



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(22) Дата подачи заявки
2018.02.12

(51) Int. Cl. *A61K 38/51* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(54) СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ ФЕНИЛАЛАНИН-АММИАКЛИАЗЫ

(31) 62/458,232; 62/565,555

(32) 2017.02.13; 2017.09.29

(33) US

(86) PCT/US2018/017773

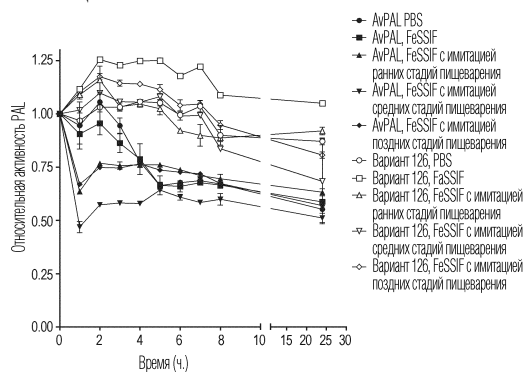
(87) WO 2018/148633 2018.08.16

(71) Заявитель:
КОДЕКСИС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Чнг Чинпинг, Хэллоуз Уилльям
Кейси, Агард Николас Дж., Алвизо
Оскар, Деллас Никки, Хейсман Гьялт
В., Николз Джон Джозеф (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам фенилаланин-аммиаклиазы (PAL) и их композициям, а также к полинуклеотидам, кодирующим сконструированные полипептиды фенилаланин-аммиаклиазы (PAL). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL оптимизируют для обеспечения повышенной каталитической активности, а также сниженной чувствительности к протеолизу и повышенной переносимости хранения при повышенных температурах. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL содержат меньше остатков фенилаланина, чем полипептиды PAL дикого типа. Настоящее изобретение также относится к способам применения композиций, содержащих сконструированные полипептиды PAL, для терапевтических и промышленных целей.



ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-558141ЕА/045

СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ ФЕНИЛАЛАНИН-АММИАКЛИАЗЫ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет временной патентной заявки США № 62/565555, поданной 29 сентября 2017 года, и временной патентной заявки США № 62/458232, поданной 13 февраля 2017 года, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме для всех целей.

ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ТАБЛИЦУ ИЛИ КОМПЬЮТЕРНОЕ ПРИЛОЖЕНИЕ СО СПИСКОМ, ПОДАННЫЕ В ВИДЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА ASCII

[0002] Список последовательностей, приведенный в файле CX7-159USP1_ST25.TXT, созданном 10 февраля 2017 года, имеющем размер 44 килобайта и машиночитаемый формат IBM-PC, подходящий для операционной системы MS-Windows, включен, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам фенилаланин-аммиаклиазы (PAL) и их композициям, а также полинуклеотидам, кодирующим сконструированные полипептиды фенилаланин-аммиаклиазы (PAL). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL оптимизируют для обеспечения повышенной каталитической активности, а также сниженной чувствительности к протеолизу и повышенной переносимости хранения при повышенных температурах. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL содержат меньше остатков фенилаланина. Изобретение также относится к применению композиций, содержащих сконструированные полипептиды PAL, для терапевтических и промышленных целей.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Фенилаланин-аммиаклиаза (PAL) вместе с гистидин-аммиаклиазой (HAL) и тирозин-аммиаклиазой (TAL) являются представителями семейства лиаз ароматических аминокислот (EC4.3.1.23-1.25 и 4.3.1.3). Более конкретно, ферменты, имеющие активность PAL (EC4.3.1.23-1.25 и ранее классифицированные как EC4.3.1.5) катализуют неокислительное дезаминирование L-

фенилаланина в (Е)-коричную кислоту. PAL является ферментом, не принадлежащим млекопитающим, но широко распространенным в растениях, а также идентифицированным в грибах и ограниченном количестве бактерий.

[0005] Ферменты PAL можно использовать в качестве терапевтического белка для лечения метаболического расстройства, недостаточности фенилаланингидроксилазы (PAHD), более известного как фенилкетонурия (PKU). PKU является аутосомным метаболическим генетическим нарушением, при котором печеночный фермент фенилаланингидроксилаза (PAH) или один или более из ферментов, участвующих в синтезе или метаболическом цикле кофактора тетрагидробиоптерина, является частично функциональным или нефункциональным по причине мутации в соответствующих генах. Это отсутствие функционирования приводит к повышению уровня фенилаланина в кровотоке. В зависимости от типа мутации, концентрация фенилаланина в крови пациентов с PKU, как правило, составляет >360 мкМ. Фенилаланин преобразуется в фенилпироват (фенилкетон) и другие производные. У людей, если PKU не подвергают лечению на ранней стадии, высокие уровни фенилаланина и некоторых продуктов его распада могут вызывать значительные медицинские нарушения, включая умственную отсталость, микроцефалию и судороги. Множество исследований сфокусировано на использовании PAL в лечении PKU посредством замещения фермента (Ambrus et al., Science 201:837-839 [1978]; Bourget et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 10:57-59 [1984]; и Sarkissian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2339-2344 [1999]).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам фенилаланин-аммиаклиазы (PAL) и их композициям, а также полинуклеотидам, кодирующим сконструированные полипептиды фенилаланин-аммиаклиазы (PAL). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL оптимизируют для обеспечения повышенной каталитической активности, а также сниженной чувствительности к протеолизу и повышенной переносимости хранения при повышенных температурах. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL

содержат меньше остатков фенилаланина. Изобретение также относится к применению композиций, содержащих сконструированные полипептиды PAL, для терапевтических и промышленных целей. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам фенилаланин-аммиаклиазы (PAL) и их биологически активным фрагментам и аналогам, имеющим улучшенные свойства, такие как повышенная стабильность при хранении и/или сниженная чувствительность к протеолизу.

[0007] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам PAL и их биологически активным фрагментам и аналогам, имеющим улучшенные свойства по сравнению с ферментом PAL дикого типа или референсным полипептидом PAL, по существу, в тех же условиях. Изобретение дополнительно относится к способам применения сконструированных полипептидов PAL и их биологически активных фрагментов и аналогов в терапевтических и/или промышленных композициях и способам применения таких композиций для терапевтических и/или промышленных целей.

[0008] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам, содержащим аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичны по последовательности по меньшей мере одной из SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12, где положения аминокислот в аминокислотных последовательностях пронумерованы относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2 или другую аминокислотную последовательность, обозначенную в качестве референсной последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам, содержащим аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 85% или более идентичны по последовательности по меньшей мере одной из SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12, где положения аминокислот в аминокислотных последовательностях пронумерованы относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2 или другую аминокислотную последовательность, обозначенную в качестве референсной последовательности. В некоторых вариантах осуществления

настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам, содержащим аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 90% или более идентичны по последовательности по меньшей мере одной из SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12, где положения аминокислот в аминокислотных последовательностях пронумерованы относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2 или другую аминокислотную последовательность, обозначенную в качестве референсной последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам, содержащим аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 95% или более идентичны по последовательности по меньшей мере одной из SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12, где положения аминокислот в аминокислотных последовательностях пронумерованы относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2 или другую аминокислотную последовательность, обозначенную в качестве референсной последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам, содержащим аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 98% или более идентичны по последовательности по меньшей мере одной из SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12, где положения аминокислот в аминокислотных последовательностях пронумерованы относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2 или другую аминокислотную последовательность, обозначенную в качестве референсной последовательности. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам, содержащим аминокислотные последовательности, содержащие по меньшей мере одну из SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12, где положения аминокислот в аминокислотных последовательностях пронумерованы относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2 или другую аминокислотную последовательность, обозначенную в качестве референсной последовательности.

[0009] Настоящее изобретение также относится к

сконструированным полипептидам, содержащим по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 16, 16/150, 44/56, 44/56/102/239/285/469/470/495, 44/239, 44/239/285/469/495, 44/239/285/470, 44/239/469/470, 44/239/470/546, 44/239/495, 44/239/495/546, 44/469/470, 102, 102/470, 162, 165, 188, 239/285, 239/285/469, 239/469/470/495, 264, 267, 285/469/470/495, 285/470, 285/470/495, 364, 455, 469/470, 472 и 482, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:6. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированные полипептиды содержат по меньшей мере одну замену в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 16, 264, 364, 472, 482 и/или любых их комбинаций, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды содержат по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 16, 16/150, 162, 188, 264, 267, 398, 434, 472 и 482 и/или любых их комбинаций, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:6.

[0010] Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, содержащим по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 44/47/204/209/285, 44/47/364/470/495, 44/54/56/204/239/285/364/495, 44/54/56/204/239/470/495, 44/54/285/470, 44/102/285/364, 44/204/209/285, 44/204/285/364/470/495, 44/209/285/460/495, 44/285/364, 47/54/209, 47/204/209/239/285/495, 47/204/285/364/495, 47/209/239/364, 47/239/285/364, 47/470, 54, 54/56, 54/56/204/209/470, 54/56/204/209/495, 54/56/204/495, 54/56/209/562, 54/56/285/364/470, 54/56/285/470, 54/165/204/209/239/285/470/495, 54/239/495, 54/285/470, 54/470, 56, 165, 204, 204/209/239/285/470/495, 204/209/364, 204/209/364/495, 204/239, 204/239/285, 204/364, 204/470, 209/285/364/470, 209/285/364/470/495, 209/364, 209/364/495, 209/470, 239/364, 285/364, 285/364/495, 364, 364/470, 470 и 495 и/или любых их комбинаций, где положения аминокислот

пронумерованы относительно SEQ ID NO:8.

[0011] Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, содержащим по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 54/56/162/204/285, 54/56/162/204/398, 54/56/204/285, 54/56/204/398, 54/56/204/398/472, 54/56/285, 54/56/398, 54/56/398/472, 54/162/204/398, 54/162/398, 54/204/285/398/472, 54/204/398, 54/285/398, 54/285/398/472, 56/162/398, 56/204/285, 56/204/398, 56/204/398/460, 56/204/398/472, 56/285, 56/285/398/472, 56/398, 56/398/472 и 201/204/398 и/или любых их комбинаций, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды содержат по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 16, 18, 39, 47, 54, 59, 73, 91, 209, 214, 285, 290, 305, 307, 364, 407, 450, 470, 503, 521, 524 и 565 и/или любых их комбинаций, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:12.

[0012] Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам, содержащим по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 15/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/307/364/407/450/470/503/521/524/565, 16/18/19/214/407, 16/18/23/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565, 16/18/39/43/44/59/209/503/565, 16/18/39/45/47/54/59/73/98/209/214/285/290/305/364/407/450/470/503/521/524/565, 16/18/39/47/49/54/59/73/209/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524/565, 16/18/39/47/54/59/73/91/98/285/290/305/307/364/450/470/503/524/565, 16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/313/364/450/503/521/524/565, 16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524,

16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/
 503/521/524/565,
 16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/
 521/524/565,
 16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/503/
 521/524,
 16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/450/470/521/
 524/565,
 16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/364/407/450/503/521/
 524/565,
 16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/364/407/470/503/521/
 524,
 16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/307/364/407/450/470/503/
 524/565,
 16/18/39/47/54/59/73/91/209/285/290/305/307/407/450/503/521/524/
 565,
 16/18/39/47/54/59/73/91/209/285/290/307/364/407/470/503/521/524/
 565, 16/18/39/47/54/59/73/91/214/285/290/305/307/364/407/503,
 16/18/39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521,
 16/18/39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/
 524/565,
 16/18/39/47/54/59/73/91/285/290/305/364/407/470/503/521/524,
 16/18/39/47/54/59/73/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524
 /565,
 16/18/39/47/54/59/91/98/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503/
 521/524,
 16/18/39/47/54/59/91/209/214/285/290/305/307/364/450/470/503/521
 /524/565,
 16/18/39/47/54/59/91/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521
 /524/565,
 16/18/39/47/54/59/91/214/285/290/305/307/364/450/503/521/524,
 16/18/39/47/54/59/91/285/290/305/307/364/407/450/503/521/524,
 16/18/39/47/54/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/470/503/521
 /565,
 16/18/39/47/54/73/91/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521
 /524,

16/18/39/47/54/73/209/214/285/290/305/307/364/450/470/503/521/52
 4/565, 16/18/39/47/54/91/214/285/290/364/407/450/470/503/521,
 16/18/39/47/54/209/214/407/503/524/565,
 16/18/39/47/59/73/91/214/290/305/307/364/407/450/470/503/521,
 16/18/39/47/59/214/503/565, 16/18/39/47/91/290/407,
 16/18/39/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503
 /521/524,
 16/18/39/54/59/73/209/214/285/290/364/407/450/470/503/521/524/56
 5, 16/18/39/54/59/73/214/285/290/305/364/407/450/521/524/565,
 16/18/39/54/73/91/209/210/285/290/307/364/407/450/470/503/521/52
 4/565,
 16/18/39/54/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/52
 1/524,
 16/18/39/54/73/98/214/285/290/305/307/364/407/470/503/521/524/56
 5,
 16/18/39/54/73/209/285/290/305/307/364/407/470/503/521/524/565,
 16/18/39/54/91/214/285/290/364/450/470/503/521/524,
 16/18/39/91/503/521,
 16/18/47/54/59/73/91/98/285/290/364/407/450/470/503/521/524/565,
 16/18/47/54/59/73/98/209/290/305/307/364/450/470/503/521/524/565
 ,
 16/18/47/54/59/73/209/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524/56
 5,
 16/18/47/54/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/52
 1/524/565, 16/18/47/59/285/407/450/565,
 16/18/47/73/91/209/285/290/450/470/503/521/524,
 16/18/47/73/214/307/503, 16/18/47/73/290/407/450, 16/18/47/209,
 16/18/47/285/364/503/521, 16/18/47/364/407,
 16/18/54/59/73/91/209/285/290/305/307/364/407/450/503/521,
 16/18/54/59/290/407/450/503/524,
 16/18/54/73/91/214/285/290/407/561,
 16/18/54/91/209/214/285/290/307/364/407/450/503/521/524/565,
 16/18/54/407, 16/18/55/209/285/305, 16/18/59/209/450/503/524,
 16/18/73/209/214/450, 16/18/91/209/407/503,
 16/18/91/214/407/521/524/565, 16/18/209/450/503,
 16/18/214/407/450/503, 16/18/285/290/470, 16/18/503,

