



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **124630** (13) **C2**

(51) МПК (2021.01)

**C07K 14/195** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**C07K 14/32** (2006.01)

**A23L 33/195** (2016.01)

A61P 3/00

**A61K 9/00**

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61K 38/45** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: <b>а 2019 03097</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>30.08.2017</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: <b>21.10.2021</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>16186895.5</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>01.09.2016</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>EP</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>12.08.2019, Бюл.№ 15</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: <b>20.10.2021, Бюл.№ 42</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/EP2017/071814, 30.08.2017</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Хоффманн Бернхард (DE), Мюке Івонн (DE), Раше Штефан (DE), Яблонка Наталія (DE), Шильберг Штефан (DE)</b></p> <p>(73) Володілець (володільці): <b>МЕТАКС ІНСТИТУТ ФЮР ДІЕТЕТИК ГМБГ, Am Strassbach 5, 61169 Friedberg/Hessen, Germany (DE)</b></p> <p>(74) Представник: <b>Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2013148332 A1, 03.10.13 WO 9502692 A1, 26.01.95 Soltanizadeh Nafiseh et al, "Strategies used in production of phenylalanine-free foods for PKU management", comprehensive reviews in food science and food safety / Nafiseh Soltanizadeh, Leila Mirmoghtadaie // US. - 16.05.2014. - vol. 13. - no. 3. - P. 287 – 299</p>
--	--

## (54) БІЛОК, ЯКИЙ НЕ МІСТИТЬ ФЕНІЛАЛАНІНУ, ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ОКСИФЕНІЛКЕТОНУРІЇ

### (57) Реферат:

Винахід стосується рекомбінантного дієтичного білка, який не містить фенілаланіну і є дієтичним білком з високою біологічною цінністю. Крім того, надається вектор, що кодує вказаний дієтичний білок, мікроорганізми, які експресують вказаний білок, спосіб продукування вказаного білка і дієтична композиція, що містить вказаний білок, яка в одному варіанті здійснення призначена для застосування як лікарського засобу у пацієнтів з накопиченнями фенілаланіну в організмі.

UA 124630 C2



## Галузь техніки

Даний винахід стосується рекомбінантного дієтичного білка або його задовільної з точки зору дієтології частини, причому вказаний білок не містить фенілаланін, для застосування в дієті пацієнтів, які страждають на оксифенілкетонурію (хворобу Феллінга).

## 5 Передумови створення винаходу

Оксифенілкетонурія (PKU) (OMIM 261600, ORPHA716) є спадковим порушенням обміну речовин з частотою 1:10000 в Європі. У більшості випадків це порушення метаболізму амінокислот, зумовлене відсутністю або порушенням функції ферменту печінки фенілаланін-гідроксилази (PAH). Дефіцит PAH, в свою чергу, приводить до надмірного вмісту фенілаланіну (Phe) в головному мозку і плазмі. Дефіцит PAH в кінцевому результаті виявляється в нестачі тирозину, який є попередником нейромедіаторів. Разом з мутаціями, що торкаються ферментів метаболізму птеринів, PKU супроводжується гіперфенілаланінемією (HPA).

15 Захворювання звичайно діагностується в більшості країн відразу після народження під час скринінгу новонароджених через підвищені рівні Phe в крові. Залишена без лікування і не піддана лікуванню в ранньому віці PKU приводить до незворотного пошкодження нервової системи немовляти, тяжкої олігофренії і слабкого розвитку головного мозку. Ознаки, відмінні від розумової відсталості у пацієнтів, які не піддавались лікуванню, включають неврологічні ускладнення, нейропсихологічні порушення, а також недостатність виконавчих функцій. Повідомлялося, що у випадку залишення без лікування немовля зазнає втрати IQ протягом 20 першого року дитинства. Залежно від віку на початку лікування, рівнів Phe в крові в різні вікові періоди і дотримання дієтотерапії PKU незмінно супроводжуються хоч би деякою втратою IQ. Після виявлення цього захворювання його лікують за допомогою призначення немовляті, а пізніше дитині дієти з обмеженим вмістом Phe. У разі дорослих білкові добавки, що звичайно приймаються пацієнтами з класичною PKU, не містять Phe, за умови, що такі дорослі будуть 25 отримувати достатні кількості Phe завдяки іншому раціону, що контролюється відповідно до суворої схеми, так що загальний раціон є раціоном з низьким вмістом Phe. Зокрема, вагітним жінкам, які страждають на це захворювання, рекомендується дотримуватися суворої схеми харчування з обмеженням в раціоні Phe, щоб уникнути ризику порушення розвитку плоду і природжених вад розвитку (синдрому материнської PKU).

30 У останні роки було встановлено, що патологічні симптоми, які виникають через стан надмірного вмісту Phe, який в сукупності називається гіперфенілаланінемією (HPA), можна розділити на множину дискретних порушень, які діагностуються залежно від концентрацій Phe в плазмі і чутливості до кофактора для PAH. На початковому рівні HPA можна поділити на HPA, яка виникає внаслідок нестачі кофактора 6R-L-еритро-5,6,7,8-тетрагідробіоптерину (BH4) через 35 ферментативні порушення в метаболізмі біоптеринів, (злоякісну PKU) і HPA, яка виникає внаслідок нестачі PAH. Остання HPA додатково поділяється, що приводить до щонайменше чотирьох підкатегорій залежно від концентрації Phe в плазмі за відсутності дієтотерапії або іншого терапевтичного втручання (яка називається тут "необмеженою концентрацією Phe в плазмі") і чутливості до кофактора BH4.

40 Нормальний гомеостаз Phe в плазмі суворо контролюється, в результаті чого концентрація Phe в плазмі становить  $60 \text{ мкмоль/л} \pm 15 \text{ мкмоль/л}$ . Класична PKU (ORPHA79254) є найтяжчою формою PKU, і вона виникає в результаті нульових або серйозних мутацій в PAH, які приводять до необмежених концентрацій Phe в плазмі, які перевищують  $1200 \text{ мкмоль/л}$  при залишанні без лікування. Індивідууми з класичною (або тяжкою) PKU повинні піддаватися лікуванню з 45 використанням суворої схеми харчування, основаної на дієті з дуже низьким вмістом Phe, для зниження у них концентрацій Phe до безпечного рівня. Більш легкі форми PKU також були охарактеризовані. Менш тяжкою формою PKU є та, яка виявляється в необмежених концентраціях Phe в плазмі, які становлять  $10\text{-}20 \text{ мг/дл}$  ( $600\text{-}1200 \text{ мкмоль/л}$ ) і, як правило, називається "легкою PKU" (ORPHA79253). Цю середньотяжку PKU лікують за допомогою 50 помірних обмежень в харчуванні, наприклад, порівняно низькобілкової дієти без необхідності додавання амінокислотної суміші без Phe. Легка HPA, яка також називається доброякісною або HPA, яка не є PKU (ORPHA79651), характеризується необмеженими концентраціями Phe в плазмі між  $180\text{-}600 \text{ мкмоль/л}$ . Індивідуумів з HPA, що не є PKU, звичайно не лікують, оскільки вважається, що рівні Phe в їх плазмі знаходяться в "безпечному" діапазоні. При дієтотерапії 55 PKU досягають діапазону нижче  $< 360 \text{ мкмоль/л}$ , при цьому діапазон до  $600 \text{ мкмоль/л}$  вважається прийнятним. Нарешті, BH4-чутлива PKU/HPA (ORPHA293284) характеризується необмеженими концентраціями Phe в плазмі  $> 360 \text{ мкмоль/л}$ , які можуть бути помітно знижені або нормалізовані після перорального введення тетрагідробіоптерину (BH4; дигідрохлориду сапроптерину). Ця легка-середньотяжка форма PKU/HPA викликана специфічними мутаціями в 60 гені PAH, що приводять до мутантних білків зі значною залишковою ферментативною

активністю. Додавання ВН4 як частини лікування РКУ/НРА дозволяє деяким пацієнтам ослабити свою схему харчування з обмеженням в раціоні Phe. Потрібно розуміти, що використовувані тут терміни "лікування РКУ" або "пацієнт з РКУ" призначені для позначення лікування і пацієнтів з наступними формами НРА, наприклад, класичною РКУ, легкою РКУ, легкою НРА і ВН4-чутливою РКУ/НРА.

На початку дієтотерапії РКУ на початку 1950-х років пацієнтам надавалися незамінні амінокислоти (крім Phe) за допомогою білкових гідролізатів. Отже, білок з відносно високими рівнями незамінних амінокислот, такий як казеїн (білок, що звичайно виявляється в молоці ссавців, становить 80 % від білків коров'ячого молока) або бичачий сироватковий альбумін, піддався гідролізу з подальшою стадією фільтрації пептидів для видалення як можна більше домішок Phe і/або з подальшим об'єднанням вільних амінокислот в суміш, яка включає гідролізований білок. Сьогодні пацієнтам надаються типово збалансовані суміші вільних кристалічних амінокислот, що включають незамінні амінокислоти (крім Phe). Такі суміші амінокислот можуть мати гіркий смак, спричиняти відчуття піску у роті і можуть вважатися неприємними або небажаними для певних застосувань. У результаті такі суміші іноді включають ароматизатори для маскування смаку вільних амінокислот і/або гідролізованого білка. У деяких випадках, як встановлено, композиції, в яких частка вмісту амінокислот забезпечується за рахунок поліпептидів або білків, мають кращий смак, ніж композиції з високою часткою всіх амінокислот, наданих у вигляді вільних амінокислот і/або деяких гідролізованих білків. Однак доступність таких композицій була обмежена, оскільки харчові суміші традиційно виготовлялися з білка, виділеного з натуральних харчових продуктів, таких як сироватка, виділена з молока, або соєвий білок, виділений з сої. Амінокислотні профілі цих білків не обов'язково відповідають вимогам до амінокислот для ссавця. Крім того, товарні білки звичайно складаються з сумішей білків і/або білкових гідролізатів, які можуть відрізнятися по своєму білковому складу, що приводить до непередбачуваності їх харчової цінності. Більше того, обмежена кількість джерел таких білків з високою біологічною цінністю означає, що у великому масштабі доступні тільки деякі комбінації амінокислот для прийому всередину в формі білка.

Глікомакропептид (GMP), натуральний білок молочної сироватки, який виробляється під час приготування сиру, використовувався для лікування РКУ. GMP в чистому вигляді не містить ароматичні амінокислоти фенілаланін (Phe; F), тирозин (Tyr; Y) і триптофан (Trp; W), а також аргінін (Arg; R), гістидин (His; H) і цистеїн (Cys; C) але збагачений великими нейтральними амінокислотами: ізолейцином (Ile; I) і треоніном (Thr; T). У вигляді комерційно доступного дієтичного білка він містить мінімальну кількість Phe. Однак використовуваний як єдине джерело білка в медичних продуктах для дієтотерапії РКУ, він повинен бути доповнений Trp, Arg, Leu, His і Tyr для задоволення потреб в щоденному споживанні цих незамінних і частково замінних амінокислот і для забезпечення відповідного низького відношення Phe/Tyr (<1). Стаючи необхідним для пацієнтів з РКУ, Tyr поліпшує їх емоційну поведінку залежно від доступності для синтезу нейромедіаторів.

