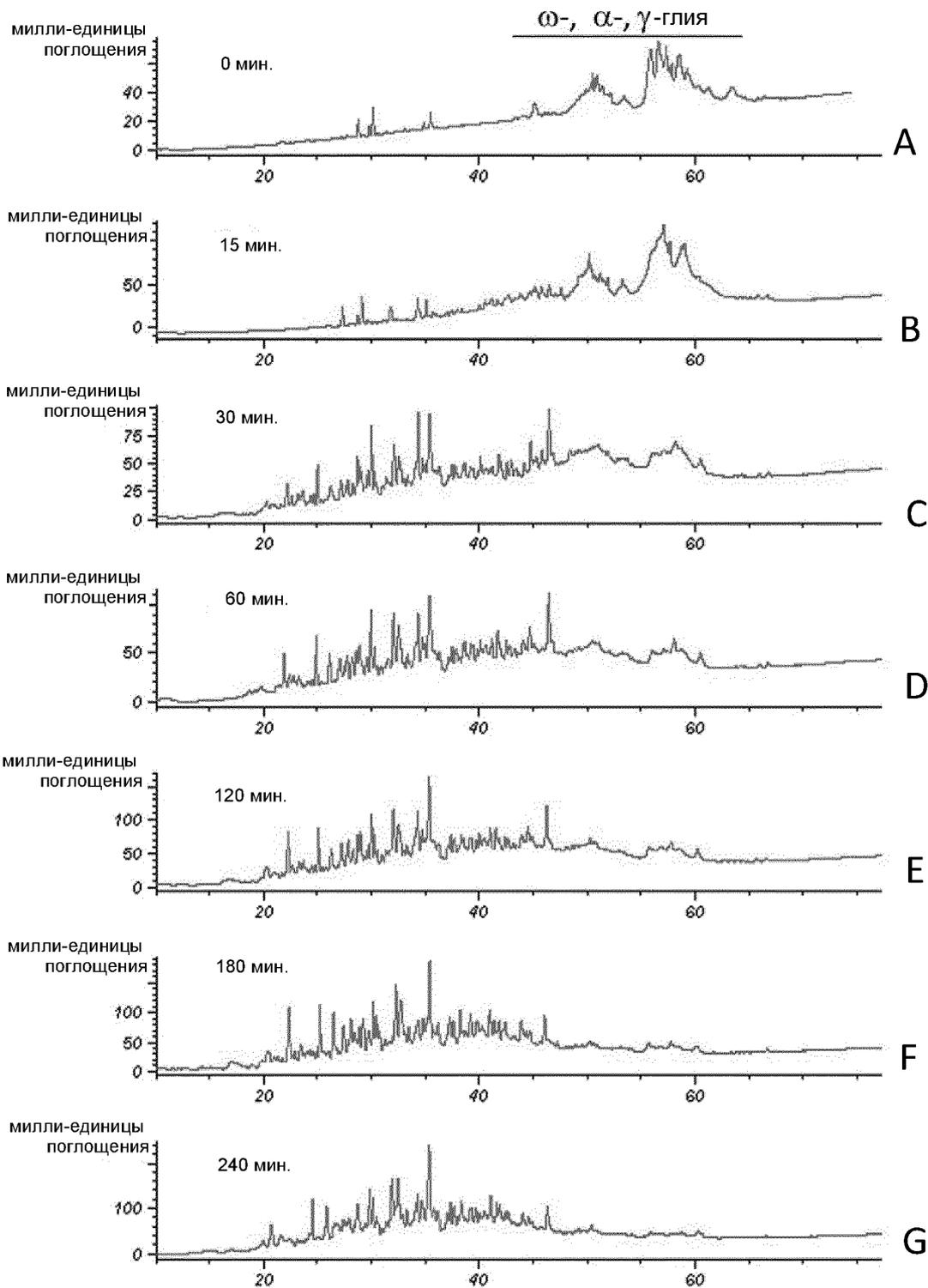
Фиг. 4

5/14



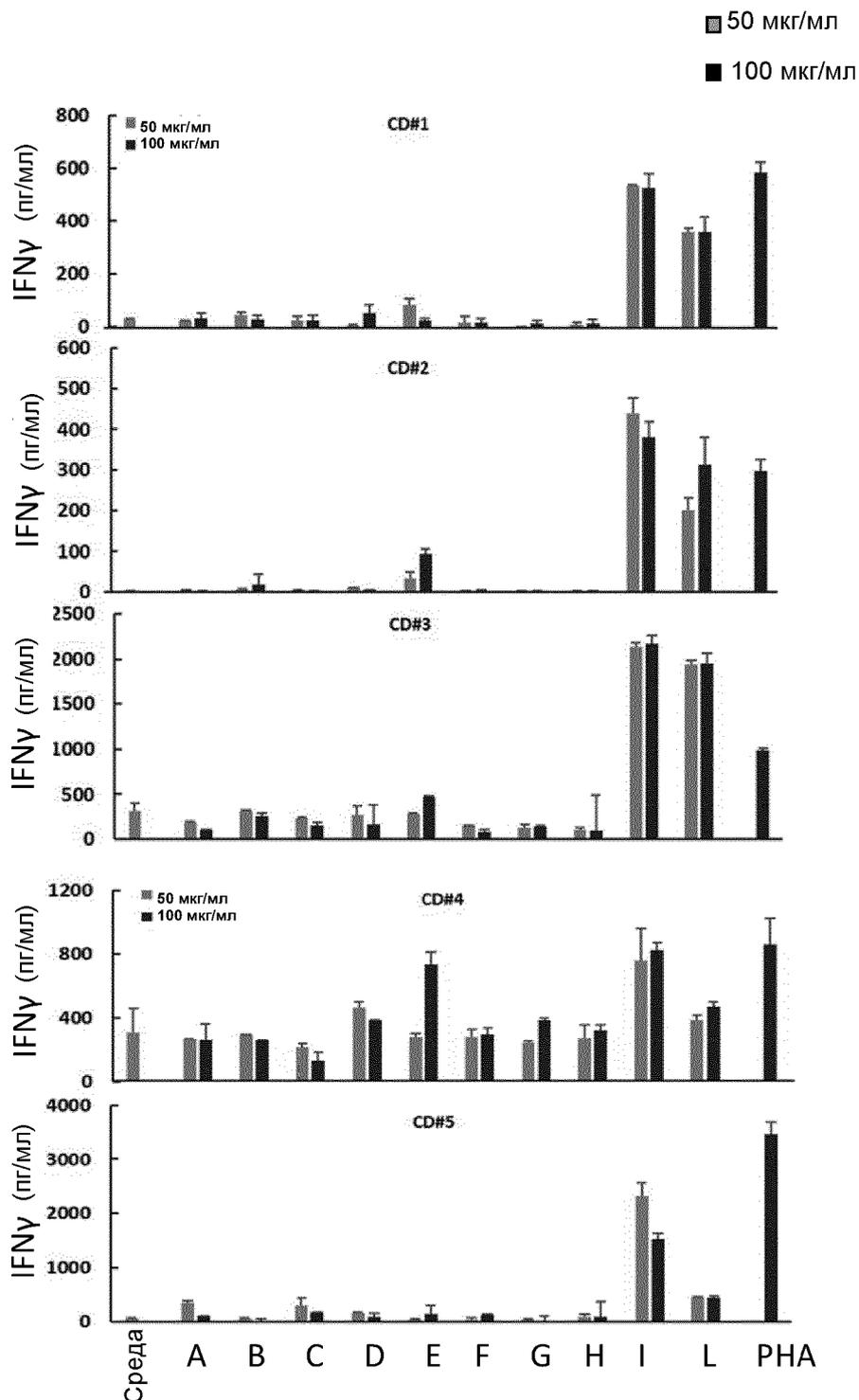