16/22/214/503/524/565,
 16/39/47/54/59/73/91/98/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/
 503/521/524/565,
 16/39/47/54/59/73/91/98/209/214/285/290/307/364/407/450/470/521/
 524/565,
 16/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503
 /521/524,
 16/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503
 /521/524/565,
 16/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/503/521
 /524/565,
 16/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/470/503/521
 /524/565,
 16/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/364/407/450/470/503/521
 /524,
 16/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/364/407/450/503/521,
 16/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/364/407/503/521/524/565
 ,
 16/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/307/450/470/503/521/524/565
 ,
 16/39/47/54/59/73/91/209/214/290/305/307/364/407/450/470/503/521
 /524/565,
 16/39/47/54/59/73/91/209/214/290/305/407/450/470/503/521/524/565
 ,
 16/39/47/54/59/73/91/209/285/290/305/307/364/407/470/503/521/524
 ,
 16/39/47/54/59/73/91/214/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524
 ,
 16/39/47/54/59/73/91/214/285/290/305/307/450/470/503/521/524/565
 , 16/39/47/54/59/73/91/214/285/290/305/364/407/450/503/524/565,
 16/39/47/54/59/73/91/214/285/290/307/364/407/450/503/521/524/565
 , 16/39/47/54/59/73/91/214/290/364/407/450/470/524/565,
 16/39/47/54/59/73/98/209/285/305/307/407/450/470/503/524,
 16/39/47/54/59/73/285/290/305/307/364/407/524,
 16/39/47/54/59/73/307/364/407/503/521/524,
 16/39/47/54/59/214/364/450/470/503/521/524,

16/39/47/54/73/91/209/214/285/290/407/450/470/521/524/565,
 16/39/47/54/73/91/209/307/364/407/470/503/521/524/565,
 16/39/47/54/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/5
 24, 16/39/47/54/209/214/285/290/305/307/364/470/503/521/524/565,
 16/39/47/54/209/307/503,
 16/39/47/59/73/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/524/5
 65, 16/39/47/73/91/285/290/307/364/450/470/503/521/524/565,
 16/39/47/73/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524,
 16/39/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/470/503/521/524/56
 5,
 16/39/54/59/73/91/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/52
 4/565,
 16/39/54/59/73/91/214/285/290/305/307/364/407/470/503/521,
 16/39/54/59/73/91/214/290/305/307/407/470/503/521/524/565,
 16/39/54/59/91/285/290/305/364/407/450/470/503/521/524/565,
 16/39/55/59/503/565, 16/39/73/364, 16/39/214/255/407/565,
 16/39/214/407/503/565, 16/39/214/524, 16/39/407/450/470/475,
 16/39/521/565,
 16/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/364/450/470/503/521/524/56
 5, 16/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/450/470/503/524/565,
 16/47/54/59/73/91/209/285/290/307/450/470/503/521/524/565,
 16/47/54/59/91/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 16/47/54/73/91/209/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524/565,
 16/47/54/91/209/470/524/565,
 16/47/54/91/285/290/305/307/407/450/503/521/524/565,
 16/47/54/214/290/364/407/503/521/524, 16/47/59/364/407/523,
 16/47/59/524,
 16/47/73/91/209/214/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524/565,
 16/47/73/91/214/285/407/565, 16/47/73/214/305/407/565,
 16/47/91/214/307/407/470/503/565,
 16/47/209/214/364/407/470/503/521/565, 16/47/209/407,
 16/47/407/450/524, 16/47/450/470/565, 16/47/450/521,
 16/54/59/73/91/209/214/285/290/307/450/470/503/524,
 16/54/59/73/91/290/307/364/450/470/503/521/524/565,
 16/54/59/91/209/364/407/450/521, 16/54/59/209/214/285/450,
 16/54/59/214/565, 16/54/73/91/285/290/305/307/407/450/470/524,

16/54/73/407/450/470/503, 16/59/73/91/370/503/524,
 16/59/73/407/450/503/565, 16/59/73/503/565,
 16/59/364/407/450/524, 16/73/91/209/470, 16/73/214/524,
 16/91/209/214, 16/91/209/214/364/450, 16/91/214/407/503,
 16/91/285/290/364/407, 16/209/214/407/503/524, 16/214/364/470,
 16/214/407/565, 16/214/470, 16/290/305/364/407/470/479,
 16/364/503/565, 16/407/470, 16/407/524/565, 16/450/470/524,
 16/565, 18, 18/22/39/91/214/285/450/470/503,
 18/39/47/54/59/73/91/98/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/
 503/521/524/565,
 18/39/47/54/59/73/91/98/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/
 503/524,
 18/39/47/54/59/73/91/98/214/285/290/305/307/364/450/470/503/524,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503
 /521/524,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503
 /524/565,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/521
 /524/565,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/503/521
 /524/565,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/470/503/521
 /524,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/503/521/524
 ,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/364/407/450/470/503/521
 /524,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/307/364/407/450/470/503/521
 /524/565,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/290/305/307/407/503/524/565,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/290/307/364/407/450/470/503/521/524
 /565,
 18/39/47/54/59/73/91/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503,
 18/39/47/54/59/73/91/209/290/307/364/407/470/503/521/565,
 18/39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524
 /565,

18/39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/450/470/503/524/565
, 18/39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/450/503/521/524,
18/39/47/54/59/73/91/285/290/307/364/450/470/503/524,
18/39/47/54/59/73/209/214/285/290/305/307/364/407/450/503/521/56
5, 18/39/47/54/59/73/214/285/290/305/364/407/450/470/503/524,
18/39/47/54/59/91/98/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521
/524,
18/39/47/54/59/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/52
1/524/565,
18/39/47/54/59/91/209/214/290/305/307/364/407/470/503/521/524/56
5,
18/39/47/54/59/91/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/52
4,
18/39/47/54/59/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/5
65, 18/39/47/54/59/209/285/290/305/307/407/450/503/521/524,
18/39/47/54/59/214/470/503/521/524,
18/39/47/54/73/91/98/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521
/524/565, 18/39/47/54/73/91/98/285/290/305/450/503/521/524/565,
18/39/47/54/73/91/98/290/305/307/364/450/470/503/521/524,
18/39/47/54/73/91/154/209/290/305/307/364/407/450/470/503/521/52
4/565,
18/39/47/54/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/52
1/524,
18/39/47/54/73/91/209/214/285/290/305/307/450/503/521/524/565,
18/39/47/54/73/91/209/214/285/290/307/364/407/450/470/503/521/52
4/565,
18/39/47/54/73/91/209/214/285/290/307/364/407/450/470/503/565,
18/39/47/54/73/91/209/285/290/305/307/364/407/470/521/524/565,
18/39/47/54/73/91/209/305/364/407/450/470/503/521,
18/39/47/54/73/91/285/290/305/307/364/407/450/503/521/524,
18/39/47/54/91/214/285/290/305/307/407/450/503/521/524,
18/39/47/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/450/470/503/521/52
4/565,
18/39/47/59/73/91/214/285/307/364/450/470/503/521/524/565,
18/39/47/59/73/98/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/52
4,
18/39/47/73/91/209/214/290/305/307/364/450/470/503,

18/39/47/209/214/290/565,
 18/39/54/59/73/91/98/209/214/285/290/305/307/364/407/521/524,
 18/39/54/59/73/91/98/209/214/285/290/305/307/364/470/503/521/524
 /565,
 18/39/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/52
 1,
 18/39/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/52
 1/524,
 18/39/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/503/521/52
 4,
 18/39/54/59/73/91/209/214/285/290/307/364/407/450/470/503/521/52
 4/565,
 18/39/54/59/73/91/209/214/285/290/307/364/407/470/503/521,
 18/39/54/59/73/91/209/214/285/305/307/364/407/450/470/503/521/52
 4/565,
 18/39/54/59/73/91/214/285/290/307/407/450/470/503/521/524/565,
 18/39/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/56
 5,
 18/39/54/59/73/91/285/290/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 18/39/54/59/73/285/290/307/364/470/503/521/524/565,
 18/39/54/59/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/5
 24/565, 18/39/54/59/285/290/305/307/364/407/450/470/503/524,
 18/39/54/73/91/98/285/290/305/407/450/470/503/521/524/565,
 18/39/54/73/91/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503,
 18/39/54/73/209/214/285/290/305/307/364/407/503/521/524,
 18/39/55/407/470/503,
 18/39/73/91/209/214/285/290/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 18/39/73/91/214/285/290/305/364/407/450/470/503/521/524,
 18/39/214/364/407/470/503, 18/39/214/364/450/470/521/524,
 18/43/305/364/416/450,
 18/47/54/59/73/91/209/214/290/305/364/407/450/503/524,
 18/47/54/59/73/91/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/52
 4, 18/47/54/59/73/91/214/285/290/307/364/407/485/503/524/565,
 18/47/54/73/91/209/214/285/290/305/307/407/470/503/521/524,
 18/47/54/73/91/209/285/290/364/407/450/470/503/521/524/565,
 18/47/59/97/98/407/503, 18/47/59/214/285/565,

18/47/59/214/362/407, 18/47/59/214/450/521,
 18/47/73/91/364/407/503, 18/47/97/98/182/209/364/407/503,
 18/47/209/290/364/470, 18/47/209/407/450/470/503/521,
 18/47/209/407/450/503, 18/47/214/285/287/290/470/503,
 18/47/214/407/524/565, 18/47/364/470, 18/47/364/503,
 18/47/364/503/565, 18/47/450/470, 18/47/521/565,
 18/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/470/503/521/524,
 18/54/73/214/307, 18/59/91/209/214/364, 18/59/91/565, 18/59/209,
 18/59/305/364/470/565, 18/59/407/450, 18/59/503/524,
 18/73/91/182/287/407/450/503, 18/73/285/364/407/470,
 18/73/285/521/524, 18/73/364/450/565, 18/73/407,
 18/91/209/364/407, 18/91/214, 18/91/214/407/524/565,
 18/91/364/407, 18/91/364/407/450, 18/91/364/450/565,
 18/91/407/470/521/524, 18/91/407/503, 18/209,
 18/209/364/407/521/565, 18/214/364/407/470/503/524, 18/214/407,
 18/290/565, 18/364/450/521/524/565, 18/364/503,
 18/407/450/503/565, 18/450/503,
 39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/52
 1/524/565,
 39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/364/407/503/521/524/565,
 39/47/54/59/73/91/209/214/290/305/307/364/407/450/470/503,
 39/47/54/59/73/91/209/214/290/305/307/364/407/470/503/521/524/56
 5,
 39/47/54/59/73/91/209/285/290/305/364/407/450/470/503/521/524/56
 5, 39/47/54/59/73/91/209/285/290/307/407/450/470/503/521/565,
 39/47/54/59/73/91/209/285/290/364/450/470/503/521/524,
 39/47/54/59/73/91/214/285/290/305/307/407/412/450/470/503/521/52
 4/565,
 39/47/54/59/73/91/214/285/290/305/307/407/450/470/503/521/524/56
 5, 39/47/54/59/73/91/214/285/290/364/450/470/503/521/524/565,
 39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/56
 5,
 39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/470/503/521/524/565,
 39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/364/450/470/503/521/565,
 39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/407/450/470/503/521/524/565,
 39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/450/470/503/521/524,

39/47/54/59/73/209/214/285/290/307/407/450/503/521/524,
 39/47/54/59/73/209/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524,
 39/47/54/59/91/98/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/524,
 39/47/54/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/47/54/73/91/209/285/290/305/307/364/407/470/503/521/524/565,
 39/47/54/73/91/209/285/290/305/364/450/470/503/521/524,
 39/47/54/73/91/214/285/290/305/364/407/450/503/524,
 39/47/54/73/91/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/47/54/91/209/214/285/305/307/407/503/521/565,
 39/47/54/91/209/285/290/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/47/54/91/214/285/290/307/364/470/503/521/524,
 39/47/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524,
 39/47/59/91/98/209/214/285/290/305/307/364/403/407/450/470/503/524/565,
 39/47/59/91/209/214/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524,
 39/47/73/91/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/47/73/91/214/285/290/305/364/407/450/503/521/524,
 39/47/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 , 39/47/91/214, 39/47/285/503,
 39/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/470/503/521/524/565,
 39/54/59/73/91/209/214/285/290/364/407/470/503/524/565,
 39/54/59/73/91/209/214/290/305/307/407/503/521/524/565,
 39/54/59/73/91/209/214/290/305/407/450/503/524/565,
 39/54/59/73/91/209/285/290/305/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/54/59/73/91/285/290/307/364/407/450/503/524,
 39/54/59/73/98/209/214/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524/565,
 39/54/59/73/209/214/285/290/305/307/364/407/450/503/521/524/565,
 39/54/59/73/290/305/307/364/407/470/503/521/524/565,
 39/54/59/91/98/209/287/290/291/307/364/407/450/470/521/524,
 39/54/59/91/98/285/290/503/521/524/565,
 39/54/59/91/209/214/285/290/305/307/364/407/470/503/524/565,

39/54/73/91/209/214/285/290/305/364/503/524/565,
 39/59/73/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/59/202/407/524/565, 39/59/364/450/470/565,
 39/73/290/307/364/407/450/524/565,
 39/209/214/407/450/470/503/521, 39/209/450/470/503,
 39/214/285/290/305/307/364/503/521/524, 39/214/307/503/524, 47,
 47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/5
 24/565,
 47/54/59/73/91/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524,
 47/54/59/73/91/209/285/290/305/307/364/407/450/503/524/565,
 47/54/59/73/91/285/290/311/364/407/503/521/524/565,
 47/54/59/73/91/285/305/307/407/470/521/524,
 47/54/59/73/98/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/5
 24, 47/54/59/73/209/285/290/364/407/432/450/470/503/521/524/565,
 47/54/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/
 565, 47/54/73/91/285/290/307/364/450/470/503/521/524/565,
 47/54/91/97/209/364/503/565, 47/55, 47/59/91/407/470/503/565,
 47/59/91/503/521, 47/59/209, 47/59/450/470/503, 47/73,
 47/73/91/214, 47/73/91/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524,
 47/73/91/290/407/416/450/503/521/524, 47/73/209/364/450/521,
 47/73/214/305/307/364/503/565, 47/73/214/305/407/503/565,
 47/73/214/364/407, 47/73/407/470/503,
 47/209/214/305/307/364/503/521/524, 47/209/503/524/565,
 47/214/364/503, 47/214/407, 47/285/290/364/503/565, 47/305,
 47/364/407/470/521/524, 47/364/524/565, 47/407,
 47/407/450/521/524, 47/407/565, 47/524/565, 51/407/470/503/524,
 54/59/73/91/214/285/290/364/407/470/503/524/565,
 54/59/91/209/407, 54/73/91/214/450/503/521/524,
 54/73/91/305/364/407/450/470/503/521, 54/73/450,
 54/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503/565,
 54/209/407/450/470/565, 54/209/470/503/524/565, 54/450, 54/503,
 55/290/305/364/450/503, 59/73/290/407/503/554,
 59/73/305/307/503, 59/91/407/450, 59/209/364/470/503, 59/214,
 59/214/364/407/452/503, 59/214/450/503, 59/407/503/521/524,
 59/450/503, 59/565, 73/91/214/524/565, 73/91/521, 91/97/209/285,
 91/209/214/255/285/290/307/450, 91/209/214/364/407/450/470/565,

91/209/214/407/503/565, 91/209/214/450/521/524/565,
 91/209/214/470/565, 91/209/407, 91/214, 209, 209/214/305,
 209/214/307/407/450/503, 209/214/407/450/470/503, 209/470,
 214/285/307/503/565, 214/407/503/565, 214/470/503, 214/470/521,
 290/470, 305/407/521364364/407/419/450/470/521/565, 364/407/565,
 364/470/503/521/524, 407, 407/450/565, 407/503, 450/503,
 450/524, 503 и 524 и/или любых их комбинаций, где положения
 аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:2.