Даний винахід спрямований на розв'язання вищезгаданих проблем шляхом надання дієтичного білка, що містить всі незамінні амінокислоти (крім Phe), який має поліпшені властивості, такі як висока біологічна цінність або нейтральний смак. Крім того, дієтичний білок може бути наданий у вигляді продукту харчування, який може становити частину нормального раціону пацієнта, такого як хлібобулочні вироби, крупи або пресовані батончики. Альтернативно, дієтичний білок може бути наданий в формі, прийнятній для приготування продукту харчування пацієнтом, такий як заздалегідь приготовані суміші для випічки або суміші для овочевих супів.

Отже, даний винахід спрямований на поліпшення якості життя пацієнтів з РКУ, оскільки всі пацієнти з РКУ повинні дотримуватися спеціальної дієти з низьким вмістом Phe для оптимального розвитку головного мозку. "Дієта на все життя" стала стандартом, рекомендованим більшістю фахівців. Дієта вимагає суворого обмеження або виключення продуктів з високим вмістом Phe, таких як м'ясо, курка, риба, яйця, горіхи, сир, бобові, молоко і інші молочні продукти. Крохмалевмісні продукти, такі як картопля, хліб, макарони і кукурудза, повинні контролюватися. Також потрібно уникати підсолоджувача аспартама, присутнього в багатьох харчових продуктах і безалкогольних напоях, оскільки аспартам складається з двох амінокислот: фенілаланіну і аспарагінової кислоти.

Немовлята можуть як і раніше знаходитися на грудному вигодовуванні, щоб забезпечити всі переваги грудного молока, але необхідно також стежити за його кількістю, і буде потрібне додавання бракуючих поживних речовин. У разі цих пацієнтів використовуються додаткові суміші для харчування немовлят, щоб забезпечити амінокислоти і інші необхідні поживні

речовини, яких в іншому випадку було б недостатньо в раціоні з низьким вмістом фенілаланіну. Коли дитина виростає, їх можна замінити таблетками, сумішами і спеціально розробленими продуктами. Оскільки Phe необхідний для синтезу багатьох білків, він необхідний для відповідного зростання, але його рівні повинні суворо контролюватися у пацієнтів з PKU. Крім того, тирозин, який звичайно виходить з фенілаланіну, повинен бути доданий в раціон пацієнтів з PKU.

Пероральне введення тетрагідробіоптерину (або BH4) (кофактора для окиснення фенілаланіну) може знизити рівні Phe в крові деяких пацієнтів. Таблетований препарат сполуки дигідрохлориду сапроптерину (Kuvan®), який є формою тетрагідробіоптерину, є комерційно доступним. Kuvan® є першим лікарським засобом, який може допомогти пацієнтам з BH4-чутливою PKU (ORPHA293284, залежно від клінічної ситуації визначеним серед лікарів як приблизно 25-50 % популяції, яка страждає на PKU), знизити рівні Phe до рекомендованих діапазонів. Працюючи в тісній співпраці з дієтологом, деякі пацієнти з PKU, які реагують на Kuvan®, можуть збільшити кількість натурального білка, яку вони можуть з'їдати. Однак пацієнти як і раніше потребують раціону з обмеженням в ньому Phe.

Теоретично, синтетичні поліпептидні послідовності, що містять бажану суміш амінокислот, можуть бути сконструйовані і отримані в лабораторних умовах. Однак такий підхід може викликати різні проблеми і тому не завжди застосовний. По-перше, кваліфікованим фахівцям відомо, що досягнення високих рівнів продукування таких синтетичних послідовностей може бути дуже складною задачею. По-друге, навіть якби такий синтетичний білок був синтезований, його придатність для використання в продукті харчування була б невизначеною. Наприклад, такий поліпептид, який не зустрічається в природі, може бути алергеном або токсином. Таким чином, природні білки є переважними.

Заміна залишків Phe в природних білках з подальшою рекомбінантною продукцією цих білків також була запропонована в патенті США з № 6495344, що стосується овальбуміну і казеїну, двох білків, присутніх в дуже великих кількостях в яйцях і молоці, відповідно, і патенті США з № 6004930, в якому описуються гамма-зеїни, клас білків, присутніх в кукурудзі. Однак заміна Phe в природних білках не завжди можлива і може змінити структуру білка, так що білок більше не експресується.

WO 2013/148332 стосується харчових поліпептидних послідовностей, які зустрічаються в природі, що складаються з комбінацій амінокислот, які не містять Phe або мають низький вміст Phe, деякі з яких секретуються. WO 2014/081884 стосується препаратів таких виділених харчових поліпептидів, наприклад, з метою харчування. WO 2016/046234 стосується способу продукування рекомбінантного білка, що не містить Phe або що має низький вміст Phe.

Короткий виклад суті даного винаходу

Метою даного винаходу є надання рекомбінантного, що не містить Phe, дієтичного білка з високою біологічною цінністю для застосування в дієтичних композиціях для пацієнтів з накопиченням фенілаланіну в організмі, щоб достатньо збалансовано з точки зору дієтології забезпечити всі інші незамінні амінокислоти.

У одному аспекті даний винахід стосується рекомбінантного дієтичного білка, що включає поліпептидну послідовність, яка на щонайменше 70 % ідентична послідовності SEQ ID NO:2. У одному варіанті здійснення рекомбінантний дієтичний білок включає поліпептидну послідовність, яка на щонайменше 75 %, більш переважно на щонайменше 80 %, більш переважно на щонайменше 85 %, більш переважно на щонайменше 90 %, більш переважно на щонайменше 95 %, більш переважно на щонайменше 98 % ідентична SEQ ID NO:2. У ще більш переважному варіанті здійснення рекомбінантний дієтичний білок включає поліпептидну послідовність, яка на 100 % ідентична SEQ ID NO:2. Рекомбінантний дієтичний білок може являти собою задовільну з точки зору дієтології частину послідовності SEQ ID NO:2, яка зі зростаючою перевагою ідентична на щонайменше 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % послідовності SEQ ID NO:2.

У іншому варіанті здійснення рекомбінантний дієтичний білок або його задовільна з точки зору дієтології частина включає одну або більше додаткових білкових послідовностей, які являють собою мітки для очищення або мітку. У переважному варіанті здійснення додаткова білкова послідовність включає SEQ ID NO:3.

У іншому аспекті даний винахід стосується вектора, що включає послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує рекомбінантний дієтичний білок або його задовільну з точки зору дієтології частину.

У іншому аспекті даний винахід стосується рекомбінантного мікроорганізму, що містить вектор, що кодує рекомбінантний дієтичний білок або його задовільну з точки зору дієтології частину. У одному варіанті здійснення мікроорганізм вибирають з групи, яка складається з:

Escherichia, Klebsiella, Pseudomonas, Xanthomonas, Bacillus, Staphylococcus, Saccharomyces, Corynebacterium, Streptomyces, Salmonella, Aspergillus, Gluconobacter, Mycobacterium, Actinomycetes, Caulobacter, Pichia, Corynebacterium glutamicum, Saccharomyces cerevisiae, Clostridium botulinum, Flavobacterium heparinum, Lactococcus lactis, Methylobacterium extorquens, Pseudoalteromonas haloplanktis, Ralstonia eutropha, Neurospora crassa, Arxula adenivorans, Hansenula polymorpha, Kluyveromyces lactis, Zygosaccharomyces bailii, Pseudomonas fluorescens, Bacillus subtilis і Bacillus megaterium. У переважному варіанті здійснення мікроорганізм вибирають з групи, яка складається з Bacillus або Pseudomonas. У більш переважному варіанті здійснення вказаний мікроорганізм являє собою Bacillus subtilis або Pseudomonas fluorescens.

У іншому аспекті даний винахід стосується способу продукування дієтичного білка або його задовільної з точки зору дієтології частини, який включає культивування рекомбінантного мікроорганізму, що несе вектор, який кодує рекомбінантний білок або його задовільну з точки зору дієтології частину, у прийнятних для продукції умовах. Рекомбінантний дієтичний білок або його задовільна з точки зору дієтології частина можуть бути піддані очищенню. У одному варіанті здійснення очищення виконується за допомогою мітки для очищення. Переважно, щоб очищений рекомбінантний білок або його задовільна з точки зору дієтології частина містили не більше 1 г Phe на 100 г білка, переважно не більше 0,45 г домішки Phe на 100 г білка, більш переважно не більше 0,35 г домішки Phe на 100 г білок, більш переважно не більше 0,25 г домішки Phe на 100 г білка, більш переважно не більше 0,15 г домішки Phe на 100 г білка, більш переважно не більше 0,13 г домішки Phe на 100 г білка і найбільш переважно не більше 0,10 г домішки Phe на 100 г білка.

У іншому аспекті даний винахід стосується дієтичної композиції, що містить дієтичний білок або його задовільну з точки зору дієтології частину. У одному варіанті здійснення дієтична композиція складається з дієтичного білка або його задовільної з точки зору дієтології частини. У іншому варіанті здійснення дієтичний білок або його задовільну з точки зору дієтології частину об'єднують з додатковими наповнювачами. У переважному варіанті здійснення дієтична композиція містить не більше 0,2 г Phe на 100 г білка, переважно не більше 0,1 г домішки Phe на 100 г білка, більш переважно не більше 0,05 г домішки Phe на 100 г білка, більш переважно не більше 0,04 г домішки Phe на 100 г білка, більш переважно не більше 0,03 г домішки Phe на 100 г білка і найбільш переважно не більше 0,02 г домішки Phe на 100 г білка.

Дієтичний білок або його задовільна з точки зору дієтології частина або дієтична композиція призначені для застосування як їжі для спеціальних медичних цілей; робиться посилання на директиви ЄС 2009/39/ ("Diätrahmenrichtlinie") і 1999/21/EG ("diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke") а також регламент EC EU 609/2013 ("Food for special groups"; "Lebensmittel für Säuglinge und Kleinkinder, Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke und Tagesrationen für gewichtskontrollierende Ernährung"), який набрав чинності 20 липня 2016 року. Зокрема, дієтичний білок або його задовільна з точки зору дієтології частина або вказана дієтична композиція можуть бути призначені для застосування для контролювання перебігу порушення, що характеризується накопиченням фенілаланіну в організмі, такого як гіперфенілаланінемія (HPA), переважно оксифенілкетонурія (PKU). Таким чином, в іншому аспекті дієтичний білок або його задовільна з точки зору дієтології частина або вказана дієтична композиція призначені для застосування як лікарського засобу. У переважному варіанті здійснення дієтичний білок або його задовільна з точки зору дієтології частина призначені для застосування при лікуванні порушення, що характеризується накопиченням фенілаланіну в організмі. У більш переважному варіанті втілення порушення являє собою HPA, більш переважно PKU.

Короткий опис фігур

На фіг. 1 продемонстрована зміна ваги мишей з PKU, які отримували стандартний для мишей раціон (групи 1, без лікування), дієту на основі білка GSP105 без Phe (групи 2) або амінокислотну дієту в без Phe (групи 3, стандартне лікування) протягом 28 днів годування. По осі X відмічені дні періоду годування, по осі Y відмічена вага тварин в грамах.

На фіг. 2 представлені у вигляді графіків середні концентрації Phe в плазмі крові трьох різних груп мишей протягом 28 днів годування. По осі X відмічені дні періоду годування, по осі Y відмічений рівень L-Phe в мікромолях на літр плазми крові.