Фиг. 5

6/14



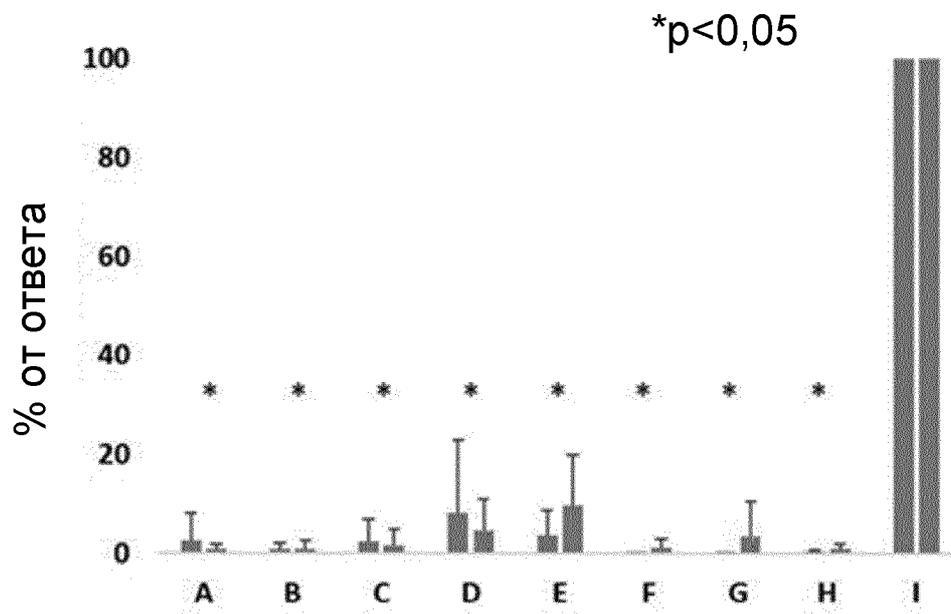
Фиг. 6

7/14