[0013] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид является вариантом фермента *Anabaena variabilis*. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид по настоящему изобретению является более термостабильным, чем фенилаланин-аммиаклиаза *Anabaena variabilis* дикого типа. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид более устойчив к протеолизу, чем фенилаланин-аммиаклиаза *Anabaena variabilis* дикого типа. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид более устойчив к протеолизу под действием по меньшей мере одного фермента пищеварительного тракта, чем фенилаланин-аммиаклиаза *Anabaena variabilis* дикого типа. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид более устойчив к протеолизу под действием химотрипсина, трипсина, карбоксипептидаз и/или эластаз, чем фенилаланин-аммиаклиаза *Anabaena variabilis* дикого типа. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид является более стабильным под действием кислот, чем фенилаланин-аммиаклиаза *Anabaena variabilis* дикого типа. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид очищают.

[0014] Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам фенилаланин-аммиаклиазы, содержащим аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности относительно SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10 и/или 12 или их функциональному фрагменту. В некоторых вариантах осуществления

сконструированные полипептиды фенилаланин-аммиаклиазы содержат аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере 90% идентичности последовательности относительно SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10 и/или 12 или их функциональному фрагменту. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированные полипептиды фенилаланин-аммиаклиазы содержат аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере приблизительно 95% идентичности последовательности относительно SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10 и/или 12 или их функциональному фрагменту. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы является вариантом полипептида фенилаланин-аммиаклиазы, представленным в любой из таблицы 6.1, таблицы 7.1, таблицы 8.1, таблицы 9.1, таблицы 10.1, таблицы 14.1 и/или таблицы 15.1.

[0015] В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы является вариантом фермента *Anabaena variabilis*. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы по настоящему изобретению является более термостабильным, чем фенилаланин-аммиаклиаза *Anabaena variabilis* дикого типа. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы более устойчив к протеолизу, чем фенилаланин-аммиаклиаза *Anabaena variabilis* дикого типа. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы более устойчив к протеолизу под действием по меньшей мере одного фермента пищеварительного тракта, чем фенилаланин-аммиаклиаза *Anabaena variabilis* дикого типа. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы более устойчив к протеолизу под действием химотрипсина, трипсина, карбоксипептидаз и/или эластаз, чем фенилаланин-аммиаклиаза *Anabaena variabilis* дикого типа. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы является более стабильным под действием кислот, чем фенилаланин-

аммиаклиаза *Anabaena variabilis* дикого типа. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы очищают.

[0016] Настоящее изобретение также относится к сконструированным полинуклеотидным последовательностям, кодирующим по меньшей мере один сконструированный полипептид и/или полипептид фенилаланин-аммиаклиазы, представленный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полинуклеотид кодирует по меньшей мере один сконструированный полипептид, представленный в настоящем описании. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полинуклеотид кодирует по меньшей мере один сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы, представленный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полинуклеотид кодирует сконструированный полипептид, представленный в настоящем описании. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полинуклеотид кодирует сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы, представленный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления сконструированная полинуклеотидная последовательность функционально связана с контрольной последовательностью. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированную полинуклеотидную последовательность подвергают оптимизации кодонов.

[0017] Настоящее изобретение также относится к экспрессирующим векторам, содержащим по меньшей мере одну сконструированную полинуклеотидную последовательность, представленную в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие векторы содержат сконструированную полинуклеотидную последовательность, представленную в настоящем описании. В некоторых дополнительных вариантах осуществления экспрессирующие векторы дополнительно содержат по меньшей мере одну контрольную последовательность. В некоторых дополнительных вариантах осуществления экспрессирующие векторы дополнительно содержат контрольную последовательность. В некоторых дополнительных вариантах осуществления контрольная

последовательность содержит промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор является гетерологичным промотором.

[0018] Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, трансформированным с использованием по меньшей мере одной полинуклеотидной последовательности, представленной в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева трансформируют с использованием полинуклеотидной последовательности, представленной в настоящем описании. В некоторых дополнительных вариантах осуществления клетки-хозяева являются клетками *E. coli*.

[0019] Настоящее изобретение также относится к способам получения сконструированного полипептида в клетке-хозяине, включающим культивирование клетки-хозяина, содержащей по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один сконструированный полипептид, представленный в настоящем описании, и/или по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, представленную в настоящем описании, и/или по меньшей мере один вектор экспрессии, представленный в настоящем описании, в подходящих условиях культивирования таким образом, что получают по меньшей мере один сконструированный полипептид. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к способам получения сконструированного полипептида фенилаланин-аммиаклиазы в клетке-хозяине, включающим культивирование клетки-хозяина, содержащей по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы, представленный в настоящем описании, и/или по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, представленную в настоящем описании, и/или по меньшей мере один вектор экспрессии, представленный в настоящем описании, в подходящих условиях культивирования таким образом, что получают по меньшей мере один сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают выделение по меньшей мере одного сконструированного полипептида и/или полипептида фенилаланин-аммиаклиазы, представленного в настоящем описании, из культуры и/или клеток-хозяев. В некоторых дополнительных вариантах

осуществления способы дополнительно включают стадию очистки по меньшей мере одного сконструированного полипептида и/или полипептида фенилаланин-аммиаклиазы, представленного в настоящем описании.

[0020] Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим по меньшей мере один сконструированный полипептид, представленный в настоящем описании. Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим по меньшей мере один сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы, представленный в настоящем описании. Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы, представленный в настоящем описании.

[0021] Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим по меньшей мере один сконструированный полинуклеотид, представленный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат сконструированный полинуклеотид, представленный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиция является фармацевтической композицией. В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция дополнительно содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент и/или носитель. В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция подходит для лечения фенилкетонурии. В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция подходит для лечения повышенного уровня фенилаланина в крови. В некоторых вариантах осуществления композиция подходит для лечения гиперфенилаланинемии. В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция подходит для лечения тирозинемии. В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция подходит для лечения повышенного уровня тирозина в крови. В некоторых вариантах осуществления композиция подходит для лечения гипертирозинемии. В некоторых дополнительных вариантах осуществления композицию можно использовать в генной терапии. В некоторых дополнительных вариантах осуществления композицию можно использовать в генной терапии для лечения фенилкетонурии, повышенного уровня фенилаланина в крови, гиперфенилаланинемии,

тирозинемии, повышенного уровня тирозина в крови и/или гипертирозинемии. В некоторых дополнительных вариантах осуществления композицию можно использовать в терапии мРНК. В некоторых дополнительных вариантах осуществления композицию можно использовать в терапии мРНК для лечения фенилкетонурии, повышенного уровня фенилаланина в крови, гиперфенилаланинемии, тироинемии, повышенного уровня тирозина в крови и/или гипертироинемии. В некоторых вариантах осуществления композиция подходит для перорального введения человеку. В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция находится в форме пилули, таблетки, капсулы, желатиновой капсулы, жидкости или эмульсии. В некоторых дополнительных вариантах осуществления пилуля, таблетка, капсула или желатиновая капсула дополнительно содержит растворяющееся в кишечнике покрытие. В некоторых альтернативных вариантах осуществления композиция подходит для парентеральной инъекции человеку. В некоторых дополнительных вариантах осуществления композицию вводят совместно с по меньшей мере одним дополнительным терапевтически эффективным соединением. В некоторых других вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере одно дополнительное терапевтически эффективное соединение.

[0022] Настоящее изобретение также относится к способам лечения и/или профилактики симптомов фенилкетонурии у индивидуума, включающим наличие индивидуума, имеющего фенилкетонурию, и введение этому индивидууму по меньшей мере одной композиции, представленной в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления концентрация фенилаланина в крови индивидуума снижается после введения композиции индивидууму. В некоторых дополнительных вариантах осуществления концентрация коричной кислоты в крови индивидуума повышается после введения композиции индивидууму. В некоторых дополнительных вариантах осуществления улучшают симптомы фенилкетонурии у индивидуума. В некоторых дополнительных вариантах осуществления индивидуум может питаться в соответствии с диетой, менее ограниченной по содержанию фенилаланина, чем диета, необходимая для индивидуумов, которым не вводили по

меньшей мере одну фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере одну сконструированную фенилаланин-аммиаклиазу, представленную в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является младенцем, в то время как в некоторых других вариантах осуществления индивидуум является ребенком, и в некоторых других вариантах осуществления индивидуум является молодым человеком, и в некоторых дополнительных вариантах осуществления индивидуум является взрослым.

[0023] Настоящее изобретение также относится к применению любых из композиций, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат по меньшей мере одну сконструированную фенилаланин-аммиаклиазу. В некоторых вариантах осуществления любые из композиций, представленных в настоящем описании, применяют в отдельности или в любой комбинации. Не следует понимать, что настоящее изобретение ограничено каким-либо конкретным применением.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0024] Фигура 1 представляет собой график, на котором показана переносимость AvPAL и варианта #126 действия кишечного сока без протеаз. Остаточная активность PAL AvPAL дикого типа и варианта #126 показаны после инкубации в искусственном кишечном соке с симуляцией состояния натошак (FaSSiF), искусственном кишечном соке с имитацией ранних стадий пищеварения (FeSSiF с имитацией ранних стадий пищеварения), искусственном кишечном соке с имитацией средних стадий пищеварения (FeSSiF с имитацией средних стадий пищеварения) и искусственном кишечном соке с имитацией поздних стадий пищеварения (FeSSiF с имитацией поздних стадий пищеварения) в отсутствие трипсина и химотрипсина.

[0025] Фигура 2 представляет собой график, на котором показана переносимость AvPAL и варианта #126 действия кишечного сока с протеазами. Остаточная активность PAL AvPAL и варианта #126 показаны после инкубации в искусственном кишечном соке с симуляцией состояния натошак (FaSSiF), искусственном кишечном соке с имитацией ранних стадий пищеварения (FeSSiF с имитацией ранних стадий пищеварения), искусственном кишечном соке с имитацией средних стадий пищеварения (FeSSiF с имитацией средних

стадий пищеварения) и искусственном кишечном соке с имитацией поздних стадий пищеварения (FeSSIF с имитацией поздних стадий пищеварения) в присутствии трипсина и химотрипсина.

[0026] Фигура 3 представляет собой график, на котором показаны относительные уровни фенилаланина в плазме у биглей в группах, которым вводили разные дозы варианта #126. Планки погрешностей не показаны для упрощения (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

[0027] Фигура 4 представляет собой график, на котором показаны уровни СА в плазме у биглей в группах, которым вводили различные дозы варианта #126.

[0028] Фигура 5 представляет собой график, на котором показана AUC коричной кислоты у биглей для уровней в плазме в группах, которым вводили различные дозы варианта #126. В каждой группе наблюдали статистическую значимость по сравнению с носителем (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$).

[0029] Фигура 6 представляет собой график, на котором показаны относительные уровни фенилаланина (Phe) в плазме у яванских макак в группах, которым вводили различные дозы варианта #126. Некоторым группам предварительно не вводили фамотидин.

[0030] Фигура 7 представляет собой график, на котором показана AUC относительных уровней фенилаланина (Phe) в плазме яванских макак в группах, которым вводили различные дозы варианта #126. Пунктирной линией указана средняя AUC для всех доз варианта #126 (**: $p < 0,01$ для t-критерия Стьюдента при сравнении носителя и всех доз в комбинации).

[0031] Фигура 8А представляет собой график, на котором показаны уровни коричной кислоты (СА) в плазме яванских макак в группах, которым предварительно вводили фамотидин и которым вводили различные дозы варианта #126.

[0032] Фигура 8В представляет собой график, на котором показаны уровни коричной кислоты (СА) в плазме яванских макак в группах, которым предварительно не вводили фамотидин и которым вводили различные дозы варианта #126.

[0033] Фигура 9А представляет собой график, на котором показана AUC коричной кислоты (СА) в плазме за 0–4 ч. для групп

яванских макак, которым вводили различные дозы варианта #126 и которым предварительно вводили фамотидин (вверху) или не вводили (в середине).

[0034] Фигура 9В представляет собой график, на котором показана AUC коричной кислоты (CA) в плазме за 0-4 ч. для групп яванских макак, которым вводили различные дозы варианта #126 и которым предварительно не вводили фамотидин.

[0035] Фигура 9С представляет собой график, на котором показано непосредственное сравнение групп, которым вводили дозы 20 и 200 мг/кг, которым предварительно не вводили фамотидин или вводили фамотидин за 2 ч. перед введением дозы (внизу) (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0036] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам PAL, их мутантам, биологически активным фрагментам и аналогам и фармацевтическим и промышленным композициям, содержащим их.

[0037] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам фенилаланин-аммиаклиазы (PAL) и их композициям, а также полинуклеотидам, кодирующим сконструированные полипептиды фенилаланин-аммиаклиазы (PAL). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL оптимизируют для обеспечения повышенной каталитической активности, а также сниженной чувствительности к протеолизу и повышенной переносимости хранения при повышенных температурах. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL содержат меньше остатков фенилаланина. Настоящее изобретение также относится к способам применения композиций, содержащих сконструированные полипептиды PAL для терапевтических и промышленных целей.

[0038] Одним из способов детоксификации фенилаланина в кровотоке является использование инъектируемой рекомбинантной PAL и вариантов PAL, модифицированных посредством пегилирования (PEG-PAL). Показано, что пегилирование улучшает время полужизни фермента и снижает ответа индивидуума на антиген (см., например, WO2008/153776, WO2011/097335 и патент США № 7531341). Варианты

PAL, которые можно использовать в композициях PEG-PAL, описаны как варианты *Nostoc punctiforme* (NpPAL), *Anabaena variabilis* (AvPAL) и *Rhodospiridium toruloides* (RtPAL) дикого типа. В частности, описаны варианты AvPAL дикого типа, где остатки цистеина в положениях 64, 318, 503 и 565 заменены серином (см., например, патенты США №№ 7790433, 7560263 и 7537923).

[0039] Альтернативным путем введения PAL в качестве средства снижения концентрации L-фенилаланина в плазме индивидуумов с PKU является неинвазивный состав, такой как пероральный состав (Sarkissian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:2339-2344 [1999]). Ключевым преимуществом перорального введения PAL является сниженное воздействие фермента на иммунную систему и, таким образом, минимизация иммунного ответа, наблюдаемого в случае инъектируемого PEG-PAL. Однако основным ограничением в случае перорального состава PAL является утрата ферментативной активности в желудке и просвете кишечника. Для того чтобы быть эффективной и функциональной, PAL должна быть устойчивой к деградации в кислом pH и под действием протеаз, таких как трипсин, химотрипсин, карбоксипептидазы и пепсин, которые в норме вызывают деградацию белковой пищи до олигопептидов и аминокислот. В некоторых из предшествующих исследований (Sarkissian, выше) для достижения значительного эффекта в случае перорального введения PAL, необходимо большое количество фермента, частично по причине ферментативной деградации под действием протеаз, а частично по причине относительно низкой специфической активности при pH 7,0. Для супрессии деградации PAL после потребления используют различные средства (Kim et al., Molec. Therap., 10:220-224 [2004] и Shah et al., Int. J. Pharmaceut., 356:61-68 [2008]).