На фіг. 3 продемонстровані типові миші з кожної групи дієти з диференціально вираженими, більш або менш частковими змінами гіпопигментації шерсті миші після 28 днів годування.

На фіг. 4 представлене відношення фенілаланіну до тирозину в крові трьох різних груп мишей протягом 28 днів годування. По осі X відмічені дні періоду годування, по осі Y відмічене відношення фенілаланін/тирозин в крові.

На фіг. 5 представлені середні концентрації Phe і Тур в головному мозку мишей дико типу

(WT) і мишей, які страждають на PKU, що отримували стандартний для мишей раціон, дієту на основі білка GSP105 без Phe або амінокислотну дієту без Phe.

На фіг. 6 представлені середні відношення Phe/Тур в головному мозку мишей WT і мишей, які страждають на PKU, що отримували стандартний для мишей раціон, дієту на основі білка GSP105 без Phe або амінокислотну дієту без Phe.

Детальний опис даного винаходу

Використовуваний тут термін "рекомбінантний" стосується біомолекули, наприклад гена або білка, яка (1) була видалена з її оточення, що зустрічається в природі, (2) не пов'язана з усім або частиною полінуклеотида, в якому ген зустрічається в природі, (3) функціонально зв'язана з полінуклеотидом, з яким вона не пов'язана в природі, і/або (4) не зустрічається в природі. Термін "рекомбінантний" може використовуватися відносно клонуваних ізолятів ДНК, хімічно синтезованих аналогів полінуклеотидів або аналогів полінуклеотидів, які біологічно синтезовані за допомогою гетерологічних систем, а також білків і/або мРНК, що кодуються такими нуклеїновими кислотами. Так, наприклад, білок, синтезований мікроорганізмом, є рекомбінантним, якщо він є синтезованим з мРНК, синтезованим з рекомбінантного гена, присутнього в клітині.

Використовуваний тут термін "дієтичний білок" стосується білка, прийнятного для прийому всередину людиною. Дієтичні білки, які забезпечують всі незамінні амінокислоти, називаються білками з високою біологічною цінністю. Білок без Phe, що забезпечує всі інші незамінні амінокислоти, також вважається білком з високою біологічною цінністю. Казеїн (білок, який звичайно виявляється в молоці ссавців, що становить 80 % від білків коров'ячого молока) і сироватка (білок в рідині, яка залишається після зсідання і проціджування молока), є основними джерелами дієтичних білків з високою біологічною цінністю. Дієтичний білок даного винаходу містить всі незамінні амінокислоти, крім Phe. Термін "його задовільна з точки зору дієтології частина" стосується частини дієтичного білка. Задовільна з точки зору дієтології частина дієтичного білка містить менше амінокислот, ніж дієтичний білок даного винаходу, але все ще містить всі незамінні амінокислоти, крім Phe.

Використовуваний тут термін "задовільна з точки зору дієтології" стосується поліпептидної послідовності, яка включає всі незамінні амінокислоти, крім фенілаланіну, і являє собою білок з високою біологічною цінністю.

Використовуваний тут термін "незамінні амінокислоти" стосується гістидину (His, H), аргініну (Arg, R), ізолейцину (Ile, I), лейцину (Leu, L), лізину (Lys, K), метіоніну (Met, M), фенілаланіну (Phe, F), треоніну (Thr, T), триптофану (Trp, W) і валіну (Val, V), які є амінокислотами, необхідними для здоров'я і росту, але які не можуть бути синтезовані в організмі людини і повинні бути отримані з їжі.

Використовуваний тут термін "рекомбінантний мікроорганізм" стосується мікроорганізму, який був модифікований для перенесення копії рекомбінантного гена.

Як тут використовується, "дієтична композиція" являє собою композицію, прийнятну для споживання людиною. Дієтична композиція може містити в основному білок. Дієтична композиція даного винаходу містить рекомбінантний дієтичний білок даного винаходу або його задовільну з точки зору дієтології частину і має низький вміст загального фенілаланіну.

Використовуваний тут термін "білок, що зустрічається в природі" стосується білка, який утворюється з не зміненої людиною послідовності, присутньої у природного хазяїна. Отже, ні послідовність ДНК, що кодує білок, ні амінокислотна послідовність самого білка не були змінені порівняно з послідовностями, що виявляються у природного хазяїна.

Для цілей даного винаходу "продукт харчування" являє собою прийнятний для споживання людиною продукт, який включає рекомбінантний дієтичний білок даного винаходу або його задовільну з точки зору дієтології частину або дієтичну композицію даного винаходу і містить бажану кількість незамінних амінокислот. Бажана кількість незамінних амінокислот, необхідна для пацієнта на день, залежить від віку пацієнта і раціону пацієнта, тобто рівня обмеження білка і/або Phe. Бажана добова кількість може бути визначена лікарем і/або дієтологом відомими в даній галузі техніки способами. Типова кількість оснований, наприклад, на 0,8 г білка на кг ваги тіла на день для дорослих або 1,2 г білка на кг ваги тіла на день для дітей. Сам продукт харчування, тобто до додавання рекомбінантного дієтичного білка даного винаходу або його задовільної з точки зору дієтології частини або дієтичної композиції даного винаходу, не містить білок або має низький вміст білкових компонентів.

Як тут використовується, "мітка для очищення" являє собою будь-який поліпептид, який має партнера по зв'язуванню, який може використовуватися для виявлення, виділення і/або очищення другої білкової або поліпептидної послідовності, яка представляє інтерес, злитого з міткою для очищення. Декілька прикладів добре відомі в даній галузі техніки і включають His-6-

мітку, епітоп FLAG, епітоп с-мус, Strep-TAGII, біотинову мітку, глутатіон-S-трансферазу (GST), хітин-зв'язувальний білок (CBP), мальтозозв'язувальний білок (MBP), мітку спорідненості до металу або Tag54 (Rasche et al., The Open Biotechnology Journal 2011, 5: 1-6) або їх модифікації.

У одному аспекті даний винахід стосується рекомбінантного дієтичного білка з високою біологічною цінністю, який не містить Phe. У прикладі 1 описаний процес ідентифікації такого дієтичного білка, що використовується для продукування рекомбінантного дієтичного білка даного винаходу, що не містить Phe, який може використовуватися для дієтотерапії для пацієнтів з накопиченням фенілаланіну в організмі. "Білок загального стресу 16O (G16O\_BACSU)" (SEQ ID NO:1) (номер доступу в банку даних про білок UniprotKb - P80872) з *Bacillus subtilis* (штам 168) був ідентифікований як прийнятний білок-кандидат. Єдиний залишок Phe був замінений структурно схожим амінокислотним залишком триптофаном (Trp) шляхом заміни триплета основ, що кодує Phe, на триплет основ, що кодує триптофан, на рівні кДНК. Ця заміна приводить до отримання дієтичного білка, що не містить Phe, але замість нього який містить незамінну амінокислоту Trp, забезпечуючи тим самим дієтичний білок, який містить всі незамінні амінокислоти, крім Phe. Отже, заміна вигідна з двох причин: по-перше, надається дієтичний білок, що не містить Phe, по-друге, всі інші незамінні амінокислоти присутні в білку, і ніяких добавок не потрібно. Це особливо вигідно, оскільки Trp має дуже гіркий смак, і додавання вільного Trp в дієтичну композицію приведе до гіркого смаку. Більше того, несподівано було виявлено, що введення амінокислоти Trp з гірким смаком не приводить до дієтичного білка з гірким смаком. Таким чином, в одному варіанті здійснення рекомбінантний дієтичний білок з високою біологічною цінністю, який не містить Phe і містить всі незамінні амінокислоти, має поліпептидну послідовність, ідентичну SEQ ID NO:2. Такий дієтичний білок називається GSP105. У іншому варіанті здійснення рекомбінантний дієтичний білок включає поліпептидну послідовність, яка на щонайменше 70 % ідентична послідовності SEQ ID NO:2. Більш переважно, коли рекомбінантний дієтичний білок включає поліпептидну послідовність, яка на щонайменше 75 %, більш переважно на щонайменше 80 %, більш переважно на щонайменше 85 %, більш переважно на щонайменше 90 %, більш переважно на щонайменше 95 %, більш переважно на щонайменше 98 %, більш переважно на щонайменше 99 % і найбільш переважно на щонайменше 100 % ідентична SEQ ID NO:2. Повинно бути зрозумілим, що ідентичність послідовності повинна визначатися відносно послідовності SEQ ID NO:2 по всій її довжині. Наприклад, вважається, що білок, що включає послідовність SEQ ID NO:2 і має на C- і/або N-кінці дієтичного білка додаткові амінокислоти, ідентичний по послідовності на 100 % послідовності SEQ ID NO:2, оскільки C- і/або N-кінцеві амінокислоти можуть не враховуватися при порівнянні послідовностей.

Рекомбінантний дієтичний білок може включати задовільну з точки зору дієтології частина послідовності SEQ ID NO:2, яка зі зростаючою перевагою на щонайменше 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична SEQ ID NO:2.

Рекомбінантний дієтичний білок або його задовільна з точки зору дієтології частина може включати одну або більше додаткових білкових послідовностей, які є мітками для очищення або міткою. Додаткова білкова послідовність може необов'язково видалятися шляхом розщеплення. Якщо дієтичний білок або його задовільна з точки зору дієтології частина включає більше однієї додаткової білкової послідовності, кожна з них, будь-яка їх комбінація або всі вони можуть видалятися шляхом розщеплення. Потрібно розуміти, що додаткова білкова послідовність не вводить залишок Phe, або в тих випадках, коли додаткова білкова послідовність включає залишок Phe, така додаткова білкова послідовність видаляється шляхом розщеплення. У одному варіанті здійснення додаткова білкова послідовність включає SEQ ID NO:3. У переважному варіанті здійснення додаткова білкова послідовність включає модифіковану TAG54 (Rasche et al.), в якій залишок Phe замінений іншою амінокислотою, переважно залишком тирозину або аланіну. Таким чином, в конкретному переважному варіанті здійснення додаткова білкова послідовність включає SEQ ID NO:4, модифіковану Tag54, в якій залишок Phe був замінений залишком аланіну. У іншому конкретному переважному варіанті здійснення додаткова білкова послідовність включає модифіковану Tag54, в якій залишок Phe був замінений залишком тирозину (SEQ ID NO:5). Така заміна має ту перевагу, що вміст Trp збільшується, а відношення Phe/Trp в дієтичному білку зменшується. У додатковому переважному варіанті здійснення рекомбінантний дієтичний білок або його задовільна з точки зору дієтології частина додатково включає C-кінцеву His-6-мітку. У особливо переважному варіанті здійснення рекомбінантний дієтичний білок включає поліпептидну послідовність, яка ідентична SEQ ID NO:2, і включає як додаткові білкові послідовності C-кінцеву His-6-мітку і SEQ ID NO:4, в результаті чого мічений рекомбінантний дієтичний білок має послідовність, вказану в SEQ ID NO:6 (=GSP105-6His-Tag54-P15). Характеристики міченого рекомбінантного дієтичного

білка (SEQ ID NO:6) порівняно з білком загального стресу 16O (GSP16O) *B. subtilis* перераховані в таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняння білка GSP16O, що зустрічається в природі, і міченого рекомбінантного дієтичного білка GSP105 (SEQ ID NO:6), який продукується в *Bacillus subtilis* і *Pseudomonas fluorescens*

	GSP16O	GSP105-6His-Tag54-P15	
Походження	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. fluorescens</i>
Вміст Phe [%]	0,6	0	0
Молекулярна маса [кДа]	19	21	21
модифікації	-	Phe→Tyr His6-мітка, Tag54-P15	Phe→Tyr His6-мітка, Tag54-P15
особливі властивості	Секретований, теплостійкий	секретований, теплостійкий, з нейтральним смаком	теплостійкий, з нейтральним смаком

5 His-6-мітка і/або модифікований Tag54 можуть використовуватися для очищення рекомбінантного дієтичного білка або його задовільної з точки зору дієтології частини. Несподівано було виявлено, що мітка Tag54-P15 збільшує експресію білка в *B. subtilis*. Крім того, додаткова білкова послідовність модифікованої Tag54 переважно забезпечує

10 амінокислоти для загального амінокислотного складу дієтичного білка, тим самим поліпшуючи загальний амінокислотний склад рекомбінантного дієтичного білка. Крім того, модифікована Tag54 може служити як епітоп для виявлення злитого білка.