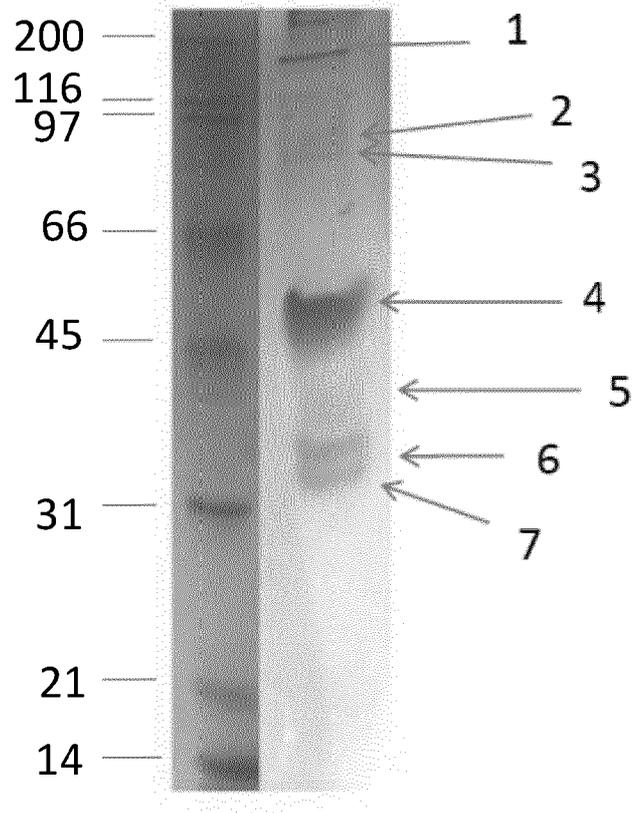
Фиг. 7А

8/14



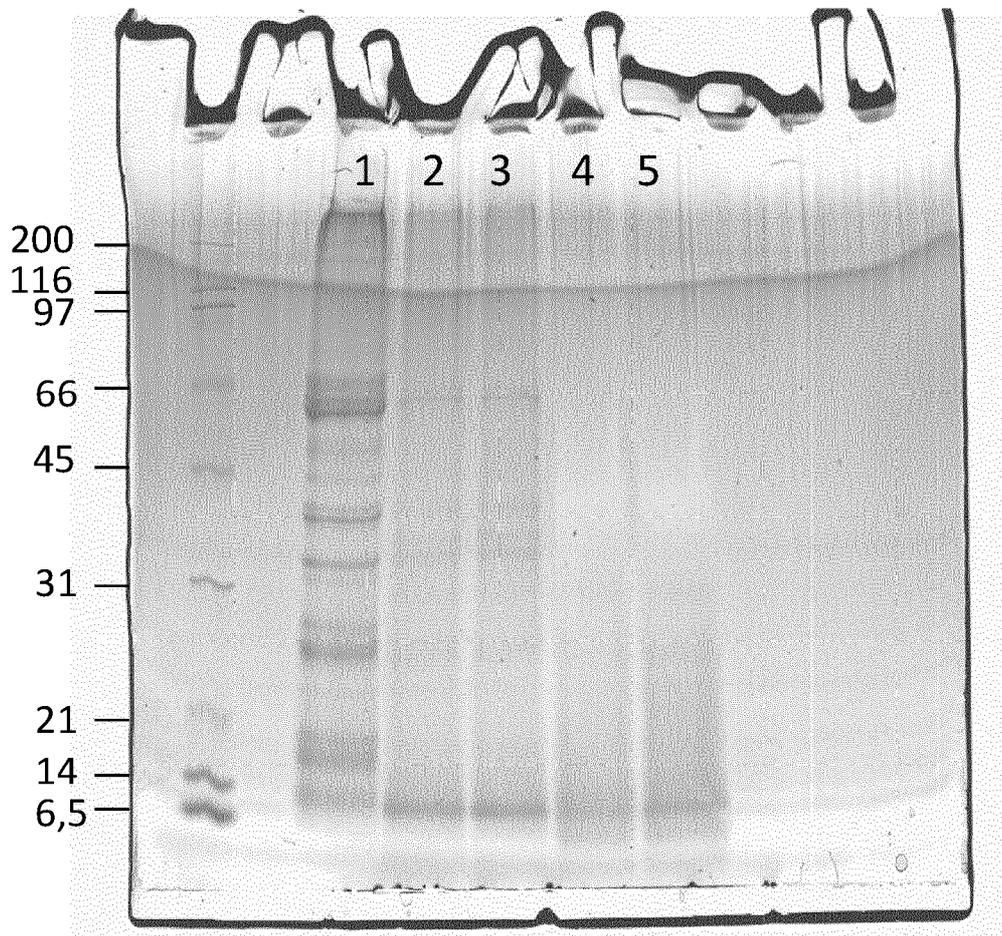