[0040] Одним из подходов для повышения эффективности PAL в жестких условиях пищеварительного тракта является получение сконструированных полипептидов PAL, переносящих такие жесткие условия. Kang et al. использовали сайт-специфический мутагенез участка расщепления химотрипсина и пегилирования поверхностных лизинов AvPAL для снижения протеолитической инактивации (см., Kang et al., Mol. Gen. Metabol., 99:4-9 [2010]). В этих

исследованиях десять участков расщепления специфически подвергали мутагенезу, и все, кроме двух, из этих получаемых мутантов (F18A и R94G) утрачивали более 50% исходной ферментативной активности. Ни у одного из мутантов не наблюдали повышенную активность, а у мутанта F18A наблюдали небольшое повышение резистентности к трипсину (Kang et al., выше). Дальнейшие исследования с использованием P_{AL}, хотя и были эффективными, как правило, не приводили к получению более долгоживущего фермента. Таким образом, пероральное введение мутантов P_{AL}, ранее описанных в литературе, и их производных не приводило к эффективному лечению PKU.

[0041] Несмотря на прогресс в области различных составов P_{AL}, все еще сохраняется потребность в полипептидах P_{AL} с улучшенными свойствами для перорального введения. Эти улучшенные свойства включают, в качестве неограничивающих примеров, большее время полужизни, повышенную каталитическую активность, улучшенную стабильность в условиях пищеварительного тракта, а также условиях хранения, и сниженную агрегацию.

[0042] Ферменты P_{AL} также можно использовать в качестве терапевтических белков для лечения нарушений метаболизма тирозина, таких как тирозинемия типа I, тирозинемия типа II, тирозинемия типа III и алкаптонурия. Эти нарушения метаболизма тирозина являются аутосомными метаболическими генетическими нарушениями, при которых один из ферментов, участвующих в деградации тирозина, является частично функциональным или нефункциональным по причине мутации в соответствующем гене. Это отсутствие функционирования приводит к повышенным уровням тирозина и других метаболитов тирозина в кровотоке. Т.к. тирозин образуется из фенилаланина, для пациентов с нарушением метаболизма тирозина полезно ограничивать потребление фенилаланина и тирозина. Таким образом, ферменты P_{AL} представляют собой потенциальный вариант лечения нарушений метаболизма тирозина.

[0043] Если пациентов с нарушением метаболизма тирозина не начинают лечить на ранней стадии, высокие уровни тирозина и некоторых из продуктов его распада могут вызывать значительные

медицинские нарушения, включая печеночную и почечную недостаточность, рак печени, умственную отсталость и даже смерть.

[0044] Помимо терапевтического применения, ферменты PAL также можно использовать в промышленном синтезе L-фенилаланина и других замещенных производных L-фенилаланина. Затем эти производные можно использовать в качестве фармацевтических предшественников (Gloge et al., Chem., 6:3386-3390 [2000]; Bartsch et al., Prot. Eng. Des. Sel., 23:929-933 [2010] и Turner, Curr. Opin.Chem. Biol., 234-240 [2011]). Ферменты PAL также можно использовать в сельском хозяйстве. PAL играет важную роль в биосинтезе фенилпропаноидов (таких как флавоноиды и лигнин) в растениях, грибах и бактериях и может действовать как защитный фермент (Bate et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7608-7612 [1994]). Модуляция активности PAL с использованием рекомбинантных полипептидов, имеющих активность PAL, потенциально может привести к получению эффективных гербицидов.

Сокращения и определения:

[0045] Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, как правило, обладают значением, общепринято понятным специалисту в области, к которой относится изобретение. Как правило, номенклатура, используемая в настоящем описании и лабораторных способах культивирования клеток, молекулярной генетики, микробиологии, органической химии, аналитической химии и химии нуклеиновых кислот, описанных ниже, хорошо известны и широко используются в этой области. Такие способы хорошо известны и описаны в многочисленных текстах и справочниках, хорошо известных специалисту в этой области. Для химического синтеза и химического анализа используют стандартные способы или их модификации. Все патенты, патентные заявки, статьи и публикации, упомянутые в настоящем описании выше и ниже, таким образом, конкретно включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[0046] Хотя в практическом осуществлении изобретения можно использовать любые подходящие способы и материалы, схожие или эквивалентные способам и материалам, представленным в настоящем описании, в настоящем описании представлены некоторые способы и

материалы. Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретной описываемой методологией, способами и реагентами, т.к. их можно варьировать в зависимости от условий, в которых их использует специалист в этой области. Таким образом, термины, определенные непосредственно ниже, более полно описаны со ссылкой на заявку в целом. Все патенты, патентные заявки, статьи и публикации, упомянутые в настоящем описании выше и ниже, таким образом, конкретно включены в настоящее описание в качестве ссылок.

[0047] Кроме того, в рамках изобретения термины в единственном числе включают ссылку на множественное число, если контекст четко не указывает на иное.

[0048] Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Таким образом, каждый числовой диапазон, представленный в настоящем описании, предназначен для включения каждого более узкого числового диапазона, попадающего в такой более широкий числовой диапазон, как если бы такие более узкие числовые диапазоны были конкретно указаны в настоящем описании. Также предполагают, что каждый максимальный (или минимальный) числовой предел, представленный в настоящем описании, включает каждый более низкий (или более высокий) числовой предел, как если бы такие более низкие (или более высокие) числовые пределы были конкретно указаны в настоящем описании.

[0049] Термин "приблизительно" означает приемлемую ошибку для конкретного значения. В некоторых случаях термин "приблизительно" означает в пределах 0,05%, 0,5%, 1,0% или 2,0% от указанного диапазона значений. В некоторых случаях термин "приблизительно" означает в пределах 1, 2, 3 или 4 стандартных отклонений от указанного значения.

[0050] Кроме того, заголовки, представленные в настоящем описании, не предназначены для ограничения различных аспектов или вариантов осуществления изобретения, которые можно рассматривать со ссылкой на заявку в целом. Таким образом, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определены со ссылкой на заявку в целом. Тем не менее, для облегчения понимания изобретения ниже определен ряд терминов.

[0051] Если не указано иначе, последовательности нуклеиновых кислот пишут слева направо в 5'-3'-ориентации; аминокислотные последовательности пишут слева направо от amino-конца к карбокси-концу, соответственно.

[0052] В рамках изобретения термин "содержащий" и родственные термины используют в инклюзивном смысле (т.е. как эквивалент термину "включающий" и соответствующим родственным терминам).

[0053] Номер "ЕС" относится к Номенклатуре ферментов Комитета по номенклатуре International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Биохимическая классификация IUBMB представляет собой числовую систему классификации ферментов на основе химических реакций, которые они катализуют.

[0054] Термин "ATCC" относится к American Type Culture Collection, хранилище биологических материалов в котором включает гены и штаммы.

[0055] Термин "NCBI" относится к National Center for Biological Information и базам данных последовательностей, представленным в нем.

[0056] В рамках изобретения термин "полипептид фенилаланин-аммиаклиазы (PAL)" относится к классу ферментов в семействе лиаз ароматических аминокислот (EC4.3.1.23, EC4.3.1.24 и EC4.3.1.25) также включающем гистидин-аммиаклиазу и тирозин-аммиаклиазу. Полипептиды PAL также иногда обозначают как фенилаланин/тирозин-аммиаклиазы, т.к. некоторые ферменты PAL в качестве субстрата могут использовать тирозин, а также фенилаланин. Однако, AvPAL и варианты, представленные в настоящем описании, не используют тирозин в качестве субстрата. Полипептиды PAL катализуют превращение L-фенилаланина в транс-коричную кислоту и аммиак. Термин "активность PAL" относится к ферментативной активности полипептидов PAL. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фермент PAL также содержит кофактор 3,5-дигидро-5-метилиден-4H-имидазол-4-он (MIO). Этот кофактор может потребоваться для каталитической активности и образуется посредством циклизации и дегидратации трипептидного сегмента Ala167-Ser168-Gly169 консервативного активного участка.

[0057] Термины "белок", "полипептид" и "пептид" используют взаимозаменяемо для обозначения полимера из по меньшей мере двух аминокислот, ковалентно связанных амидной связью, независимо от длины или посттрансляционной модификации (например, гликозилирования или фосфорилирования).

[0058] Термин "полинуклеотид" используют в настоящем описании для обозначения полимера, содержащего по меньшей мере два нуклеотида, в котором нуклеотиды являются дезоксирибонуклеотидами или рибонуклеотидами.

[0059] "Аминокислоты" в настоящем описании обозначают с помощью их общеизвестного трехбуквенного кода или однобуквенного кода, рекомендуемого Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Аналогично, нуклеотиды, можно обозначать с помощью общепринятого однобуквенного кода.

[0060] Термины "сконструированный", "рекомбинантный", "невстречающийся в природе" и "вариант" при использовании в отношении клетки, полинуклеотида или полипептида относятся к материалу или материалу, соответствующему природной или нативной форме материала, модифицированной таким образом, что в таком виде он не встречается в природе или не идентичен ему, а получен из синтетических материалов и/или рекомбинантными способами.

[0061] В рамках изобретения термин "дикий тип" и "природный" относятся к форме, обнаруживаемой в природе. Например, полипептид или полинуклеотидная последовательность дикого типа представляет собой последовательность, присутствующую в организме, которую можно выделять из природного источника и которую человек не модифицировал умышленно.

[0062] Термин "кодирующая последовательность" относится к части нуклеиновой кислоты (например, гена), кодирующей аминокислотную последовательность белка.

[0063] Термин "процент (%) идентичности последовательности" используют в настоящем описании для обозначения сравнения полинуклеотидов и полипептидов, и его определяют посредством сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, где часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать инсерции или

делеции (т.е. пропуски) по сравнению с референсной последовательностью для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент можно вычислять посредством определения количества положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях, для получения количества совпадающих положений, разделяя количество совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножая результат на 100 для получения процента идентичности последовательности. Альтернативно, процент можно вычислять посредством определения количества положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях, или основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток выравнивают с пропуском для получения количества совпадающих положений, разделяя количество совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножая результат на 100 для получения процента идентичности последовательности. Специалисту в этой области будет понятно, что существует множество доступных известных алгоритмов выравнивания двух последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно осуществлять, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith и Waterman (Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 [1981]), алгоритма гомологичного выравнивания Needleman и Wunsch (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 [1970]), способом поиска сходства Pearson и Lipman (Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 [1988]), с помощью компьютеризированных воплощений этих алгоритмов (например, GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программ GCG Wisconsin) или визуального осмотра, как известно в этой области. Неограничивающие примеры алгоритмов, подходящих для определения процента идентичности последовательности и сходства последовательностей включают алгоритмы BLAST и BLAST 2.0 (см., например, Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 [1990] и Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 3389-3402 [1977]). Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным на веб-сайте

National Center for Biotechnology Information. Этот алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) посредством идентификации коротких слов длины "W" в последовательности запроса, соответствующим или удовлетворяющим некоторым положительным пороговым значениям "T" при выравнивании со словом той же длины последовательности из базы данных. T обозначают как порог показателя сходства соседних слов (см., Altschuletal, выше). Эти исходные совпадения соседних слов действуют в качестве "затравки" для начала поиска более длинных HSP, содержащих их. Затем совпадения слов расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока могут повышаться совокупные баллы выравнивания. Совокупные баллы вычисляют в случае нуклеотидных последовательностей с использованием параметров "M" (баллов вознаграждения для пары совпадающих остатков; всегда >0) и "N" (баллов штрафа для отсутствующих остатков; всегда <0). В случае аминокислотных последовательностей для вычисления совокупных баллов используют матрицу замен. Расширение совпадений слов в каждом направлении прекращается, когда: совокупные баллы выравнивания снижаются на количество "X" относительно своего максимального достигнутого значения; совокупные баллы снижаются до нуля или ниже из-за накопления одного или более выравниваний остатков с отрицательными баллами; или достигнут конец любой из последовательностей. Параметры W, T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) по умолчанию используют длину слова (W) 11, ожидание (E) 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей. В случае аминокислотных последовательностей в программе BLASTP по умолчанию используют длину слова (W) 3, ожидание (E) 10 и матрицу замен BLOSUM62 (см., например, Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 [1989]). В примере определения выравнивания последовательности и % идентичности последовательности можно использовать программу BESTFIT или GAP в пакете программ GCG Wisconsin (Accelrys, Madison WI) с использованием параметров по умолчанию.

[0064] Термин "референсная последовательность" относится к определенной последовательности, используемой в качестве основы для сравнения последовательностей. Референсная последовательность может представлять собой часть более крупной последовательности, например, сегмент полноразмерного гена или полипептидной последовательности. В основном, референсная последовательность составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов или аминокислотных остатков в длину, по меньшей мере 25 остатков в длину, по меньшей мере 50 остатков в длину, по меньшей мере 100 остатков в длину или является полноразмерной последовательностью нуклеиновой кислоты или последовательностью полипептида. Т.к. каждый из двух полинуклеотидов или полипептидов (1) может содержать последовательность (т.е. часть полной последовательности), схожую между двумя последовательностями, и (2) может дополнительно содержать последовательность, отличающуюся между двумя последовательностями, сравнение последовательностей между двумя (или более) полинуклеотидами или полипептидами, как правило, осуществляют посредством сравнения последовательностей двух полинуклеотидов или полипептидов в "окне сравнения" для идентификации и сравнения локальных областей сходства последовательностей. В некоторых вариантах осуществления "референсная последовательность" может быть основана на первичной аминокислотной последовательности, где референсная последовательность является последовательностью, которая может содержать одно или более изменений относительно первичной последовательности. Например, фраза "референсная последовательность на основе SEQ ID NO:4, содержащая валин в положении, соответствующем X39" относится к референсной последовательности, в которой соответствующий остаток в положении X39 в SEQ ID NO:4 (например, аланин) заменен на валин.

[0065] Термин "окно сравнения" относится к концептуальному сегменту из по меньшей мере приблизительно 20 смежных положений нуклеотидов или аминокислотных остатков, где последовательность можно сравнивать с референсной последовательностью из по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов или аминокислот и где часть последовательности в окне сравнения может содержать инсерции или

делеции (т.е. пропуски) 20% или менее по сравнению с референсной последовательностью (не содержащей инсерции или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Окно сравнения может быть больше 20 смежных остатков и, необязательно, включает окна длиной 30, 40, 50, 100 остатков или более.