Рекомбінантний дієтичний білок даного винаходу або його задовільна з точки зору дієтології частина може, крім того, включати дизайнерський хвіст. "Дизайнерський хвіст" стосується короткої ділянки амінокислот, які можуть бути додані до С- або N-кінцю білка. Дизайнерський

15 хвіст включає від 1 до 5 амінокислот. У одному варіанті здійснення дієтичний білок включає поліпептидну послідовність, яка на щонайменше 70 % ідентична послідовності SEQ ID NO:2, і дизайнерський хвіст. Необов'язково, дієтичний білок може, крім того, включати одну або більше додаткових білкових послідовностей, таких як His-6-мітка і/або модифікована Tag54. У переважному варіанті здійснення дизайнерський хвіст складений з тирозину. У особливо

20 переважному варіанті здійснення дизайнерський хвіст містить один тирозин, більш переважно два тирозини і найбільш переважно три тирозини. Таким чином, в одному варіанті здійснення дієтичний білок або його задовільна з точки зору дієтології частина включає поліпептидну послідовність, яка на щонайменше 70 % ідентична SEQ ID NO:2, складений з тирозину дизайнерський хвіст, що включає щонайменше один залишок тирозину, His-6-мітку і

25 модифіковану Tag54.

У іншому аспекті даний винахід стосується вектора, що включає послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує рекомбінантний дієтичний білок даного винаходу або його задовільну з точки зору дієтології частину. У одному варіанті здійснення вектор являє собою плазмід. У

30 переважному варіанті здійснення плазміда являє собою індуковану за допомогою IPTG експресійну плазмід рHT43 (MoViTec) або індуковану за допомогою IPTG експресійну плазмід рDAB107209 (Dow; US 2008/0269070 A1).

Фахівець в даній галузі техніки може легко визначити послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує рекомбінантний дієтичний білок даного винаходу або його задовільну з точки зору дієтології частину, використовуючи відомі способи, такі як зворотна трансляція. Зворотна

35 трансляція являє собою спосіб, в якому як вхідні дані використовується послідовність білка, і після використання таблиці використання кодонів виходить послідовність ДНК, яка представляє найбільш ймовірну послідовність у разі невиродженого коду. Отримана послідовність нуклеїнової кислоти може бути оптимізована з використанням відомих алгоритмів оптимізації. Це дозволило фахівцеві отримати послідовність нуклеїнової кислоти, оптимізовану для

40 експресії в конкретному хазяїні. Фахівець може також отримати нуклеїнові кислоти комерційно, надаючи бажану амінокислотну послідовність і організм хазяїна, в якому повинен бути продукований білок. Зразкова послідовність нуклеїнової кислоти для продукції рекомбінантного дієтичного білка, що має поліпептидну послідовність SEQ ID NO:6, в *B. subtilis* показана в SEQ ID NO:7. Однак потрібно розуміти, що інші послідовності нуклеїнової кислоти, такі як

45 послідовності нуклеїнової кислоти, оптимізовані відносно частоти використання кодонів для конкретних клітин-хазяїв, можуть відхилятися від зразкової послідовності, все ще продукуючи

рекомбінантний дієтичний білок даного винаходу або його задовільну з точки зору дієтології частину. Навіть для одного і того ж організму послідовність нуклеїнової кислоти може варіювати залежно від комерційного виробника і використовуюваного алгоритму.

У іншому аспекті даний винахід стосується рекомбінантного мікроорганізму, що містить вектор, який включає послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує рекомбінантний дієтичний білок даного винаходу або його задовільну з точки зору дієтології частину. Таким чином, даний винахід стосується рекомбінантного мікроорганізму, який експресує рекомбінантний дієтичний білок даного винаходу або його задовільну з точки зору дієтології частину. У одному варіанті здійснення мікроорганізм вибирають з групи, яка складається з: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Saccharomyces*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Aspergillus*, *Gluconobacter*, *Mycobacterium*, *Actinomycetes*, *Caulobacter*, *Pichia*, *Corynebacterium glutamicum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium botulinum*, *Flavobacterium heparinum*, *Lactococcus lactis*, *Methylobacterium extorquens*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ralstonia eutropha*, *Neurospora crassa*, *Arxula adeninivorans*, *Hansenula polymorpha*, *Kluuyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* і *Bacillus megaterium*. У переважному варіанті здійснення мікроорганізм вибирають з групи, яка складається з *Bacillus* або *Pseudomonas*. У більш переважному варіанті здійснення мікроорганізм являє собою *Bacillus subtilis* або *Pseudomonas fluorescens*.

У іншому аспекті даний винахід стосується способу продукування рекомбінантного дієтичного білка даного винаходу або його задовільної з точки зору дієтології частини, який включає культивування рекомбінантного мікроорганізму даного винаходу в умовах, прийнятних для продукування дієтичного білка або його задовільної з точки зору дієтології частини рекомбінантним мікроорганізмом. У одному варіанті здійснення спосіб включає культивування рекомбінантного мікроорганізму, виділення рекомбінантного дієтичного білка або його задовільної з точки зору дієтології частини, очищення рекомбінантного дієтичного білка або його задовільної з точки зору дієтології частини і сушіння отриманого білка. У іншому варіанті здійснення спосіб включає стадії культивування рекомбінантного мікроорганізму, такого як *Bacillus*, збирання супернатанта, необов'язково концентрування супернатанта, очищення рекомбінантного дієтичного білка або його задовільної з точки зору дієтології частини, заміни буфера на воду і ліофілізації і/або сушіння розпиленням і/або сушіння в барабанній сушарці і/або сушіння екструзійного типу отриманого білка. Культивування рекомбінантного мікроорганізму переважно включає використання закваски і основних культур. Збирання і концентрування супернатанта переважно включає діяфільтрацію, більш переважно поперечнопротокову фільтрацію з використанням порожнистих волокон з різними розмірами пор. Переважно, щоб супернатант після концентрування концентрувався щонайменше в 10 разів. Очищення рекомбінантного дієтичного білка або його задовільної з точки зору дієтології частини може включати афінну хроматографію з іммобілізованими іонами металів (IMAC), переважно з використанням іонів цинку і хелатуючої сефарози. Необов'язково очищений білок може бути сконцентрований після заміни буфера на воду. Таким чином, в переважному варіанті здійснення спосіб включає стадії культивування рекомбінантного мікроорганізму з використанням закваски і основних культур, збирання супернатанта, концентрування супернатанта щонайменше в 10 разів, очищення рекомбінантного дієтичного білка або його задовільної з точки зору дієтології частини, заміни буфера на воду, необов'язково концентрування очищеного білка і ліофілізації і/або сушіння розпиленням отриманого білка.

Спосіб продукування рекомбінантного дієтичного білка даного винаходу або його задовільної з точки зору дієтології частини приводить до високих виходів білка, таких як, щонайменше, 100-500 мг/л в *B. subtilis* або, щонайменше, 2,4 г/л в *Pseudomonas fluorescens*. Очищений рекомбінантний білок або його задовільна з точки зору дієтології частина містить не більше 1 г Phe на 100 г білка, переважно не більше 0,45 г домішки Phe на 100 г білка, більш переважно не більше 0,35 г домішки Phe на 100 г білка, більш переважно не більше 0,25 г домішки Phe на 100 г білка, більш переважно не більше 0,15 г домішки Phe на 100 г білка, більш переважно не більше 0,13 г домішки Phe на 100 г білка і найбільш переважно не більше 0,10 г домішки Phe на 100 г білка.

Очищений, підданий ліофілізації і/або сушінню розпиленням і/або сушінню в барабанній сушарці і/або сушінню екструзійного типу білок можна зберігати в замороженому стані, наприклад, при -20 °С, в умовах охолодження, наприклад, при 4 °С, або при кімнатній температурі. У переважному варіанті здійснення очищений підданий ліофілізації і/або сушінню розпиленням і/або сушінню в барабанній сушарці і/або сушінню екструзійного типу білок зберігається при -20 °С.

У іншому аспекті даний винахід стосується дієтичної композиції, що містить рекомбінантний

дієтичний білок даного винаходу або його задовільну з точки зору дієтології частину, або окремо, або необов'язково з додатковими наповнювачами. У одному варіанті здійснення дієтична композиція даного винаходу доповнена додатковими наповнювачами, вибраними з групи, яка складається з необхідних вітамінів, мінералів і мікроелементів, вітаміноподібних речовин (таких як, але без обмеження ними, таурин, міоінозит, холін і карнітин), ліпідів (таких як, але без обмеження ними, жири, масла, жирні кислоти, докозагексаєнова кислота (DHA), ейкозапентаєнова кислота (EPA), тригліцериди, фосфоліпіди, лецитин, ефір жирних кислот або холестерин), вуглеводів (таких як, але без обмеження ними, моно-/ди-/оліго-/полісахариди, крохмаль, глюкани, фруктани або пентозани), нуклеотидів, білків, пептидів, амінокислот (таких як тирозин) і продуктів їх реакції, кислот, регуляторів кислотності, засобів проти спікання, протиспінювальних агентів, антиоксидантів, зв'язувальних речовин, буферів (таких як, але без обмеження ними, цитрат натрію, карбонат магнію, бікарбонат магнію, карбонат кальцію, бікарбонат кальцію), наповнювачів, емульгаторів, ферментів, зміцнювальних агентів, ароматизаторів, підсилювачів смаку, піноутворювачів, гелеутворювальних агентів (таких як, але без обмеження ними, гуар, ксантан, альгінат, караген, пектин), засобів для глазурування, зволожувач, модифікованих крохмалів, консервантів, пропелентів, розпушувачів, секвестрантів, стабілізаторів, загусників (таких як, але без обмеження ними, крохмаль, целюлоза), підсолоджувачів, харчових барвників, трав, спецій, рослинних екстрактів і фітохімічних речовин. У переважному варіанті здійснення дієтична композиція може бути доповнена тирозином.