Фиг. 7В

9/14



Фиг. 8

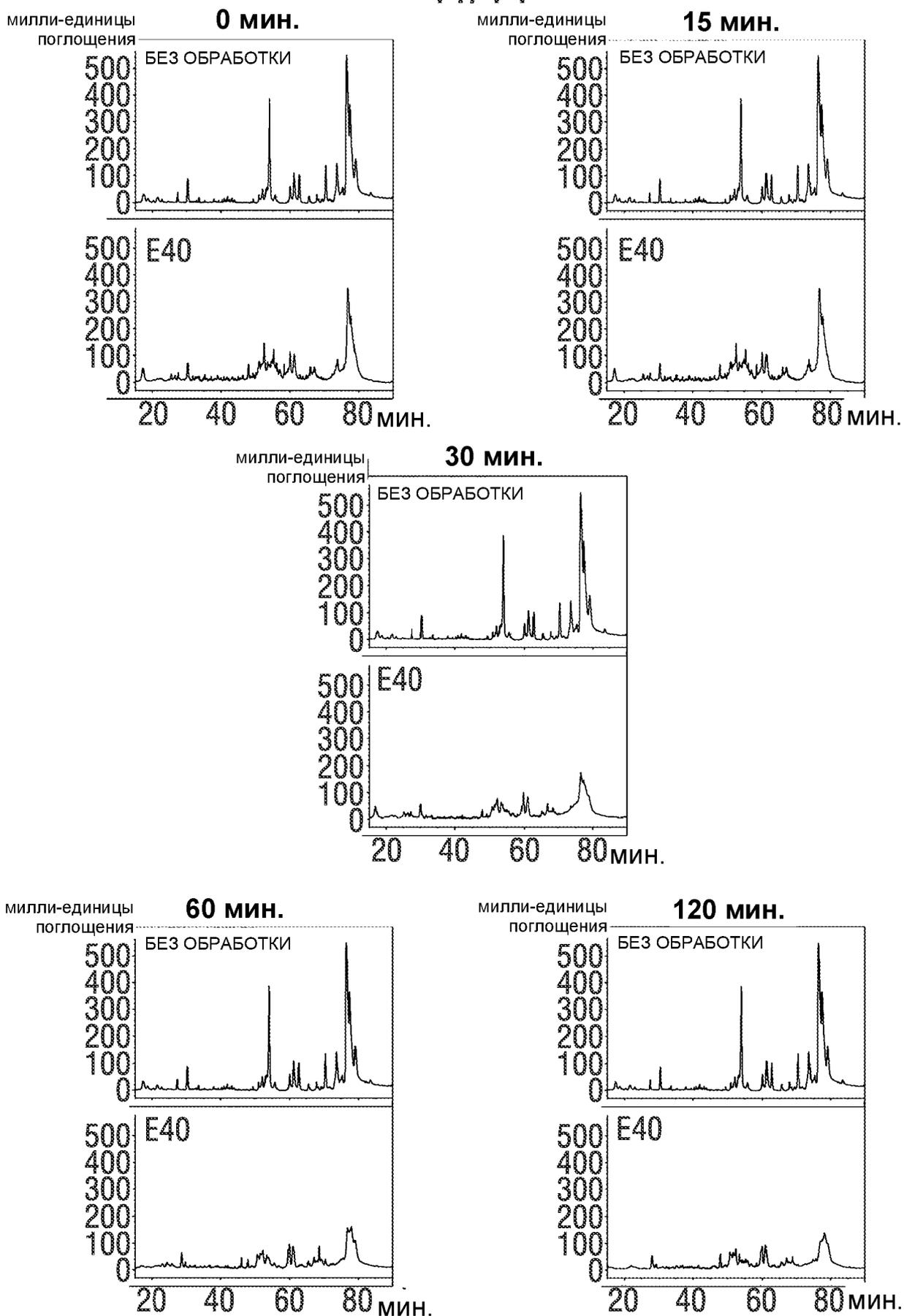