[0066] Термины "соответствующий", "со ссылкой на" и "относительно" при использовании в контексте нумерации указанной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности относятся к нумерации остатков определенной референсной последовательности, когда указанную аминокислотную или полинуклеотидную последовательность сравнивают с референсной последовательностью. Другими словами, номер остатка или положение остатка в указанном полимере приписывают относительно референсной последовательности, а не используют точное числовое положение остатка в указанной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности. Например, указанную аминокислотную последовательность, такую как последовательность сконструированной P_{AL}, можно выравнивать относительно референсной последовательности посредством включения пропусков для оптимизации совпадений остатков между двумя последовательностями. В этом случае, хотя пропуски и присутствуют, нумерацию остатков в указанной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности осуществляют относительно референсной последовательности, с которой ее выравнивают.

[0067] Термины "отличие аминокислот" и "отличие остатков" относятся к отличию аминокислотного остатка в положении полипептидной последовательности относительно аминокислотного остатка в соответствующем положении в референсной последовательности. Положения отличий аминокислот, как правило, обозначают в настоящем описании как "X_n", где n относится к соответствующему положению в референсной последовательности, на которой основано отличие остатка. Например, "отличие остатка в положении X₉₁ по сравнению с SEQ ID NO:4" относится к отличию аминокислотного остатка в положении полипептида, соответствующем положению 91 SEQ ID NO:4. Таким образом, если референсный

полипептид SEQ ID NO:4 содержит аланин в положении 91, "отличие остатка в положении X91 по сравнению с SEQ ID NO:4" относится к замене аминокислоты в любом остатке, ином, чем аланин, в положении полипептида, соответствующем положению 91 SEQ ID NO:4. В большинстве случаев в настоящем описании конкретное отличие аминокислотного остатка в положении указывают как "XnY", где "Xn" обозначает соответствующий остаток и положение в референсном полипептиде (как описано выше), и "Y" представляет собой однобуквенный идентификатор аминокислоты, обнаруживаемой в сконструированном полипептиде (т.е. остаток, иной, чем в референсном полипептиде). В некоторых случаях (например, в таблицах в Примерах) в настоящем описании представлены конкретные отличия аминокислот, обозначаемые общепринятым образом как "AnB", где A представляет собой однобуквенный идентификатор остатка в референсной последовательности, "n" представляет собой номер положения остатка в референсной последовательности, и B представляет собой однобуквенный идентификатор замены остатка в последовательности сконструированного полипептида. В некоторых случаях полипептид по изобретению может включать одно или более отличий аминокислотных остатков относительно референсной последовательности, указанной в виде списка определенных положений, где присутствуют отличия остатков относительно референсной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, в которых в конкретном положении остатка в полипептиде можно использовать несколько аминокислот, различные аминокислотные остатки, которые можно использовать, разделяют символом "/" (например, X307G/X307Q или X307G/Q). Настоящее изобретение включает сконструированные полипептидные последовательности, содержащие одно или более отличий аминокислот, включающих консервативные или неконсервативные замены аминокислот или и те, и другие.

[0068] Термины "набор замен аминокислот" и "набор замен" относятся к группе замен аминокислот в полипептидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления наборы замен содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более замен аминокислот. В некоторых вариантах осуществления

термин "набор замен" относится к набору замен аминокислот, присутствующих в любом из вариантов полипептидов AvPAL, указанных в любой из таблиц в Примерах.

[0069] Термин "консервативная замена аминокислоты" относится к замене остатка другим остатком, имеющим схожую боковую цепь, и, таким образом, как правило, включает замену аминокислоты в полипептиде аминокислотами из того же или схожего класса аминокислот. В качестве неограничивающих примеров, аминокислоту с алифатической боковой цепью можно заменять другой алифатической аминокислотой (например, аланином, валином, лейцином и изолейцином); аминокислоту с гидроксильной боковой цепью заменяют другой аминокислотой с гидроксильной боковой цепью (например, серином и треонином); аминокислоту с ароматической боковой цепью заменяют другой аминокислотой с ароматической боковой цепью (например, фенилаланином, тирозином, триптофаном и гистидином); аминокислоту с основной боковой цепью заменяют другой аминокислотой с основной боковой цепью (например, лизином и аргинином); аминокислоту с кислой боковой цепью заменяют другой аминокислотой с кислой боковой цепью (например, аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой); и гидрофобную или гидрофильную аминокислоту заменяют другой гидрофобной или гидрофильной аминокислотой, соответственно. Примеры консервативных замен представлены в таблице 1.

Таблица 1. Примеры консервативных аминокислотных замен	
Остаток	Потенциальные консервативные замены
A, L, V, I	Другие алифатические (A, L, V, I) Другие неполярные (A, L, V, I, G, M)
G, M	Другие неполярные (A, L, V, I, G, M)
D, E	Другие кислые (D, E)
K, R	Другие основные (K, R)
N, Q, S, T	Другие полярные
H, Y, W, F	Другие ароматические (H, Y, W, F)
C, P	Неполярные

[0070] Термин "неконсервативная замена" относится к замене аминокислоты в полипептиде аминокислотой со значительно отличающимися свойствами боковой цепи. В неконсервативных заменах можно использовать аминокислоты из разных групп, а не из одной,

и они могут затрагивать: (a) структуру пептидного остова в области замены (например, пролин вместо глицина); (b) заряд или гидрофобность; и/или (c) объем боковой цепи. В качестве неограничивающих примеров, неконсервативные замены включают кислую аминокислоту, замененную основной или алифатической аминокислотой; ароматическую аминокислоту, замененную небольшой аминокислотой; и гидрофильную аминокислоту, замененную гидрофобной аминокислотой.

[0071] Термин "делеция" относится к модификации полипептида посредством удаления одной или более аминокислот из референсного полипептида. Делеции могут включать удаление 1 или более аминокислот, 2 или более аминокислот, 5 или более аминокислот, 10 или более аминокислот, 15 или более аминокислот или 20 или более аминокислот, до 10% общего количества аминокислот или до 20% общего количества аминокислот, составляющих референсный фермент, при сохранении ферментативной активности и/или сохранении улучшенных свойств сконструированного фермента трансаминазы. Делеции могут быть направлены на внутренние части и/или концевые части полипептида. В различных вариантах осуществления делеция может включать непрерывный сегмент или может быть прерывистой.

[0072] Термин "инсерция" относится к модификации полипептида посредством добавления одной или более аминокислот в референсный полипептид. Инсерции могут находиться во внутренних частях полипептида или на карбокси- или амино-конце. В рамках изобретения инсерции включают слитые белки, как известно в этой области. Инсерция может представлять собой смежный сегмент аминокислот или может быть разделена одной или более аминокислотами в полипептиде, встречающемся в природе.

[0073] Термины "функциональный фрагмент" и "биологически активный фрагмент" в настоящем описании используют взаимозаменяемо для обозначения полипептида, имеющего амино-концевые и/или карбокси-концевые делеции и/или внутренние делеции, но где оставшаяся аминокислотная последовательность идентична соответствующим положениям в последовательности, с которой ее сравнивают (например, полноразмерной сконструированной PAL по изобретению), сохраняет, по существу,

всю активность полноразмерного полипептида.

[0074] Термин "выделенный полипептид" относится к полипептиду, по существу, отделенному от других посторонних веществ, сопутствующих ему в природе (например, белков, липидов и полинуклеотидов). Термин включает полипептиды, удаленные или очищенные от своего природного окружения или системы экспрессии (например, клетки-хозяина или системы синтеза *in vitro*). Рекомбинантные полипептиды PAL могут присутствовать в клетке, клеточной среде или их можно получать в различных формах, таких как лизаты или выделенные препараты. В связи с этим, в некоторых вариантах осуществления рекомбинантные полипептиды PAL, представленные в настоящем описании, являются выделенными полипептидами.

[0075] Термин "по существу, чистый полипептид" относится к композиции, в которой молекула полипептида является преобладающей из присутствующих молекул (т.е. в пересчете на моль или массу она встречается чаще, чем любая другая отдельная макромолекула в композиции) и, как правило, является, по существу, очищенной композицией, если целевая молекула составляет по меньшей мере приблизительно 50 процентов макромолекул в пересчете на моль или % масс. Как правило, по существу, чистая композиция PAL будет содержать приблизительно 60% или более, приблизительно 70% или более, приблизительно 80% или более, приблизительно 90% или более, приблизительно 95% или более и приблизительно 98% или более всех макромолекул в пересчете на моль или % масс., присутствующих в композиции. В некоторых вариантах осуществления целевую молекулу очищают до существенной однородности (т.е. посторонние вещества нельзя определить в композиции общепринятыми способами детекции), где композиция, по существу, состоит из одного типа макромолекул. Растворители, низкомолекулярные вещества (<500 Да) и ионы элементов не считают макромолекулами. В некоторых вариантах осуществления выделенные рекомбинантные полипептиды PAL представляют собой, по существу, чистые полипептидные композиции.

[0076] Термин "улучшенное свойство фермента" относится к сконструированному полипептиду PAL, демонстрирующему улучшение

любого свойства фермента по сравнению с референсным полипептидом PAL, таким как полипептид PAL дикого типа (например, AvPAL дикого типа, соответствующий SEQ ID NO:4), другим сконструированным полипептидом PAL. Улучшенные свойства включают, в качестве неограничивающих примеров, такие свойства, как повышенная экспрессия белка, повышенная активность при различных температурах, повышенная термостабильность, повышенная активность при различных pH, повышенная стабильность, повышенная ферментативная активность, повышенная субстратная специфичность и/или аффинность, повышенная специфическая активность, повышенная резистентность к ингибированию субстратом и/или конечным продуктом, повышенная химическая стабильность, улучшенная хемоселективность, улучшенная устойчивость к растворению, повышенная переносимость кислого pH, повышенная переносимость протеолитической активности (т.е. сниженная чувствительность к протеолизу), сниженная агрегация, повышенная растворимость, сниженная иммуногенность и измененный температурный профиль.

[0077] Фраза "содержит меньше остатков фенилаланина" означает, что сконструированный полипептид PAL по изобретению будет сохранять по меньшей мере активность или стабильность по сравнению с референсной PAL в стандартном анализе (например, как описано в Примерах) после удаления одного или более остатков фенилаланина из последовательности полипептида посредством мутации в любую другую аминокислоту.

[0078] Термины "повышенная ферментативная активность" и "повышенная каталитическая активность" относятся к улучшенному свойству сконструированных полипептидов PAL, о котором может свидетельствовать повышение специфической активности (например, продуцируемого продукта/времени/массы протеина) и/или повышение процента превращения субстрата в продукт (например, процента превращения исходного количества субстрата в продукт за определенный период времени при использовании определенного количества PAL) по сравнению с референсным ферментом PAL (например, AvPAL дикого типа и/или другой сконструированной AvPAL). Примеры способов определения ферментативной активности

приведены в Примерах. Можно влиять на любое свойство, связанное с ферментативной активностью, включая классические свойства ферментов K_m , V_{max} или k_{cat} , изменения которых могут приводить к повышению ферментативной активности. Ферментативная активность может улучшаться в 1,1 раз относительно ферментативной активности соответствующего фермента дикого типа до 2 раз, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 25 раз, 50 раз, 75 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз или более относительно ферментативной активности природной PAL или другой сконструированной PAL, из которой получают полипептиды PAL.

[0079] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL имеют k_{cat} по меньшей мере 0,1/с, по меньшей мере 0,2/с, по меньшей мере 0,3/с, по меньшей мере 0,5/с, по меньшей мере 1,0/с и в некоторых предпочтительных вариантах осуществления более 2,0/с. В некоторых вариантах осуществления K_m находится в диапазоне от приблизительно 1 мкМ до приблизительно 5 мМ; от приблизительно 5 мкМ до приблизительно 2 мМ; от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 2 мМ или от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 1 мМ. В некоторых вариантах осуществления сконструированный фермент PAL демонстрирует ферментативную активность, улучшенную в 1,5-10 раз, 1,5-25 раз, 1,5-50 раз, 1,5-100 раз или более относительно активности референсного фермента PAL. Активность PAL можно измерять с помощью любого стандартного анализа, известного в этой области (например, посредством мониторинга изменений спектрофотометрических свойств реагентов или продуктов). В некоторых вариантах осуществления количество образующихся продуктов измеряют посредством разделения с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в комбинации с детекции поглощения УФ или флуоресценции напрямую или после дериватизации о-фталевого диальдегида (OPA). В некоторых вариантах осуществления сравнение ферментативных активностей осуществляют с использованием определенного препарата фермента, определенного анализа в определенных условиях и одного или более определенных субстратов, как более подробно представлено в настоящем описании. Как правило, при сравнении лизатов определяют

количество клеток и количество анализируемого белка, а также используют идентичные системы экспрессии и идентичные клетки-хозяева для минимизации колебаний количества фермента, продуцируемого клетками-хозяевами и присутствующего в лизатах.

[0080] В рамках изобретения термин "физиологический pH" означает диапазон pH, как правило, обнаруживаемый в тонком кишечнике индивидуума (например, человека). Как правило, существует градиент pH от пилорического сфинктера до толстого кишечника в диапазоне от 6,0 до 7,5.

[0081] Термины "протеолитическая активность" и "протеолиз", используемые в настоящем описании взаимозаменяемо, относятся к распаду белков на полипептиды меньшего размера или аминокислоты. Распад белков, как правило, является результатом гидролиза пептидной связи под действием ферментов протеаз (протеиназ). Ферменты протеазы включают, в качестве неограничивающих примеров, пепсин, трипсин, химотрипсин, эластазу, карбоксипептидазу А и В и пептидазы (например, аминопептидазы, дипептидазы и энтеропептидазы).

[0082] Фразы "сниженная чувствительность к протеолизу", "сниженная протеолитическая чувствительность" и "повышенная переносимость протеолиза" используют в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения того, что сконструированный полипептид P_{AL} по изобретению имеет более высокую ферментативную активность по сравнению с референсным P_{AL} в стандартном анализе (например, как описано в Примерах) после обработки одной или более протеазами.

[0083] Фраза "повышенная стабильность при хранении при повышенной температуре" означает, что сконструированный полипептид P_{AL} по изобретению будет сохранять больше активности по сравнению с референсной P_{AL} в стандартном анализе (например, как описано в Примерах) после его получения в сухой форме, например, посредством лиофилизации или сушки распылением, и хранения в течение периода времени в диапазоне от нескольких дней до многих месяцев при температуре выше комнатной температуры (например, 30°C, 37°C, 45°C, 55°C и т.д.).