У одному варіанті здійснення дієтична композиція готується у вигляді порошку, гранул, таблетки, капсули, агломерата, замороженої композиції, гранули, розчину, розчину макромолекул, гідроколоїду, складної дисперсної системи, суспензії, емульсії, рідини, піни, гелю, золю, твердого золю, твердої піни, кристала, аморфної твердої речовини, пілюлі, екструдата або пасти. Дієтична композиція може зберігатися з охолодженням або без нього у висушеному, ліофілізованому, висушеному розпиленні, висушеному в барабанній сушарці або екструзійно висушеному вигляді.

У переважному варіанті здійснення дієтична композиція містить не більше 0,2 г Phe на 100 г білка, переважно не більше 0,1 г домішки Phe на 100 г білка, більш переважно не більше 0,05 г домішки Phe на 100 г білка, більш переважно не більше 0,04 г домішки Phe на 100 г білка, більш переважно не більше 0,03 г домішки Phe на 100 г білка і найбільш переважно не більше 0,02 г домішки Phe на 100 г білка.

Рекомбінантний дієтичний білок даного винаходу або його задовільна з точки зору дієтології частина або дієтична композиція даного винаходу можуть використовуватися в продукті харчування. Продукт харчування може бути вибраний, але без обмеження цим, з групи, яка складається з напоїв, супів, пресованих батончиків, вафель, галет, пудингів, гелеподібних харчових продуктів, подібних до м'яса харчових продуктів, таких як аналоги м'яса, що містять нетваринні волокна, аналоги ковбас, хлібобулочних виробів, соусів, заправок для салатів, каш, пластівці, хлібопекарних сумішей, такі як суміші для кексів, суміші для вафель або суміші для млинців, харчових продуктів, печива, крекерів, кремів, мусів, фруктових пирогів або пирогів з сиром, заварних кремів, компотів, морозива, щербетів, парфе, кремів-соусів, спредів, сиропів, пюре, паст, желе, масел, джемів, аналогів сиру, аналогів вершкового сиру, аналогів йогурту, аналогів молока, чіпсів і екструдованих сухих речовин. Продукт харчування, що містить дієтичну композицію даного винаходу, може бути виготовлений і куплений або індивідуально приготований пацієнтом. Наприклад, напої або супи можуть бути приготовані шляхом додавання дієтичної композиції у воду, фруктовий сік, рисову кашу або овочевий бульйон. Переважно, коли рекомбінантний дієтичний білок або його задовільна з точки зору дієтології частина витримує теплові обробки без змін його харчової цінності, консистенції або смаку. Таким чином, при приготуванні продукту харчування, такого як, наприклад, хлібобулочні вироби, каші, супи або пресовані батончики, рекомбінантний дієтичний білок або його задовільну з точки зору дієтології частину можна нагрівати, запікати, варити, обсмажувати, обсмажувати у фритторі, злегка обсмажувати, тушкувати, тушкувати, обсмажувати в олії, готувати на пару, варити в кип'ятку, тушкувати на повільному вогні, готувати на грилі, готувати при низькій температурі, гомогенізувати, стерилізувати, фракційно стерилізувати, обробляти під високим тиском і при низькій температурі, готувати у вакуумі, обробляти заморожуванням, пастеризувати або екструдувати.

У одному варіанті здійснення продукт харчування містить дуже низькі кількості Phe. У переважному варіанті здійснення продукт харчування не містить Phe. Кількість домішки Phe в дієтичній композиції даного винаходу, яка додається до продукту харчування, може змінюватися залежно від продукту харчування. У одному варіанті здійснення продукт харчування містить не більше 0,2 г Phe на 100 г білка, переважно не більше 0,1 г домішки Phe на 100 г білка, більш

переважно не більше 0,05 г домішки Phe на 100 г білка, більш переважно не більше 0,04 г домішки Phe на 100 г білка, більш переважно не більше 0,03 г домішки Phe на 100 г білка і найбільш переважно не більше 0,02 г домішки Phe на 100 г білка.

У іншому аспекті даний винахід стосується рекомбінантного дієтичного білка даного винаходу або його задовільної з точки зору дієтології частини або дієтичної композиції даного винаходу для застосування як лікарського засобу і/або харчового продукту для спеціальних медичних цілей. Рекомбінантний дієтичний білок або його задовільна з точки зору дієтології частина або дієтична композиція можуть бути в формі порошку, гранул, таблетки, кульки, суспензії, емульсії, рідини, пілюлі, екструдата або пасти. Введення може здійснюватися три-п'ять разів на день. Доза може, наприклад, становити, щонайменше 5, 10, 15, 20, 30, 40 або 50 г дієтичного білка. Введення може бути з їдою. Введення може здійснюватися перорально або ентерально. Переважно, коли введення здійснюється перорально. Лікарський засіб можна вводити дітям, підліткам і дорослим. У переважному варіанті здійснення рекомбінантний дієтичний білок даного винаходу або його задовільна з точки зору дієтології частина або дієтична композиція даного винаходу призначені для застосування при лікуванні порушення, що характеризується накопиченням фенілаланіну в організмі. У ще більш переважному варіанті здійснення порушення являє собою гіперфенілаланінемію або оксифенілкетонурію. У ще одному переважному варіанті здійснення рекомбінантний дієтичний білок або його задовільну з точки зору дієтології частину або дієтичну композицію використовують в поєднанні з лікарським засобом для контролювання течії PKU або HPA, таким як BH4 або його аналог.

Придатність рекомбінантного дієтичного білка даного винаходу для застосування при контролюванні перебігу оксифенілкетонурії (PKU) продемонстрована в прикладі 3. В прикладі 3 представлені результати експериментального дослідження, в якому мишей, які страждають на PKU, лікували або за допомогою дієти, в якій єдиним джерелом амінокислот у них була суміш амінокислот без Phe, але з 1,5 % Tyr (Harlan Teklad TD.97152; Seagraves and McBride, Mol Genet Metab 2012, 107 (4):650-658) (яка називається тут "амінокислотою дієтою без Phe"), яка нагадує сучасний стандарт в медичних харчових продуктах для пацієнтів з PKU, або за допомогою дієти, в якій єдиним джерелом амінокислот у них є рекомбінантний дієтичний білок GSP105, доповнений 0,2 % Phe (яка називається тут "дієтою на основі білка GSP105 без Phe" або "дієтою на основі GSP105 без Phe"). Доповнення цієї дієти Phe в експерименті було зроблене, тому що у мишей в іншому випадку не було б доступу до цієї незамінної амінокислоти. Миші, які отримували GSP105-білкову дієту без Phe, продемонстрували збереження ваги або збільшення ваги на противагу мишам, що отримували амінокислотну дієту без Phe, які продемонстрували втрату ваги (фіг. 1). Це може бути пояснене тим фактом, що рекомбінантний дієтичний білок є джерелом структурно інтактного білка. Хоча в галузі дієтології ведуться спори про те, чи залишаються білки і фрагменти білків доступними для метаболічних цілей порівняно з композиціями вільних амінокислот, вважається, що пул доступних амінокислот з суміші кристалічних амінокислот повинен метаболізуватися негайно, оскільки організм не може зберігати їх для подальшого метаболічного використання. Однак білки і фрагменти білків перетравлюються поступово, що забезпечує безперервне вивільнення вільних амінокислот, доступних для метаболічних цілей протягом більш тривалого періоду часу. Таким чином, використання рекомбінантного дієтичного білка даного винаходу або його задовільної з точки зору дієтології частини або дієтичної композиції даного винаходу може забезпечити амінокислоти протягом більш тривалого періоду, що приводить до збереження ваги або збільшення ваги.

Не обмежуючись якою-небудь теорією, втрата ваги у мишей, що отримували амінокислотну дієту без Phe, також могла бути викликана відсутністю мінімально необхідної кількості Phe в раціоні, оскільки можливо, що тварини досягали катаболічного метаболізму, в якому ендогенний білок метаболізувався для підтримки необхідних рівнів Phe в крові. Таке явище також можна спостерігати у пацієнтів з PKU, які страждають від недоїдання, які метаболізують ендогенний білок і, в свою чергу, страждають від підвищених рівнів Phe в крові. Повна і абсолютна відсутність Phe в раціоні пацієнтів з PKU небажана і неможлива, відповідно пацієнти з PKU отримують мінімальну кількість незамінної амінокислоти Phe з їжею. З іншого боку, у пацієнтів, які страждають на PKU, може мати місце недоїдання, оскільки сувора дієта також може привести до нестачі інших незамінних амінокислот. Таким чином, використання рекомбінантного дієтичного білка даного винаходу або його задовільної з точки зору дієтології частини або дієтичної композиції даного винаходу може запобігти недоїданню у пацієнтів з PKU.

Приклади

Приклад 1 - Відкриття гена-кандидата

Для ідентифікації потенційних білків-кандидатів, які відповідають необхідним критеріям для

харчового білка, що не містить фенілаланіну, був використаний алгоритм пошуку, розроблений авторами даного винаходу. Послідовності білків з різних родів або видів були отримані з бази даних UniProt (<http://www.uniprot.org>) з використанням функції імпорту CLC Main Workbench 6.6.1.

5 Були використані білки, які походять з видів, які є загальноприйнятими джерелами їжі, такими як овочі (наприклад, картопля), але також які походять з мікроорганізмів (наприклад, дріжджів) або тварин (наприклад, великої рогатої худоби). Або латинська, або загальноприйнята назва вигляду/роду, залежно від того, яка назва привела до більшої кількості відповідності (результатів пошуку), використовувалася як рядок пошуку. Всі результати пошуку, за винятком неохарактеризованих білків, були завантажені, в результаті чого загальна кількість=836037 послідовностей була отримана з різних видів. Наступні рядки пошуку були використані для визначення відповідності (результатів пошуку), перерахованої в таблиці 2.

10 Функція "Створити статистику послідовностей" в CLC з партіями від 5000 до 10000 послідовностей була надалі використана для створення списків амінокислот, присутніх в кожному з 836037 генів. Ці списки були імпортовані в Excel, де амінокислотний склад порівнювався з двома стандартами харчування: так званий принцип картопля-яйця (Kartoffel-Ei Standard, KES), а також з амінокислотним складом, який виробник Мілора використовує в своєму продукті PKU1, сумішшю амінокислот без Phe, що застосовується для лікування хворих з PKU.

15 Крім того, була проаналізована загальна кількість Phe в амінокислотній послідовності, а також загальна кількість амінокислот. Всі проаналізовані фактори були оцінені відповідно до установок в таблиці 3.