10/14



1=контроль
2=15 мин
3=30 мин
4=60 мин
5=120 мин

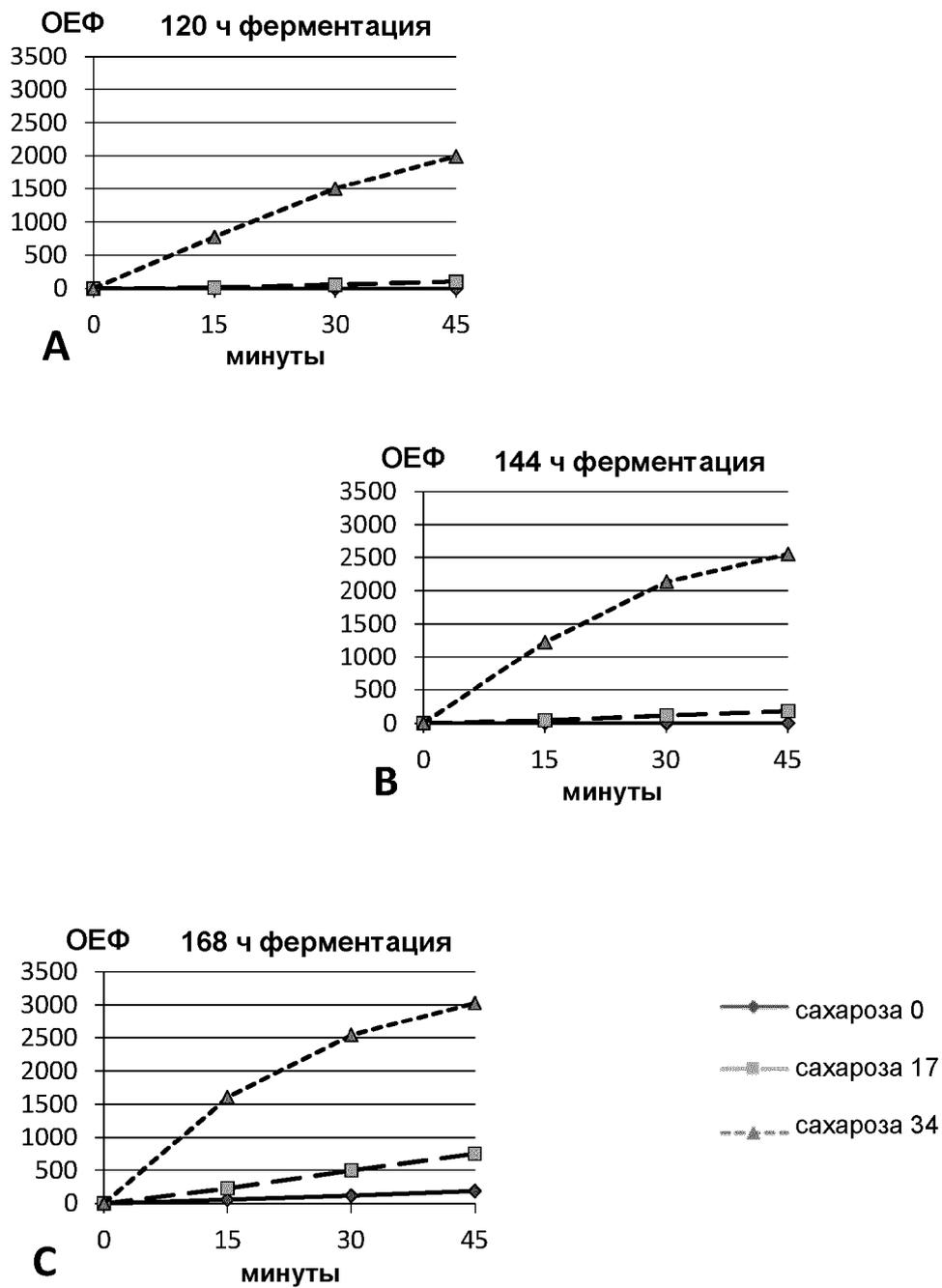