[0084] Термин "агрегация" означает комкование или осаждение полипептида PAL. Агрегация может приводить к инаktivации фермента. Термин "сниженная агрегация" означает, что сконструированный полипептид PAL будет менее склонным к агрегации по сравнению с референсной PAL. В этой области известны способы анализа агрегации, включая, в качестве неограничивающих примеров, использование флуоресцентной микроскопии с соответствующими красителями (например, тиюфлавином Т или нильским красным), динамического светорассеяния, проточной цитометрии с соответствующими красителями (например, Bodipy), фильтрации и анализа посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS и/или вестерн-блоттинга, флуоресцентной корреляционной спектроскопии и электронной микроскопии. Существуют коммерчески доступные наборы для анализа агрегации (например, набор для анализа агрегации белков ProteoStat® [Enzo]).

[0085] Термин "превращение" относится к ферментативному превращению (или биотрансформации) субстратов в соответствующие продукты. Термин "процент превращения" относится к проценту субстрата, превращающегося в продукт в течение периода времени в определенных условиях. Таким образом, "ферментативную активность" или "активность" полипептида PAL можно выражать как "процент превращения" субстрата в продукт за определенный период времени.

[0086] Термин "строгость гибридизации" относится к условиям гибридизации, таким как условия промывки, при гибридизации нуклеиновых кислот. Как правило, реакции гибридизации осуществляют в условиях низкой строгости с последующими промывками разной, но высокой строгости. Термин "гибридизация в условиях умеренной строгости" относится к условиям, позволяющей ДНК-мишени связываться с комплементарной нуклеиновой кислотой, имеющей приблизительно 60% идентичности, предпочтительно - приблизительно 75% идентичности, приблизительно 85% идентичности по отношению к ДНК-мишени, более приблизительно 90% идентичности по отношению к полинуклеотиду-мишени. Примером условий умеренной

строгости являются условия, эквивалентные гибридизации в 50% формамиде, 5-кратном растворе Денхардта, 5-кратном SSPE, 0,2% SDS при 42°C с последующей промывкой в 0,2-кратном SSPE, 0,2% SDS при 42°C. Термин "гибридизация в условиях высокой строгости", как правило, относится к условиям, на приблизительно 10°C или менее отличающимся от температуры плавления T_m , определяемой в условиях раствора для определенной полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления термин "условия высокой строгости" относится к условиям, делающим возможной гибридизацию только тех последовательностей нуклеиновых кислот, которые образуют стабильные гибриды в 0,018 М NaCl при 65°C (т.е. если гибрид не является стабильным в 0,018 М NaCl при 65°C, он не будет стабильным в условиях высокой строгости, как предусмотрено в настоящем описании). Условия высокой строгости можно обеспечивать, например, посредством гибридизации в условиях, эквивалентных 50% формамида, 5-кратному раствору Денхардта, 5-кратному SSPE, 0,2% SDS при 42°C с последующей промывкой 0,1 SSPE и 0,1% SDS при 65°C. Другие условия высокой строгости представляют собой гибридизацию в условиях, эквивалентных гибридизации в 5-кратном SSC, содержащем 0,1% (масс./об.) SDS при 65°C и промывке в 0,1-кратном SSC, содержащем 0,1% SDS при 65°C. Другие условия гибридизации высокой строгости, а также условия умеренной строгости описаны в источниках, процитированных выше.

[0087] Термин "кодон-оптимизированный" относится к заменам кодонов полинуклеотида, кодирующего белок, кодонами, предпочтительно используемыми в конкретном организме таким образом, что кодируемый белок более эффективно экспрессируется в этом организме. Хотя генетический код является вырожденным в том смысле, что большинство аминокислот представлены несколькими кодонами, названными "синонимичными" кодонами, известно, что частота использования кодона конкретными организмами является неслучайной или отклоняется в сторону конкретных триплетов. Это предпочтение кодонов может быть более высоким относительно

указанного гена, генов с общей функцией или происхождением, или в высокоэкспрессирующихся белках по сравнению с белками с низким числом копий и в совокупных кодирующих белок областях генома организма. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие ферменты P4L, подвергают оптимизации кодонов для оптимальной продукции организмом-хозяином, выбранным для экспрессии. Термин "контрольная последовательность" предназначен для включения всех компонентов, необходимых или предпочтительных для экспрессии полинуклеотида и/или полипептида по изобретению. Каждая контрольная последовательность может являться нативной или чужеродной для последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Такие контрольные последовательности включают, в качестве неограничивающих примеров, лидерные последовательности, последовательности полиаденилирования, последовательности пропептида, промоторные последовательности, последовательности сигнального пептида, инициаторные последовательности и терминаторы транскрипции. Как минимум, контрольные последовательности включают промотор и сигналы терминации транскрипции и трансляции. В некоторых вариантах осуществления контрольные последовательности обеспечивают линкерами для встраивания специфических участков рестрикции, облегчающих лигирование контрольных последовательностей с кодирующей областью последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид.

[0088] Термин "функционально связанный" определяют в настоящем описании как конфигурацию, в которой контрольную последовательность помещают соответствующим образом (т.е. в функциональной взаимосвязи) в положение относительно интересующего полинуклеотида таким образом, что контрольная последовательность направляет или регулирует экспрессию полинуклеотида, кодирующего интересующий полипептид.

[0089] Термин "промоторная последовательность" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, распознаваемой клеткой-хозяином для экспрессии интересующего полинуклеотида, такого как кодирующая последовательность. Промоторная последовательность содержит последовательности контроля транскрипции, опосредующие

экспрессию интересующего полинуклеотида. Промотор может являться любой последовательностью нуклеиновой кислоты, демонстрирующей транскрипционную активность в выбранной клетке-хозяине, включая мутантные, укороченные и гибридные промоторы, и его можно получать из генов, кодирующих внеклеточные или внутриклеточные полипептиды и являющихся гомологичными или гетерологичными для клетки-хозяина.

[0090] Термин "субстрат" в контексте ферментативной реакции превращения относится к соединению или молекуле, на которую действует полипептид PAL. Термин "продукт" в контексте ферментативной реакции превращения относится к соединению или молекуле, образующейся при воздействии полипептида PAL на субстрат.

[0091] В рамках изобретения термин "культивирование" относится к выращиванию популяции клеток микроорганизмов в подходящих условиях с использованием любой подходящей среды (например, жидкой, гелевой или твердой).

[0092] Рекомбинантные полипептиды (например, варианты ферментов PAL) можно получать с использованием любых подходящих способов, известных в этой области. Например, существует широкий спектр различных способов мутагенеза, хорошо известных специалисту в этой области. Кроме того, наборы для мутагенеза также доступны у коммерческих поставщиков оборудования для молекулярной биологии. Доступны способы осуществления конкретных замен в определенных аминокислотах (сайт-специфически), специфических или случайных мутаций в локализованной области гена (область-специфически) или случайный мутагенез по всему гену (например, насыщающий мутагенез). Специалистам в этой области известно множество подходящих способов для получения вариантов фермента, включая, в качестве неограничивающих примеров, сайт-специфический мутагенез одноцепочечной ДНК или двухцепочечной ДНК с использованием ПЦР, кассетный мутагенез, синтез гена, ПЦР сниженной точности, перестановку и химический насыщающий мутагенез или любой другой подходящий способ, известный в этой области. Неограничивающие примеры способов, используемых для ДНК- и белковой инженерии, представлены в следующих патентах: патенте

США № 6117679; патенте США № 6420175; патенте США № 6376246; патенте США № 6586182; патенте США № 7747391; патенте США № 7747393; патенте США № 7783428 и патенте США № 8383346. После получения вариантов их можно подвергать скринингу на любое желаемое свойство (например, высокую или повышенную активность или низкую или сниженную активность, повышенную активность при различных температурах, повышенную термостабильность и/или стабильность при кислом pH и т.д.). В некоторых вариантах осуществления используют термин "рекомбинантные полипептиды PAL" (также обозначаемые в настоящем описании как "сконструированные полипептиды PAL", "варианты ферментов PAL" и "варианты PAL").

[0093] В рамках изобретения термин "вектор" означает конструкцию ДНК для встраивания последовательности ДНК в клетку. В некоторых вариантах осуществления вектор является экспрессирующим вектором, функционально связанным с подходящей контрольной последовательностью, способной обеспечивать в подходящем хозяине экспрессию полипептида, кодируемого последовательностью ДНК. В некоторых вариантах осуществления "вектор экспрессии" содержит промоторную последовательность, функционально связанную с последовательностью ДНК (например, трансгеном) для регуляции экспрессии в клетке-хозяине, а в некоторых вариантах осуществления также содержит последовательность терминатора транскрипции.

[0094] В рамках изобретения термин "экспрессия" включает любую стадию, вовлеченную в продукцию полипептида, включая, в качестве неограничивающих примеров, транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию и посттрансляционную модификацию. В некоторых вариантах осуществления термин также включает секрецию полипептида из клетки.

[0095] В рамках изобретения аминокислотная или нуклеотидная последовательность (например, промоторная последовательность, сигнальный пептид, последовательность терминатора и т.д.) является "гетерологичной" по отношению к другой последовательности, с которой она функционально связана, если две последовательности не ассоциированы друг с другом в природе.

[0096] В рамках изобретения термины "клетка-хозяин" и

"штамм-хозяин" относятся к подходящим хозяевам для экспрессирующих векторов, содержащих ДНК, представленную в настоящем описании (например, полинуклеотидные последовательности, кодирующие по меньшей мере один вариант AvPAL). В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева являются прокариотическими или эукариотическими клетками, трансформированными или трансфицированными с использованием векторов, сконструированных способами рекомбинантной ДНК, известными в этой области.

[0097] Термин "аналог" означает полипептид, имеющий более 70% идентичности последовательности, но менее 100% идентичности последовательности (например, более 75%, 78%, 80%, 83%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности) по отношению к референсному полипептиду. В некоторых вариантах осуществления аналоги включают не встречающиеся в природе аминокислотные остатки, включая, в качестве неограничивающих примеров, гомоаргинин, орнитин и норвалин, а также встречающиеся в природе аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления аналоги также включают один или более D-аминокислотных остатков и непептидные связи между двумя или более аминокислотными остатками.

[0098] Термин "терапевтический" относится к соединению, вводимому индивидууму, у которого наблюдают признаки или симптомы патологии, и оно имеет благоприятный или желаемый медицинский эффект.

[0099] Термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции, подходящей для фармацевтического использования для млекопитающего (например, человека) и содержащей фармацевтически эффективное количество сконструированного полипептида PAL по изобретению и приемлемый носитель.

[0100] Термин "генная терапия" используют по отношению к использованию генов (т.е. генетического материала) для лечения и/или профилактики заболевания у млекопитающего (например, человека). В некоторых вариантах осуществления генетический материал вносят непосредственно по меньшей мере в некоторые клетки млекопитающего. Не следует понимать, что настоящее

изобретение будет ограничено какими-либо конкретными способами или композициями, которые можно использовать для генной терапии.

[0101] Термин "мРНК-терапия" используют по отношению к использованию матричной РНК (мРНК) для лечения и/или профилактики заболевания у млекопитающего (например, человека). В некоторых вариантах осуществления генетический материал вносят непосредственно по меньшей мере в некоторые клетки млекопитающего. Не следует понимать, что настоящее изобретение будет ограничено какими-либо конкретными способами или композициями, которые можно использовать для мРНК-терапии.

[0102] Термин "эффективное количество" означает количество, достаточное для достижения желаемого результата. Специалист в этой области может определять эффективное количество с использованием рутинного экспериментирования.

[0103] Термины "выделенный" и "очищенный" используют в отношении молекулы (например, выделенной нуклеиновой кислоты, полипептида и т.д.) или другого компонента, отделенного от по меньшей мере одного другого компонента, с которым он ассоциирован в природе. Термин "очищенный" не требует абсолютно чистоты, скорее он является относительным определением.

[0104] Термин "индивидуум" включает млекопитающего, такого как человек, не являющиеся человеком приматы, домашний скот, животные-компаньоны и лабораторные животные (например, грызуны и зайцеобразные). Предполагают, что термин включает и самок, и самцов.

[0105] В рамках изобретения термин "пациент" означает любого индивидуума, которого оценивают на наличие заболевания, которого лечат от заболевания или который страдает заболеванием.

[0106] Термин "младенец" относится к ребенку возрастом от первого месяца после рождения до приблизительно одного (1) года. В рамках изобретения термин "новорожденный" относится к ребенку возрастом от рождения до 28-ого дня жизни. Термин "недоношенный ребенок" относится к младенцу, рожденному после полной двадцатой недели беременности, но до полного срока, как правило, весящему от ~500 до ~2499 граммов при рождении. "Младенец с очень низкой массой тела при рождении" является младенцем, весящим менее 1500

г при рождении.

[0107] В рамках изобретения термин "ребенок" относится к индивидууму, не достигшему совершеннолетия для дачи согласия на лечение или процедуры исследования. В некоторых вариантах осуществления термин относится к лицу возрастом от рождения до пубертатного периода.

[0108] В рамках изобретения термин "взрослый" относится к индивидууму, достигшему совершеннолетия для соответствующей юрисдикции (например, 18 лет в США). В некоторых вариантах осуществления термин относится к любому взрослому, зрелому организму. В некоторых вариантах осуществления термин "молодой человек" относится к индивидууму возрастом менее 18 лет, но достигшему половой зрелости.

[0109] В рамках изобретения термины "композиция" и "состав" включают продукты, содержащие по меньшей мере одну сконструированную P_{AL} по изобретению, предназначенную для любого подходящего использования (например, фармацевтические композиции, пищевые добавки, пищу и т.д.).

[0110] Термин "введение" композиции означает предоставление композиции по изобретению индивидууму (например, индивидууму, страдающему от эффектов PKU).

[0111] Термин "носитель" по отношению к фармацевтической композиции означает любой стандартный фармацевтический носитель, буферы и эксципиенты, такие как стабилизаторы, консерванты и адъюванты.

[0112] Термин "фармацевтически приемлемый" означает материал, который можно вводить индивидууму, не вызывая какие-либо нежелательные биологические эффекты или неблагоприятное взаимодействие с любым из компонентов, в котором он содержится, и который обладает желаемой биологической активностью.

[0113] В рамках изобретения термин "эксципиент" относится к любому фармацевтически приемлемому вспомогательному веществу, носителю, дилуенту, адъюванту или другому ингредиенту, иному, чем активный фармацевтический ингредиент (API; например, сконструированные полипептиды P_{AL} по изобретению). Эксципиенты, как правило, включают с целью составления и/или введения.

[0114] Термин "терапевтически эффективное количество" при использовании в отношении симптомов заболевания/состояния относится к количеству и/или концентрации соединения (например, сконструированных полипептидов PAL), улучшающего, ослабляющего или устраняющего один или более симптомов заболевания/состояния или предотвращает или задерживает дебют симптомов (например, PKU). В некоторых вариантах осуществления термин используют в отношении количества композиции, вызывающего биологический (например, медицинский) ответ в ткани, системе или животном, к которому стремится исследователь, лечащий врач, ветеринар или другой клиницист.

[0115] Термин "терапевтически эффективное количество" при использовании в отношении заболевания/состояния относится к количеству и/или концентрации композиции, улучшающей, ослабляющей или устраняющей заболевание/состояние.