Таблиця 2

Рядки пошуку для відбору генів і відповідного числа відповідності (результатів пошуку)

Рядок пошуку	Результати пошуку	Рядок пошуку	Результати пошуку	Рядок пошуку	Результати пошуку
Lactobacillus	259251	Porphyra	1214	Манго	241
Bifidobacterium	80262	Gadus	1084	Merluccius	231
Saccharomyces cerevisiae	73620	Psetta	979	Clupea	221
Oryza	67411	Муха	898	Lophius	163
Кукурудза	63309	Полуниця	739	Echinochloa	154
Bacillus subtilis	47456	Secale	721	Equisetum arvense	146
Просо	40273	Морква	668	Urchloa	145
Мишій	39691	Spinacia oleracea	624	Пшениця+ зберігання	112
Solanum lycoperison	37921	Турецький горох	584	Digitaria	101
Coprgo	34201	Thunnus	551	Hypericum perforatum	84
Ячмінь	26663	Latuca sativa	500	Achillea millefolium	81
Salmo	14939	Linum usitatissimum	499	Сардина	76
Triticum	8766	Шавлія	472	Pollachius	60
Bos taurus	7498	Cucurbita	401	Plantago lanceolata	57
Citrus (Цитрусові)	5694	Cucurbita	395	Verbascum	45
Sus scrofa	4905	Pennisetrum	374	Тимус	44
Sebastes (морські окуні)	2980	Crataegus	289	Viscum album	44
Картопля	2548	Eragrostis	288	Urtica dioica	42
Ipomoea	1635	Eleusine	288	Ромашка	40
Cyprinus	1559	Coix	274	Rosmarinus officinalis	24
Essox	1509	Papalum	245	Tussilago farfara	18

Результати пошуку із загальною оцінкою вище за 20 (сума оцінок за вміст Phe, молекулярну масу і відхилення відносно KES і PKU1 одного білка) оцінювали вручну з точки зору стану послідовності (повна або часткова), існування білка (докази на рівні білка, прогностичні, виведені виходячи з гомології), функції білка і алергенності (<http://www.allergenonline.org>, ковзне 8-вимірне вікно). Білки з повною послідовністю, доказами на рівні білка і відсутністю алергенності були заздалегідь відібрані і додатково проаналізовані на предмет їх молекулярної функції. Всі білки, які мають відому або передбачену активність зв'язування ДНК/РНК, а також токсичні білки були виключені зі списку потенційних кандидатів.

Серед кандидатів, що залишилися, був ідентифікований "Білок загального стресу 16O (G16O\_BACSU)" з *Bacillus subtilis* (штаму 168) як прийнятний білок-кандидат.

На основі послідовності білка, опублікованої в UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)), був сконструйований синтетичний ген, використовуючи функцію зворотної трансляції CLC Main Workbench.

Таблиця 3

Оцінка білків-кандидатів

Вміст фенілаланіну		Молекулярна маса		Відхилення в амінокислотному складі відносно PKU1 і KES (без F, Q, N)	
загальна кількість Phe	Оцінка	AS	Оцінка	Відхилення	Оцінка
>10	-10	>500	0	>80	-2
<10	1	<500	1	<80	0
<6	2	<200	2	<60	2
<3	4	<80	0	<40	5
<2	8	<50	-100	<30	10
<1	10				

\*Відхилення розраховується як додане абсолютне значення між кожною амінокислотою в аналізованій послідовності білка порівняно з контрольним складом KES і PKU1 (в процентах).

Дві послідовності епітопних міток (Tag54-P15, His6-мітку) додавали до 3'-кінця кодуєчої білок загального стресу (GSP) послідовності для забезпечення можливості виявлення конкретного білка, його кількісної оцінки і очищення, що приводило до нуклеотидної послідовності, представленої в SEQ ID NO:7. Крім того, сайти рестрикції ферментів BamHI і AatII були додані до 5'- і 3'-кінця, що дозволяє клонувати генну конструкцію в експресійний вектор.

Послідовність гена була позначена як GSP105 і оптимізована відносно частоти використання кодонів і стабільності РНК для експресії в *Bacillus subtilis* і згодом синтезована GenScript (США).

Приклад 2 - Продукція в *B. subtilis*

Синтетичний ген GSP105, що має нуклеотидну послідовність, представлену в SEQ ID NO:7, вбудовували у вектор рHT43 для експресії в *Bacillus subtilis* (MoBiTec, Göttingen, Німеччина), забезпечуючи можливість секреції рекомбінантного білка в культуральне середовище, і вводили в дефектний по протеазі штам WB800N *B. subtilis* (MoBiTec), слідуючи інструкціям виробників.

Після трансформації позитивні клони відбирали на чашках для відбору за допомогою антибіотиків; присутність експресійного вектора додатково підтверджували за допомогою ПЛР, екстракції плазмиди і подальшого секвенування ДНК. Маточні культури в гліцерині були отримані і зберігалися при -80 °С.

Заквашувальну культуру рекомбінантного *B. subtilis* GSP105 готували шляхом інокуляції в 1 л ТВ-середовища (Carl Roth, Karlsruhe, Німеччина), доповненого хлорамфеніколом (Carl Roth) і неоміцином (Carl Roth) в кінцевих концентраціях 5 мкг/мл кожного, 1 мл розчини маточної культури *B. subtilis* GSP105. Культуру вирощували протягом 24 год. при 28 °С і 160 об/хв. в 2,5 л "Ultra Yield Flasks" (Thomson Instrument Company, Каліфорнія, США).

Для експресії рекомбінантного білка в ТВ-середовище, доповнене хлорамфеніколом і неоміцином, інокулювали заквашувальну культуру в співвідношенні 1:20 (об'єм/об'єм). Для індукції експресії цільового білка додавали IPTG до кінцевої концентрації 0,5 мкМ. Культуру вирощували протягом 20 год. при 37 °С і 160 об/хв.

Після культивування клітини видаляли центрифугуванням з подальшою стерилізацією

фільтруванням з використанням модуля для фільтрації з порожнистими волокнами 0,22 мкм (N02-E20U-05-N, Spectrum Labs, Лос-Анджелес, США) зі швидкістю 2,5 л/хв. при трансмембранному тиску до 1,6 бар. З метою зменшення технологічного об'єму освітлений супернатант культури концентрували в 10 раз з використанням модуля з порожнистих волокон з відсічкою 10 кДа (N02-E010-05-N, Spectrum Lab) зі швидкістю 2,5 л/хв. при трансмембранному тиску до 1,6 бар.

GSP105 очищали зі сконцентрованого супернатанта культури за допомогою ІМАС з використанням 500 мл хелатуючої сефарози (GE Healthcare, Uppsala, Швеція), упакованої в колонку ХК 50/40 і наповненої іонами Zn відповідно до інструкцій виробника. Супернатант завантажували на колонку зі швидкістю 76 см/год.; після цього колонку промивали 5 об'ємами колонки (CV) PBS зі швидкістю 92 см/год. Зв'язаний білок елюювали з колонки з використанням 5 CV PBS, рН 8,0, 250 мМ імідазолу зі швидкістю 92 см/год. Фракції елюції з колонки для ІМАС об'єднували, і буфер замінювали на воду без солі з використанням модуля з порожнистих волокон з відсічкою 10 кДа (S02-E010-05N, Spectrum Labs) зі швидкістю 900 мл/хв. при трансмембранному тиску до 1,6 бар. Для забезпечення ефективного обміну буфера об'єм зразка замінювали сім разів. Очищений і повторно забуферений білок зберігали при -20 °С і потім ліофілізували і висушували розпиленням.

Концентрацію GSP105 визначали за допомогою конкурентного ELISA (Piotrkowski et al., PLoS ONE, 2012, 7 (9): e45803), цілісність і ступінь чистоти білка підтверджували за допомогою електрофорезу в SDS-гелі і імуноблота (Rasche et al).

Приклад 3 - Дослідження годування мишей (експериментальне дослідження)

План дослідження:

Шість дорослих самців гомозиготних мишей з PKU (Pah<sup>enu2/2</sup>; Shedlovsky et al., Genetics 1993, 134:1205; <http://www.pahdb.mcgill.ca/?Topic=Information&Section=Mouse&Page=1>) були розділені на групи по 2 миші в кожній групі. Тварини, що належать до однієї і тієї ж групи, знаходилися в одній клітці. Групи отримували дієти, перераховані в таблиці 4. Основні відмінності між дієтами полягали в білковому компоненті і вмісті Phe, як показано в таблиці 5. Перед дослідженням годування мишей з PKU годували, використовуючи стандартні для мишей раціони. Дослідження годування продовжувалося протягом 28 днів, протягом яких тваринам давали їжу і воду необмежено.

Таблиця 4

Групи тварин і дієти для тварин (N=6)

Група тварин	Дієта	Кількість тварин
1	Стандартний для мишей раціон	2
2	Дієта на основі білка GSP105 без Phe	2
3	Амінокислотна дієта без Phe	2

Таблиця 5

Дієти для тварин

Дієта	% білка	Вміст Phe
Стандартний для мишей раціон	18,5 (сирий білок)	Сирий білок (казеїн)
Дієта на основі білка GSP105 без Phe	18,5 (GSP105)	GSP105, з додаванням 2 г/кг Phe
Амінокислотна дієта без Phe (Harlan Teklad, TD.97152)	15,4 (вільні амінокислоти)	3 заміною 1,5 % тирозином

"Дієта на основі білка GSP105 без Phe" або "дієта на основі GSP105 без Phe" стосується дієти, в якій єдиним джерелом амінокислот є рекомбінантний дієтичний білок GSP105, доповнений 0,2 % Phe. Дієта на основі білка GSP105 без Phe не була повністю вільною від Phe. Очищена фракція білка GSP105 містила невелику кількість домішки, ймовірно, в результаті слідів середовища або вторинних метаболітів, яка становила 0,45 г Phe на 100 г загального білка. Сам білок GSP105 був повністю вільний від Phe. Незначна домішка Phe не створювала яких-небудь проблем для мишей з PKU. Більше того, оскільки Phe є незамінною амінокислотою, і тваринам не було надано альтернативних джерел поживних речовин, кристалічний Phe додавали до дієти на основі білка GSP105 без Phe до кінцевої концентрації Phe, що становить

0,2 %.

"Амінокислотна дієта без Phe" стосується дієти, в якій єдиним джерелом амінокислот є суміш вільних амінокислот без Phe, але з 1,5 % Туг, яка нагадує сучасний стандарт в медичних харчових продуктах для пацієнтів з PKU. Амінокислотна дієта без Phe не містила зовсім Phe, в той час як вміст тирозину було збільшено до 1,5 %.

У "стандартному для мишей раціоні" єдиним джерелом білка був казеїн.

У дні 0, 1, 7, 14, 21 і 28 відбирали 5-10 мкл крові з хвостової вени тварин після голодування протягом 4 годин. Вміст Phe і тирозину в плазмі крові визначали за допомогою тандемної мас-спектрометрії.

У дні 0, 1, 2, 4 і 7 мишей зважували і перевіряли їх загальний стан здоров'я.

У дні 14, 21 і 28 мишей тільки зважували. У день 28 всі тварини були умертвлені за допомогою CO<sub>2</sub>. Печінку, нирки, головний мозок і серце кожної тварини збирали і заморожували в рідкому азоті для подальших аналізів.

Результати:

Вага тіла

Отримання стандартного для мишей раціону в принципі приводило до збереження ваги (фіг. 1, суцільні лінії з квадратами). При отриманні дієти на основі білка GSP105 без Phe миші з PKU набирали вагу (фіг. 1, пунктирні лінії з кружками), в той час як ті миші, які отримували амінокислотну дієту без Phe, продемонстрували невелику втрату ваги (фіг. 1, розірвані лінії з трикутниками). Хоча невеликий розмір групи не дозволив провести статистичний аналіз, тенденція, що спостерігається, підтримує GSP105 як білковий компонент, прийнятний для збереження ваги і/або збільшення ваги. Збільшення ваги, що спостерігається, може бути пов'язане з тим, що це дієтичний білок з більш високою біологічною цінністю, ніж казеїн.