Фиг. 9А

11/14

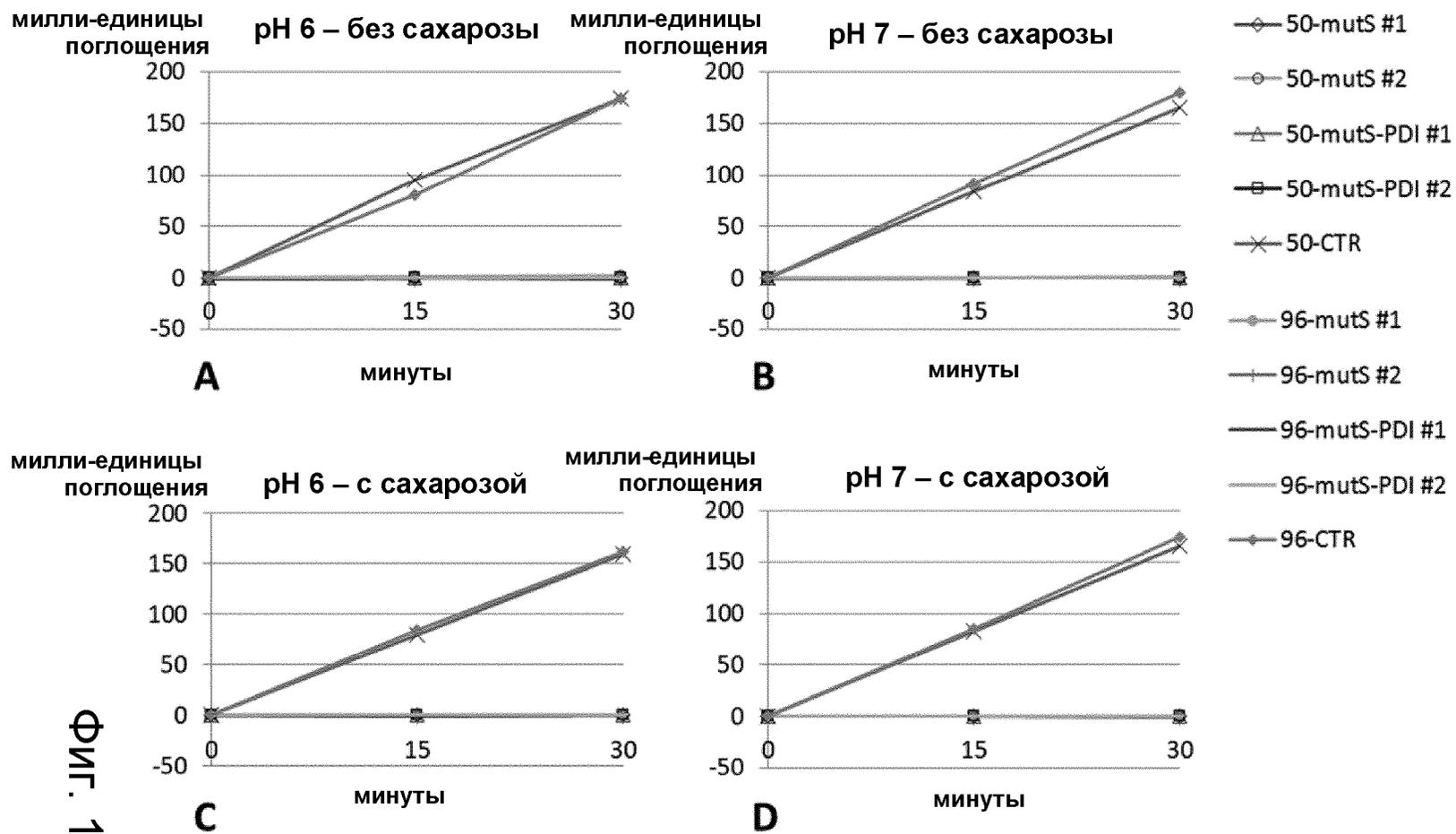


Фиг. 9В