[0116] Предполагают, что термины "лечение" и "лечить" включают профилактическое, а также паллиативное лечение.

Сконструированные полипептиды PAL:

[0117] Родительские полипептиды PAL, из которых получают сконструированные полипептиды PAL по изобретению, включают штаммы бактерий, таких как *Anabaena* (например, *A. variabilis*), *Nostoc* (например, *N. punctiforme*), *Rhodospiridium* (например, *R. toruloides*), *Streptomyces* (например, *S. maritimus* или *S. verticillatus*), *Oscillatoria* sp., *Gloeocapsa* sp. и *Rivularia* sp. Ферменты PAL из этих штаммов идентифицированы и хорошо известны. Гомологичные последовательности ферментов *Anabaena* (*A. variabilis*) ATCC29413 и NCBIYP_324488.1; *Nostoc* (*N. punctiforme*) ATCC29133 и NCBI YP_00186563.1; *Oscillatoria* sp. PCC6506 и NCBI ZP_07108482.1 и *Gloeocapsa* sp. PCC7428 и NCBIYP_007127054.1 представлены на фигуре 1 патентной заявки США № 2014/0314843, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

[0118] Кроме того, если конкретный вариант PAL (т.е. сконструированный полипептид PAL) обозначают со ссылкой на модификацию конкретных аминокислотных остатков в последовательности PAL дикого типа или референсной PAL, следует понимать, что в изобретение включены варианты другой PAL,

модифицированной в эквивалентных положениях (что определяют из оптимального выравнивания аминокислотных последовательностей между соответствующими аминокислотными последовательностями). В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL получают из любого из указанных полипептидов из указанных выше штаммов бактерий (т.е. *Nostoc* [*N. punctiforme*], *Rhodospiridium* [*R. toruloides*], *Streptomyces* [*S. maritimus* или *S. verticillatus*], *Oscillatoria* sp., *Gloeocapsa* sp. и *Rivularia* sp.). В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL по изобретению содержит консервативный активный участок Ala167-Ser168-Gly169 и содержит по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности относительно SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL имеют не только активность PAL, но также являются активными в отношении субстратов тирозина и/или гистидина.

[0119] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL получают посредством культивирования микроорганизма, содержащего по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один сконструированный полипептид PAL в условиях, способствующих продукции сконструированного полипептида PAL. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL затем выделяют из получаемой культуральной среды и/или клеток.

[0120] Настоящее изобретение относится к примерам сконструированных полипептидов PAL, имеющих активность PAL. В Примерах представлены таблицы, в которых приведена информация о структуре последовательностей с корреляцией конкретных признаков аминокислотной последовательности и функциональной активности сконструированных полипептидов PAL. Эта информация о корреляции структуры и функции представлена в виде специфических отличий аминокислотных остатков относительно референсного

сконструированного полипептида SEQ ID NO:2, вместе со связанными экспериментально определенными данными об активности для примеров сконструированных полипептидов PAL.

[0121] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL по изобретению, имеющие активность PAL, содержат а) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности относительно референсной последовательности SEQ ID NO:2; b) отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:2 в одном или более положениях аминокислот; и c) демонстрируют улучшенное свойство, выбранное из i) повышенной каталитической активности, ii) сниженной протеолитической чувствительности, iii) сниженной агрегации, iv) повышенной стабильности в виде лиофилизированного препарата при повышенных температурах, v) сниженного количества остатков фенилаланина в их первичной структуре или комбинации любых из i), ii), iii), iv) или v) по сравнению с референсной последовательностью.

[0122] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности в отношении SEQ ID NO:2 и отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:2 в одном или более положениях аминокислот (например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 20 или более положениях аминокислот по сравнению с SEQ ID NO:2 или последовательностью, имеющей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:2). В некоторых вариантах осуществления отличие остатка по сравнению с SEQ ID NO:2 в одном или более положениях

включает по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более консервативных замен аминокислот. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL является полипептидом, указанным в таблицах, приведенных в Примерах.

[0123] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL по изобретению, имеющие активность PAL, содержат а) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности относительно референсной последовательности SEQ ID NO:4; b) отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:4 в одном или более положениях аминокислот; и c) демонстрируют улучшенное свойство, выбранное из i) повышенной каталитической активности, ii) сниженной протеолитической чувствительности, iii) сниженной агрегации, iv) повышенной стабильности в виде лиофилизированного препарата при повышенных температурах, v) сниженного количества остатков фенилаланина в его первичной структуре или комбинации любых из i), ii), iii), iv) или v) по сравнению с референсной последовательностью.

[0124] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности в отношении SEQ ID NO:4 и отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:4 в одном или более положениях аминокислот (например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 20 или более положениях аминокислот по сравнению с SEQ ID NO:4 или последовательностью, имеющей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичность аминокислотной последовательности в отношении SEQ ID NO:4). В некоторых вариантах осуществления отличие остатка

по сравнению с SEQ ID NO:4 в одном или более положениях включает по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более консервативных замен аминокислот. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL является полипептидом, указанным в таблицах, приведенных в Примерах.

[0125] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности в отношении SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления отличие аминокислот составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 или более положений аминокислот. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности в отношении SEQ ID NO:6 и по меньшей мере одно отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:6 в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 16, 16/150, 44/239/495, 44/56, 44/56/102/239/285/469/470/495, 44/239, 44/239/285/470, 44/239/285/469/495, 44/239/285/470, 44/239/469/470, 44/239/470/546, 44/239/495/546, 44/469/470, 102, 102/470, 162, 162, 165, 188, 239/285/469, 239/285, 239/469/470/495, 264, 267, 267, 285/470, 285/469/470/495, 285/470/495, 364, 455, 469/470, 472 и 482 или любую их комбинацию, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления замены аминокислот выбраны из F16A/E/K/N/R/S/T/V/W, F16K/F150A, N44C/T239A/T495A, N44H/I56V, N44H/I56V/T102Q/T239A/I285L/V469I/D470E/T495A, N44H/T239A,

N44H/T239A/I285L/D470E, N44H/T239A/I285R/V469I/T495A,
 N44H/T239A/I285R/D470E, N44H/T239A/V469I/D470E,
 N44H/T239A/D470E/S546A, N44H/T239A/T495A/S546A,
 N44H/V469I/D470E, T102Q, T102Q/D470E, F162Q/W, I165L, F188I,
 T239A/I285L/V469I, T239A/I285R, T239A/V469I/D470E/T495A, F264H,
 F267G/V, I285L/D470E, I285L/V469I/D470E/T495A,
 I285R/D470E/T495A, L364E/H/S/T, N455S, V469I/D470E, F472A и
 F482C/N, где положения аминокислот пронумерованы относительно
 SEQ ID NO:6.

[0126] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления отличие аминокислот составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 или более положений аминокислот. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие по меньшей мере одно улучшенное свойство имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности в отношении SEQ ID NO:6 и по меньшей мере одно отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:6 в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 16, 264, 364 и 472, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления замены аминокислот выбраны из F16S, F264H, L364H, F472A и F482N, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:6.

[0127] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по

меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления отличие аминокислот составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 или более положений аминокислот. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:6 и по меньшей мере одно отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:8 в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 16, 16/150, 162, 188, 264, 267, 398, 434, 472A/L/V и F482C/N/S, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления замены аминокислот выбраны из F16A/E/K/L/M/N/P/R/S/T/V/W, F16K/F150A, F162M/Q/W, F188A/I/N, F264H, F267G/L/Q/S/V, F398H, F434V, F472A/L/V и F482C/N/S, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:6.

[0128] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления отличие аминокислоты составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 или более положений аминокислот. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по

меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по
 меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по
 меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по
 меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной
 последовательности по отношению к SEQ ID NO:8 и по меньшей мере
 одно отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:8
 в одном или более положениях аминокислот, выбранных из
 44/102/285/364, 44/285/364, 44/47/204/209/285,
 44/47/364/470/495, 44/54/285/470, 44/54/56/204/239/285/364/495,
 44/54/56/204/239/470/495, 44/204/285/364/470/495,
 44/204/209/285, 44/209/285/460/495, 47/54/209,
 47/204/209/239/285/495, 47/204/285/364/495, 47/209/239/364,
 47/239/285/364, 47/470, 54, 54/285/470, 54/56/204/209/470,
 54/56/204/209/495, 54/56/285/364/470, 54/56, 54/56/285/470,
 54/56/204/495, 54/56/209/562, 54/165/204/209/239/285/470/495,
 54/239/495, 54/470, 56, 165, 204, 204/209/239/285/470/495,
 204/209/364, 204/209/364/495, 204/239, 204/239/285, 204/364,
 204/470, где положения аминокислот пронумерованы относительно
 SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления замены
 аминокислот выбраны из N44C/T102Q/I285R/L364H, N44C/I285R/L364E,
 N44H/A47K/R204K/S209P/I285R, N44H/A47K/L364H/D470E/T495A,
 N44H/K54P/I285R/D470E,
 N44H/K54P/I56V/R204K/T239A/I285R/L364S/T495A,
 N44H/K54P/I56V/R204K/T239A/D470E/T495A,
 N44H/R204K/I285R/L364H/D470E/T495A, N44H/R204K/S209P/I285R,
 N44H/S209P/I285R/T460G/T495A, A47K/K54P/S209P,
 A47K/R204K/S209P/T239A/I285R/T495A,
 A47K/R204K/I285R/L364H/T495A, A47K/S209P/T239A/L364H,
 A47K/T239A/I285R/L364H, A47K/T239A/I285R/L364H, A47K/D470E,
 K54E, K54P/I285L/D470E, K54E/I285R/D470E,
 K54E/I56V/R204K/S209P/D470E, K54E/I56V/R204K/S209P/T495A,
 K54E/I56V/I285R/L364S/D470E, K54P/I56V, K54P/I56V/I285L/D470E,
 K54P/I56V/R204K/T495A, K54P/I56V/S209P/I562N,
 K54P/I165L/R204K/S209P/T239A/I285R/D470E/T495A,
 K54P/T239A/T495A, K54P/D470E, I56V, I165L, R204K,
 R204K/S209P/T239A/I285R/D470E/T495A, R204K/S209P/L364E/T495A,

R204K/S209P/L364H, R204K/S209P/L364H/T495A, R204K/T239A,
 R204K/T239A/I285R, R204K/L364H, R204K/D470E,
 S209P/I285L/L364H/D470E, S209P/I285R/L364E/D470E,
 S209P/I285R/L364E/D470E/T495A, S209P/I285R/L364H/D470E/T495A,
 S209P/L364H, S209P/L364H/T495A, S209P/D470E, T239A/L364H,
 I285R/L364H, I285R/L364H/T495A, L364H, L364H/D470E, D470E и
 T495A, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ
 ID NO:8.

[0129] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах осуществления отличие аминокислот составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 или более положений аминокислот. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:12 и по меньшей мере одно отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:12 в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 54/56/162/204/285, 54/56/398/472, 54/162/204/398, 54/162/398, 54/204/398, 54/56/162/204/398, 54/56/204/285, 54/56/204/398, 54/56/204/398/472, 54/56/285, 54/56/398, 54/162/398, 54/204/285/398/472, 54/285/398, 54/285/398/472, 56/162/398, 56/204/285, 56/204/398, 56/204/398/460, 56/204/398/472, 56/285, 56/285/398/472, 56/398, 56/398/472 и 201/204/398, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах осуществления замены аминокислот выбраны из

K54E/I56V/F162W/R204K/L285I, K54E/I56V/F398H/F472L,
 K54E/F162W/R204K/F398H, K54E/F162W/F398H, K54E/R204K/F398H,
 K54P/I56V/F162W/R204K/F398H, K54P/I56V/R204K/L285I,
 K54P/I56V/R204K/F398H, K54P/I56V/R204K/F398H/F472L,
 K54P/I56V/L285I, K54P/I56V/F398H, K54P/F162W/F398H,
 K54P/R204K/L285I/F398H/F472L, K54P/L285I/F398H,
 K54P/L285I/F398H/F472L, I56V/F162W/F398H, I56V/R204K/L285I,
 I56V/R204K/F398H, I56V/R204K/F398H/T460G,
 I56V/R204K/F398H/F472L, I56V/L285H, I56V/L285I,
 I56V/L285I/F398H/F472L, I56V/F398H, I56V/F398H, I56V/F398H/F472L
 и T201A/R204K/F398H, где положения аминокислот пронумерованы
 относительно SEQ ID NO:12.

[0130] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или 99% идентичности последовательности относительно SEQ ID NO:2, 4, 8, 10 и/или 12. В некоторых вариантах осуществления сконструированный PAL полипептид, демонстрирующий по меньшей мере одно улучшенное свойство, выбран из SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и 12.

[0131] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к функциональным фрагментам сконструированных полипептидов PAL. В некоторых вариантах осуществления функциональные фрагменты содержат по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% активности сконструированного полипептида PAL, из которых их получают (т.е. родительского сконструированного PAL). В некоторых вариантах осуществления функциональные фрагменты содержат по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере

приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99% родительской последовательности сконструированной PAL. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является укороченным на менее чем 5, менее чем 10, менее чем 15, менее чем 10, менее чем 25, менее чем 30, менее чем 35, менее чем 40, менее чем 45 и менее чем 50 аминокислот.

[0132] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к функциональным фрагментам сконструированных полипептидов PAL. В некоторых вариантах осуществления функциональные фрагменты имеют по меньшей мере приблизительно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% активности сконструированного полипептида PAL, из которого их получают (т.е. родительской сконструированной PAL). В некоторых вариантах осуществления функциональные фрагменты содержат по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% родительской последовательности сконструированной PAL. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является укороченным на менее чем 5, менее чем 10, менее чем 15, менее чем 10, менее чем 25, менее чем 30, менее чем 35, менее чем 40, менее чем 45, менее чем 50, менее чем 55, менее чем 60, менее чем 65 или менее чем 70 аминокислот.

[0133] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL, проявляющий по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:6, 8, 10, 12 и/или 14 и отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12, в одном или более положениях аминокислот (например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15 или более положениях аминокислот) по сравнению с SEQ ID NO:4, 6, 8,

10 и/или 12 или последовательностью, имеющей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12. В некоторых вариантах осуществления сконструированные PAL содержат по меньшей мере 90% идентичности последовательности относительно SEQ ID NO:6 и содержат отличие аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12 в по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положениях аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, сконструированный полипептид состоит из последовательности SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12.

[0134] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL, проявляющий по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:4 или ее функциональному фрагменту и отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:4 в одном или более положениях аминокислот (например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15 или более положениях аминокислот) по сравнению с SEQ ID NO:4 или последовательностью, имеющей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:4. В некоторых вариантах осуществления сконструированные PAL имеют по меньшей мере 90% идентичности последовательности относительно SEQ ID NO:4 и содержат отличие аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO:4 по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более

положениях аминокислот. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL состоит из последовательности SEQ ID NO:4.