Зниження рівнів Phe в крові

Миші з PKU на стандартному для мишей раціоні зберігали підвищений середній рівень Phe в крові (фіг. 2, суцільна лінія з квадратами). Амінокислотна дієта без Phe привела до різкого зниження середніх рівнів Phe в крові (<360 мікромолів на літр, фізіологічний діапазон, на який націлено лікування PKU) (фіг. 2, розірвана лінія з трикутниками). Середні рівні Phe в крові тварин на дієті на основі білка GSP105 без Phe також були явно знижені, досягаючи <360 мікромолів на літр через 28 днів (фіг. 2, пунктирна лінія з кружками). Ці результати вказують на те, що розкритий рекомбінантний дієтичний білок придатний для дієтотерапії PKU.

Не піддані лікуванню миші з PKU з генетичним фоном C57BL/6 мають коричневе забарвлення шерсті на відміну від чорного забарвлення шерсті, що спостерігається у мишей дикого типу з тим же фоном, явище, яке називається гіпопигментацією. Підвищені рівні Phe в крові інгібують фермент тирозиназу, який порушує синтез пігменту меланіну. Зниження рівнів Phe в крові мишей, які отримували дієти, що не містять Phe або які мають низький вміст Phe, приводило не до повністю повної, а до часткової реверсії гіпопигментації на всьому тілі тварин (фіг. 3). На фіг. 3 продемонстровані типові миші з кожної групи дієти з диференціально вираженими, більш або менш частковими змінами гіпопигментації шерсті миші після 28 днів годування. Кожна миша показана з боку спини і з черевної сторони. Миші, які отримували дієту на основі білка GSP105 без Phe, мали майже повністю чорне забарвлення з черевної сторони. Чорні і білі стрілки вказують на найбільшу реверсію гіпопигментації після періоду годування. Автори даного винаходу допускають повну реверсію забарвлення шерсті з коричневого на чорний у разі дієт без або з низьким вмістом Phe у випадку тривалого періоду годування.

Відношення Phe/Туг в плазмі крові

До найменшого відношення Phe/Туг в плазмі крові мишей з PKU приводила амінокислотна дієта без Phe (фіг. 4, розірвані лінії з трикутниками), за якою йшла дієта на основі білка GSP105 без Phe (фіг. 4, пунктирні лінії з кружками). Миші з PKU на стандартному для мишей раціоні представлені на фіг. 4 у вигляді суцільних ліній з квадратами як контроль. Відношення Phe/Туг у разі дієти на основі білка GSP105 без Phe можна було б поліпшити, зменшивши кількість домішки Phe в очищеному рекомбінантному дієтичному білку GSP105 і/або додавши кристалічний тирозин, що використовується в амінокислотній дієті без Phe, або додавши дизайнерський хвіст, що містить тирозин.

Приклад 4 - Вимірювання концентрацій Phe і Туг в головному мозку мишей з PKU з прикладу

Методи:

Підготовка тканини головного мозку миші

Використовували головний мозок тварин з прикладі 3. Суцільно заморожений головний мозок миші розморожували на льоду і лізували в буфері для гомогенізації (10 мкл/мг тканини), який містить 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитіотреїтол, 0,2 мМ

фенілметилсульфонілфторид, 1 мкМ лейпептин і 1 мкМ пепстатин, і гомогенізували з використанням Quiagen TissueLyser II при 4 °С. Після центрифугування при 13000×g і 4 °С протягом 30 хвилин супернатанти зберігали замороженими при -80 °С.

#### Вимірювання білка

5 Концентрації білка в гомогенізованих тканинах визначали спектрофотометричним методом, описаним Бредфордом, з використанням  $\gamma$ -глобуліну як калібратора.

#### Приготування і дериватизація зразків

Зразки готували відповідно до посібника Phenomenex EZ:faast™, з наступними модифікаціями: перед екстракцією і дериватизацією амінокислот по 20 мкл кожного розчину внутрішнього стандарту, що містить 100 мкмоль/л Phe-d5 і 20 мкмоль/л Tyr-d4 (в 50 ммоль/л HCl), додавали до 40 мкл лізату зразки. Використовуючи реагенти з набору, амінокислоти піддають дериватизації з використанням пропілхлорформіату, що приводить до додавання пропілформіату в амінний фрагмент і пропільної групи в карбоксильний кінець амінокислот, відповідно. Гідроксигрупу Tyr також дериватизують шляхом додавання пропілформіатної групи.

#### 15 Обладнання

Для розділення амінокислот за допомогою HPLC зі зворотною фазою використовували колонку C18 розміром 250×2 мм (Phenomenex EZ:faast™). Дериватизовані амінокислоти розділяли, використовуючи наступну програму: (i) ізократичний потік 75 % розчинника В протягом 6 хвилин; (ii) лінійний градієнт від 75 % до 95 % розчинника В (об'єм/об'єм) протягом 9 хв.; (iii) лінійний градієнт від 95 % до 100 % розчинника В протягом 0,1 хв.; (iv) ізократичний потік 100 % розчинника В протягом 3 хв.; (v) лінійний градієнт від 100 % до 75 % розчинника В протягом 0,1 хв.; (vi) ізократичний потік 75 % розчинника В протягом 2 хв.. Розчинники А і В являли собою 10 ммоль/л форміату амонію в H<sub>2</sub>O і 10 ммоль/л форміату амонію в метанолі, відповідно. Швидкість потоку становила 150 мкл/мл, а об'єм вприску становив 10 мкл. Для аналізу за допомогою LC-ESI-MSMS використовувалася система PerkinElmer SCIEX API 2000 LC-ESI-MSMS, оснащена автодозатором PerkinElmer Series 200 і двома мікронасосами PerkinElmer Series 200. Амінокислоти отримували, використовуючи режим визначення позитивних іонів в режимі моніторингу множинних реакцією (MRM), з наступними переходами: 294→206 (Phe), 299→211 (Phe-d5), 302→214 (Phe-d8), 396→308 (Tyr) і 400→312 (Tyr-d4). Час витримання становив 500 мс. Мас-спектри отримували в інтервалі часу від 6 до 20 хв.

#### 30 Результати:

##### Зниження рівня Phe в головному мозку

На фіг. 5 представлені середні концентрації Phe і Tyr в головному мозку мишей дикого типу (WT) і мишей, які страждають на PKU, що отримували стандартний для мишей раціон, дієту на основі білка GSP105 без Phe або амінокислотну дієту без Phe.

Середні концентрації амінокислот фенілаланіну і тирозину в головному мозку мишей дикого типу (WT) були приблизно однаковими (0,31 нмоль Phe/мг білка; 0,36 нмоль Tyr/мг білка) (фіг. 5), що нагадувало ситуацію у здорових людей.

40 Навпаки, в середній концентрації Phe в головному мозку мишей з PKU, що отримували стандартний для мишей раціон (група 1), відмічалось 10-кратне збільшення (Phe 3,82 нмоль/мг білка) з низькою середньою концентрацією Tyr, що становить 0,18 нмоль/мг білка, що відповідає ситуації у не підданих лікуванню пацієнтів з PKU.

45 Отримання дієти на основі білка GSP105 без Phe (група 2) привело до зниження середньої концентрації Phe в головному мозку на 50 % (Phe 1,78 нмоль/мг білка) порівняно з отриманням стандартного для мишей раціону, в той час як середня концентрація Tyr залишалася низький (0,15 нмоль/мг білка).

Найнижчий середній рівень Phe в головному мозку і найвищий середній рівень Tyr в головному мозку були досягнуті при використанні амінокислотної дієти без Phe в групі 3 (Phe 1,16 нмоль/мг білка; 0,22 нмоль/мг білка).

50 Результати аналізу концентрацій Phe і Tyr в головному мозку мишей WT, а також підданих і не підданих лікуванню мишей з PKU були порівнянні з відповідними рівнями Phe і Tyr в крові у різних груп годування тварин (фіг. 2 і 4).

55 Найбільш сильне зниження концентрації Phe в головному мозку було отримане у разі амінокислотної дієти без Phe. Беручи до уваги, що вплив дієти з низьким вмістом Phe на рівні Phe в головному мозку відстрочений і не так різкий, як вплив на концентрацію Phe в крові, автори даного винаходу допускають подальше зниження Phe в головному мозку протягом тривалого періоду годування з використанням дієти на основі білка GSP105 без Phe. Ця гіпотеза оснований на спостереженні, що рівні Phe в крові в цій групі приблизно відповідали концентраціям Phe в крові у мишей, які отримували амінокислотну дієту без Phe, після періоду 60 годування, що становить 28 днів.

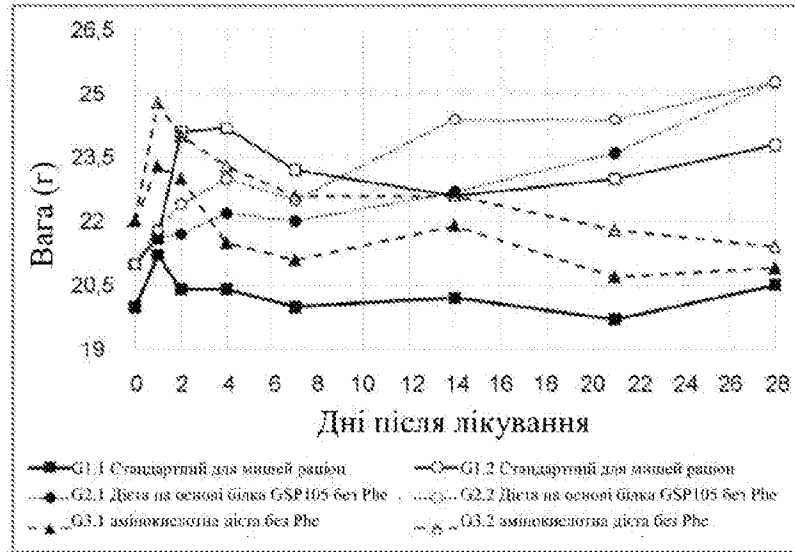
Середнє відношення Phe/Тур в головному мозку

На фіг. 6 представлені середні відношення Phe/Тур в головному мозку мишей WT і мишей, які страждають PKU, що отримували стандартний для мишей раціон, дієту на основі білка GSP105 без Phe або амінокислотну дієту без Phe.