12/14

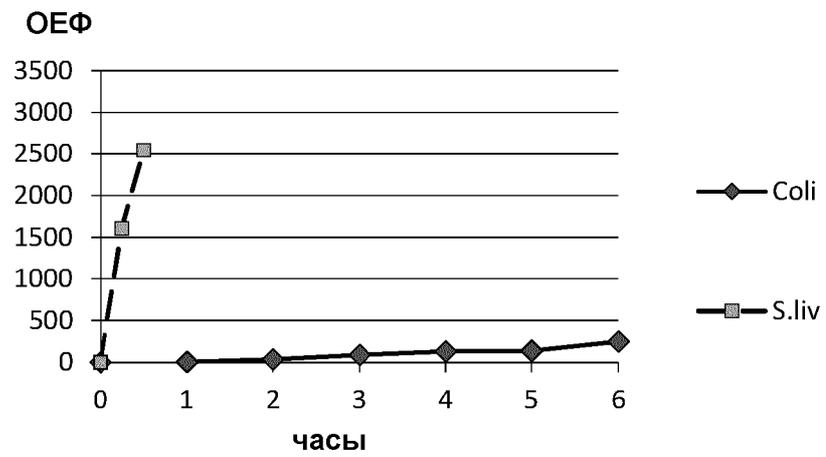


Фиг. 10



ФИГ. 11

14/14



Фиг. 12