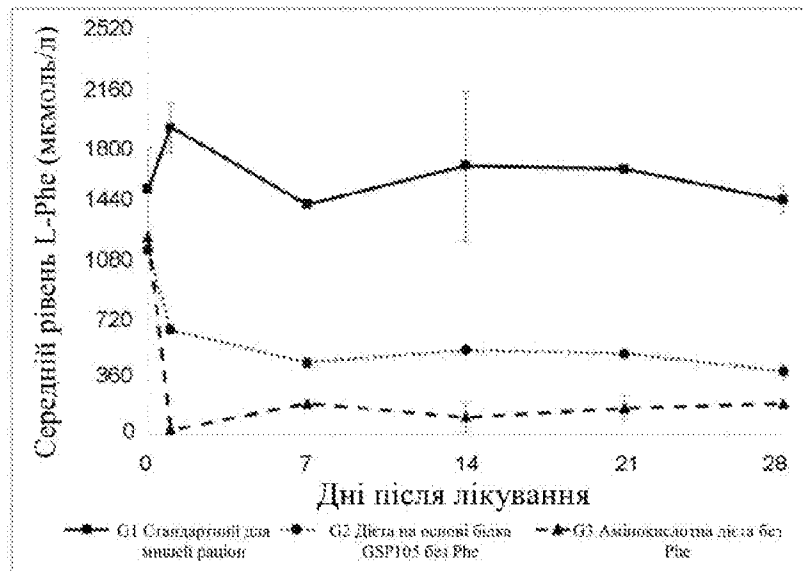
5 До найменшого відношення Phe/Тур в головному мозку мишей з PKU приводила амінокислотна дієта без Phe (фіг. 6, стовпець з ромбоїдальними шашечками), за якою йшла дієта на основі GSP105 без Phe (фіг. 6, стовпець з діагонально розташованими смужками). Миші з PKU на стандартному для мишей раціоні представлені на фіг. 6 у вигляді білого стовпця з чорною рамкою. Вказане вище відношення Phe/Тур значно краще, ніж у мишей з PKU на стандартному раціоні. Дієта на основі білка GSP105 без Phe могла б бути поліпшена шляхом зменшення кількості домішки Phe з очищеного рекомбінантного дієтичного білка GSP105 і/або шляхом додавання кристалічного тирозину, що використовується в амінокислотній дієті без Phe, або додавання дизайнерського хвоста, який містить тирозин.

#### 15 ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

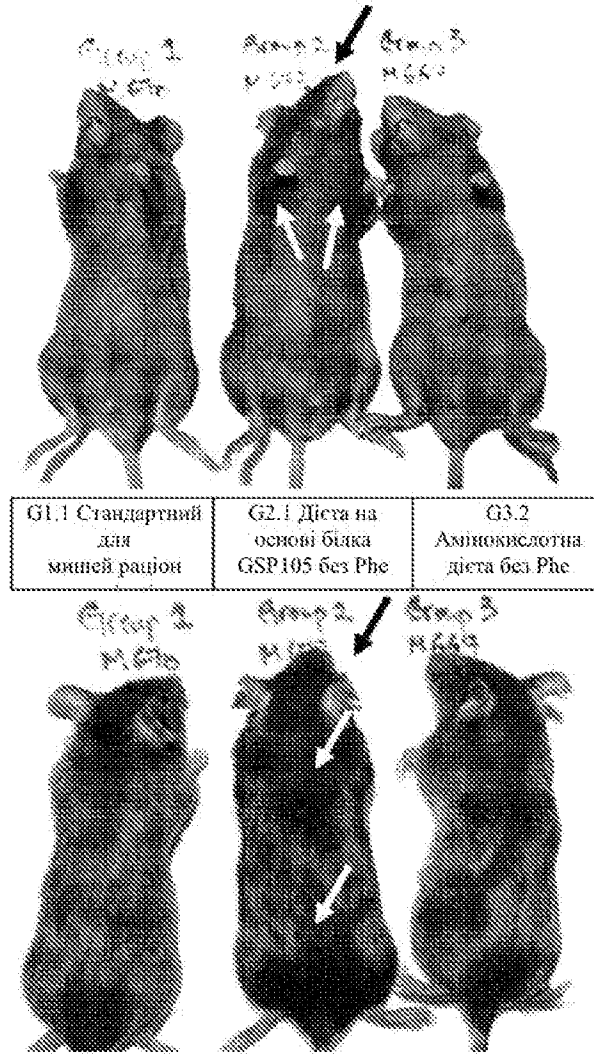
1. Рекомбінантний дієтичний білок, який включає поліпептидну послідовність, яка на щонайменше 90 % ідентична послідовності SEQ ID NO:2, причому вказаний білок не містить фенілаланіну.
- 20 2. Рекомбінантний дієтичний білок за п. 1, в якому вказана поліпептидна послідовність ідентична на щонайменше 95 % послідовності SEQ ID NO:2.
3. Рекомбінантний дієтичний білок за п. 1 або 2, який, крім того, включає одну або більше додаткових білкових послідовностей, причому вказана білкова послідовність являє собою мітку для очищення або мітку.
- 25 4. Рекомбінантний дієтичний білок за п. 3, в якому додаткова білкова послідовність являє собою поліпептидну мітку, що включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3.
5. Вектор, який включає послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує рекомбінантний дієтичний білок за будь-яким з пп. 1-4.
6. Рекомбінантний мікроорганізм, що містить вектор за п. 5.
- 30 7. Рекомбінантний мікроорганізм за п. 6, причому мікроорганізм вибирають з групи, яка складається з: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Saccharomyces*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Aspergillus*, *Gluconobacter*, *Mycobacterium*, *Actinomycetes*, *Caulobacter*, *Pichia*, *Corynebacterium glutamicum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clostridium botulinum*, *Flavobacterium heparinum*, *Lactococcus lactis*, *Methylobacterium extorquens*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ralstonia eutropha*, *Neurospora crassa*, *Arxula adenivorans*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* і *Bacillus megaterium*.
- 35 8. Рекомбінантний мікроорганізм за п. 7, причому вказаним мікроорганізмом є мікроорганізм роду *Bacillus* або *Pseudomonas*.
- 40 9. Рекомбінантний мікроорганізм за п. 8, причому вказаний мікроорганізм являє собою *Bacillus subtilis* або *Pseudomonas fluorescens*.
10. Спосіб продукування рекомбінантного дієтичного білка за будь-яким з пп. 1-4, який включає культивування рекомбінантного мікроорганізму за будь-яким з пп. 6-9 в умовах, прийнятних для продукції дієтичного білка рекомбінантним мікроорганізмом.
- 45 11. Дієтична композиція, яка містить рекомбінантний дієтичний білок за будь-яким з пп. 1-4 і додаткові наповнювачі.
12. Дієтичний білок за будь-яким з пп. 1-4, який містить не більше ніж 0,45 г фенілаланіну на 100 г білка, або дієтична композиція за п. 11, яка містить не більше ніж 0,1 г фенілаланіну на 100 г білка.
- 50 13. Застосування дієтичного білка за будь-яким з пп. 1-4 або дієтичної композиції за п. 11 як лікарського засобу.
14. Застосування дієтичного білка за будь-яким з пп. 1-4 або дієтичної композиції за п. 11 при лікуванні порушення, що характеризується накопиченням фенілаланіну в організмі.
- 55 15. Застосування за п. 14, причому вказаним порушенням є гіперфенілаланінемія, переважно оксифенілкетонурія.



Фіг. 1

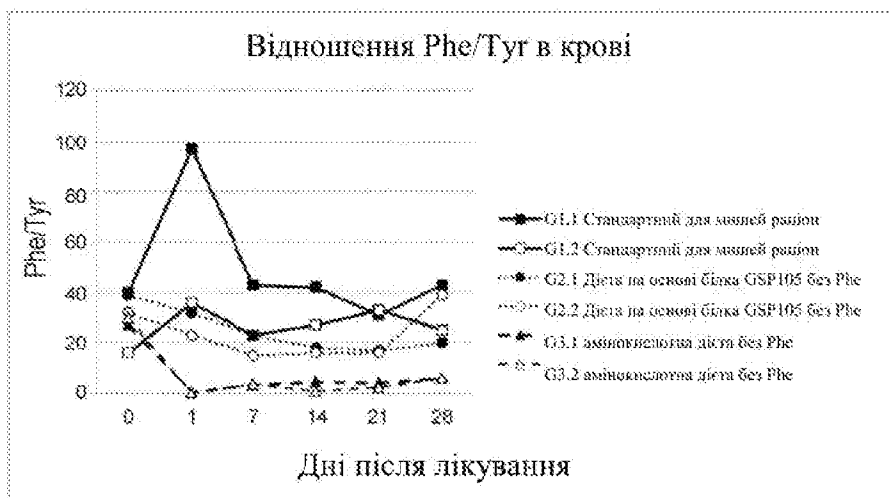


Фіг. 2

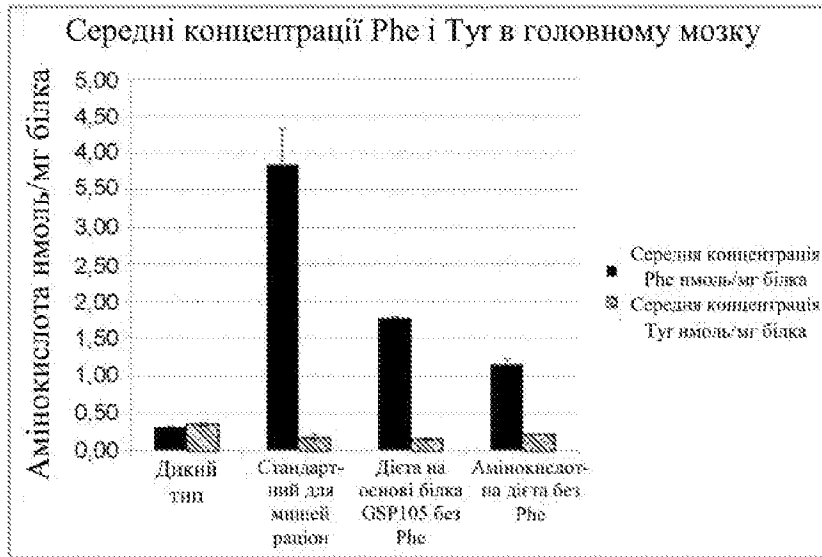


G1.1 Стандартний для мишей раціон	G2.1 Дієта на основі білка GSP105 без Phe	G3.2 Амінокислотна дієта без Phe
-----------------------------------	---	----------------------------------

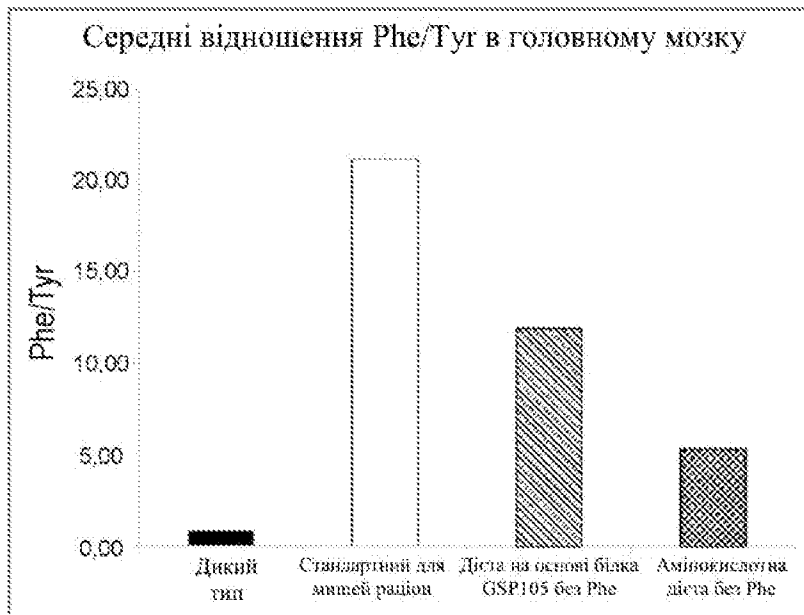
Фіг. 3



Фіг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6