[0135] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL, проявляющий по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеет по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:6 или ее функциональному фрагменту и отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:6 в одном или более положениях аминокислот (например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15 или более положениях аминокислот) по сравнению с SEQ ID NO:6 или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления сконструированные PAL имеют по меньшей мере 90% идентичности последовательности относительно SEQ ID NO:6 и содержат отличие аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO:6 по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положениях аминокислот. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL состоит из последовательности SEQ ID NO:6.

[0136] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:8 или ее

функциональному фрагменту и отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:8 в одном или более положениях аминокислот (например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15 или более положениях аминокислот) по сравнению с SEQ ID NO:8 или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления сконструированные PAL имеют по меньшей мере 90% идентичности последовательности относительно SEQ ID NO:8 и содержат отличие аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO:8 по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положениях аминокислот. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL состоит из последовательности SEQ ID NO:8.

[0137] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:10 или ее функциональному фрагменту и отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:10 в одном или более положениях аминокислот (например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15 или более положениях аминокислот) по сравнению с SEQ ID NO:10 или последовательностью, имеющей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:10. В некоторых вариантах осуществления сконструированные PAL имеют по меньшей мере 90% идентичности последовательности относительно SEQ ID

NO:10 и содержат отличие аминокислоты по сравнению с SEQ ID NO:10 по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положениях аминокислот. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL состоит из последовательности SEQ ID NO:10.

[0138] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие по меньшей мере одно улучшенное свойство, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:12 или ее функциональному фрагменту и отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:12 в одном или более положениях аминокислот (например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15 или более положениях аминокислот) по сравнению с SEQ ID NO:12 или последовательностью, имеющей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:12. В некоторых вариантах осуществления сконструированные PAL имеют по меньшей мере 90% идентичности последовательности относительно SEQ ID NO:12 и содержат отличие аминокислот по сравнению с SEQ ID NO:12 по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положениях аминокислот. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL состоит из последовательности SEQ ID NO:12.

Варианты со сниженной чувствительностью к протеолизу:

[0139] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL по изобретению имеют активность PAL, проявляют сниженную чувствительность к протеолизу и содержат: а) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности относительно референсной

последовательности SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12; b) отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12 в одном или более положениях аминокислот.

[0140] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, демонстрирующие сниженную чувствительность к протеолизу, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12 и отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12 в одном или более положениях аминокислот (например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 20 или более положениях аминокислот по сравнению с SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12 или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12).

[0141] В некоторых вариантах осуществления протеолитическую чувствительность сконструированных полипептидов PAL снижают по меньшей мере на 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% от чувствительности PAL дикого типа (например, AvPAL, имеющей SEQ ID NO:2) или по сравнению с референсным полипептидом PAL, по существу, в тех же условиях. Протеолитическую активность можно измерять любыми подходящими способами, известными в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, способы, описанные в Примерах.

[0142] В некоторых вариантах осуществления сконструированные

полипептиды PAL, имеющие сниженную чувствительность к протеолизу, имеют сниженную чувствительность к композиции, содержащей одну или более протеаз, включая, в качестве неограничивающих примеров, пепсин, трипсин, химотрипсин, карбоксипептидазу А и В, пептидазы (например, аминопептидазу, дипептидазу и энтеропептидазу), когда референсную PAL и сконструированную PAL, имеющую сниженную чувствительность, сравнивают и подвергают воздействию, по существу, одного и того же количества и типа протеазы, по существу, в тех же условиях.

[0143] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL, имеющий сниженную чувствительность к протеолизу, имеет уровни ферментативной активности приблизительно в 1,0 раз, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 25 раз, 50 раз, 75 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз или более превышает ферментативную активность референсного PAL (например, AvPAL). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды имеют более высокую ферментативную активность по сравнению с референсной PAL, если активность измеряют в диапазоне pH от 4,5 до 7,5, если активность измеряют в диапазоне pH от 4,5 до 6,5, если активность измеряют в диапазоне pH от 5,0 до 7,5, если активность измеряют в диапазоне pH от 5,0 до 6,5, если активность измеряют в диапазоне pH от 5,5 до 7,5 и/или если активность измеряют в диапазоне pH от 5,5 до 6,5. В некоторых других вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL имеют значение K_m в диапазоне от 1 мкМ до 5 мМ.

Варианты с повышенной переносимостью хранения при повышенных температурах:

[0144] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL по изобретению имеют активность PAL, лучше переносят хранение при повышенных температурах и содержат: а) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности относительно референсной последовательности SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12 или ее фрагменту; и b) отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:4, 6, 8, 10, и/или 12 в одном или более положениях

аминокислот.

[0145] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, проявляющие повышенную переносимость хранения при повышенных температурах по сравнению с AvPAL дикого типа и/или другим референсным полипептидом, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12 и отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:4 в одном или более положениях аминокислот (например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 20 или более положениях аминокислот по сравнению с SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12 или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12.

[0146] В некоторых вариантах осуществления, если все другие условия анализа являются, по существу, одинаковыми, сконструированные полипептиды PAL, имеющие повышенную переносимость хранения при повышенных температурах по сравнению с референсным полипептидом PAL, имеют повышенную переносимость при температуре приблизительно 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 55°C, 56°C, 57°C, 58°C, 59°C, 60°C и т.д.

[0147] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, имеющие повышенную переносимость хранения при повышенных температурах, также демонстрируют более высокую активность PAL по сравнению с референсной PAL при измерении посредством стандартного анализа. В настоящем изобретении можно

использовать любой подходящий анализ, включая, в качестве неограничивающих примеров, анализы, представленные в настоящем описании.

Варианты, содержащие меньше остатков фенилаланина:

[0148] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL по изобретению имеют активность PAL и сниженное количество остатков фенилаланина в своей первичной последовательности и содержат: а) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности относительно референсной последовательности SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12; и/или b) отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12 в одном или более положениях аминокислот.

[0149] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, содержащие сниженное количество остатков фенилаланина в своей первичной последовательности, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12 и отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12 в одном или более положениях аминокислот (например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 20 или более положениях аминокислот по сравнению с SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12 или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12).

[0150] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, содержащие сниженное количество остатков фенилаланина в своей первичной последовательности, имеют по

меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности аминокислотной последовательности по отношению к SEQ ID NO:6 и отличие аминокислотного остатка по сравнению с SEQ ID NO:6 в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 16, 16/150, 162, 188, 264, 267, 398, 434, 472A/L/V и F482C/N/S или любой их комбинации при оптимальном выравнивании аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления отличия аминокислот находятся в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 или более положениях аминокислот.

[0151] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, содержащие сниженное количество остатков фенилаланина в своей первичной последовательности, имеют по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности относительно SEQ ID NO:6 и содержат отличие аминокислотного остатка в положении F16, F150, F162, F188, F264, F267, F398, F434, F472, F482 и, необязательно, и отличие аминокислотного остатка в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положениях аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, отличие аминокислотного остатка выбирают из F16A/E/K/L/M/N/P/R/S/T/V/W, F16K/F150A, F162M/Q/W, F188A/I/N, F264H, F267G/L/Q/S/V, F398H, F434V, F472A/L/V и F482C/N/S, где аминокислотные остатки пронумерованы относительно SEQ ID NO:6.

[0152] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, содержащие меньше остатков фенилаланина, чем PAL дикого типа, также имеют протеолитическую чувствительность, сниженную по меньшей мере на 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% относительно чувствительности PAL дикого типа (например, AvPAL,

имеющей SEQ ID NO:2) или по сравнению с референсным полипептидом PAL, по существу, в тех же условиях. Активность можно измерять любыми подходящими способами, известными в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, способы, описанные в Примерах.

[0153] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, содержащие меньше остатков фенилаланина, чем PAL дикого типа в своей первичной последовательности, имеют сниженную чувствительность к композициям, содержащим одну или более протеаз, включая, в качестве неограничивающих примеров, пепсин, трипсин, химо tripsин, карбоксипептидазу А и В, пептидазы (например, аминопептидазу, дипептидазу и энтеропептидазу), если референсная PAL и сконструированная PAL, имеющая сниженное содержание фенилаланина, сравнивают и подвергают воздействию, по существу, того же количества и типа протеазы, по существу, в тех же условиях.

[0154] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL, содержащие сниженное количество остатков фенилаланина в своей первичной последовательности, имеют уровни ферментативной активности, приблизительно в 1,0 раз, 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 25 раз, 50 раз, 75 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз или более превышают ферментативную активность референсной PAL (например, AvPAL). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды имеют более высокую ферментативную активность по сравнению с референсной PAL, если активность измеряют в диапазоне pH от 4,5 до 7,5, если активность измеряют в диапазоне pH от 4,5 до 6,5, если активность измеряют в диапазоне pH от 5,0 до 7,5, если активность измеряют в диапазоне pH от 5,0 до 6,5, если активность измеряют в диапазоне pH от 5,5 до 7,5 и/или если активность измеряют в диапазоне pH от 5,5 до 6,5. В некоторых других вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL имеют значение K_m в диапазоне от 1 мкМ до 5 мМ.

[0155] Кроме того, предполагают, что любые из примеров сконструированных полипептидов (т.е. все из вариантов, приведенных в таблицах и представленных в настоящем описании)

можно использовать в качестве исходной аминокислотной последовательности для синтеза других сконструированных полипептидов PAL, например, с помощью последовательных раундов эволюции посредством добавления новых комбинаций различных отличий аминокислот из других полипептидов и других положений остатков, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления дополнительного улучшения достигают посредством включения отличий аминокислот в положения остатков, сохраняющихся неизменными на всем протяжении более ранних раундов эволюции. Это не означает, что настоящее изобретение ограничено каким-либо конкретным способом получения сконструированных полипептидов PAL, т.к. можно использовать любой подходящий способ, включая, в качестве неограничивающих примеров, способы, представленные в настоящем описании.

Полинуклеотиды, кодирующие сконструированные полипептиды, экспрессирующие векторы и клетки-хозяева:

[0156] Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим сконструированные полипептиды PAL, представленные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды функционально связаны с одной или более гетерологичными регуляторными последовательностями, регулирующими экспрессию генов, для получения рекомбинантного полинуклеотида, способного экспрессировать полипептид. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие конструкции, содержащие по меньшей мере один гетерологичный полинуклеотид, кодирующий сконструированные полипептиды PAL, встраивают в подходящие клетки-хозяева для экспрессии соответствующих полипептидов PAL.

[0157] Как будет понятно специалисту в этой области, доступность белковой последовательности и знание о кодонах, соответствующих различным аминокислотам, обеспечивают описание всех полинуклеотидов, которые могут кодировать интересующие полипептиды. Врожденность генетического кода, в котором одни и те же аминокислоты кодируются альтернативными или синонимичными кодонами, позволяет получать огромное количество нуклеиновых кислот, все из которых кодируют сконструированный полипептид PAL.

Таким образом, изобретение относится к способам и композициям для получения каждого возможного варианта полинуклеотидов PAL, который можно получать и который кодирует полипептиды PAL, представленные в настоящем описании, посредством селекции комбинаций на основе возможного выбора кодонов, и все такие варианты считают конкретно описанными для любого полипептида, представленного в настоящем описании, включая аминокислотные последовательности, приведенные в Примерах (например, в различных таблицах).

[0158] В некоторых вариантах осуществления кодоны, предпочтительно, оптимизируют для использования выбранной клеткой-хозяином для продукции белка. Например, предпочтительные кодоны, используемые в бактериях, как правило, используют для экспрессии в бактериях. Таким образом, кодон-оптимизированные полинуклеотиды, кодирующие сконструированные полипептиды PAL, содержат предпочтительные кодоны в приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более 90% положений кодонов в полноразмерной кодирующей области.

[0159] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид PAL кодирует сконструированный полипептид, имеющий активность PAL, со свойствами, представленными в настоящем описании, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности по отношению к референсной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:3, 5, 7, 9 и/или 11, или аминокислотной последовательности любого варианта (например, вариантов, представленных в Примерах), и одно или более отличий остатков по сравнению с референсным полинуклеотидом SEQ ID NO:3, 5, 7, 9 и/или 11 или аминокислотной последовательности любого варианта, представленного в Примерах (например, в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положений аминокислотных остатков). В некоторых вариантах осуществления референсную последовательность выбирают из SEQ ID NO:3, 5, 7, 9 и/или 11.

[0160] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид PAL кодирует сконструированный полипептид, имеющий активность

PAL, со свойствами, представленными в настоящем описании, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности относительно референсной последовательности SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12 и одно или более отличий остатков по сравнению с SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12.

[0161] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий сконструированные полипептиды PAL, содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из полинуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:3, 5, 7, 9 и/или 11. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид PAL имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности нуклеотидных остатков по отношению к SEQ ID NO:3, 5, 7, 9 и/или 11.

[0162] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды могут гибридизоваться в условиях высокой строгости с референсной полинуклеотидной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO:3, 5, 7, 9 и/или 11, или комплементарной ей последовательностью, или полинуклеотидной последовательностью, кодирующей любой из вариантов полипептидов PAL, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, способный гибридизоваться в условиях высокой строгости, кодирует полипептид PAL, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или более отличий остатков по сравнению с SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12.

[0163] В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид, кодирующий любой из сконструированных полипептидов PAL, обрабатывают различными способами для облегчения экспрессии полипептида PAL. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие полипептиды PAL, содержат экспрессирующие векторы, в которых присутствует одна или более контрольных последовательностей для регуляции экспрессии полинуклеотидов и/или полипептидов PAL. Манипуляции с выделенным полинуклеотидом перед его инсерцией в вектор могут быть

желательными или необходимыми в зависимости от используемого экспрессирующего вектора. Способы модификации полинуклеотидов и последовательностей нуклеиновых кислот с использованием способов рекомбинантных ДНК хорошо известны в этой области. В некоторых вариантах осуществления контрольные последовательности включают, помимо прочего, промоторы, лидерные последовательности, последовательности полиаденилирования, последовательности пропептида, последовательности сигнального пептида и терминаторы транскрипции. В некоторых вариантах осуществления подходящие промоторы выбирают с учетом выбора клеток-хозяев. В случае бактериальных клеток-хозяев, подходящие промоторы для регуляции транскрипции конструкций нуклеиновых кислот по изобретению, включают, в качестве неограничивающих примеров, промоторы, полученные из оперона *lac* *E. coli*, гена агаразы *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), гена левансахаразы *Bacillus subtilis* (*sacB*), гена альфа-амилазы *Bacillus licheniformis* (*amyL*), гена мальтогенной амилазы *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), гена альфа-амилазы *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), гена пенициллиназы *Bacillus licheniformis* (*penP*), генов *xylA* и *xylB* *Bacillus subtilis* и прокариотического гена бета-лактамазы (см., например, Villa-Kamaroff et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 75:3727-3731 [1978]), а также промотор *tac* (см., например, DeBoer et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 80:21-25 [1983]). Неограничивающие примеры промоторов для клеток-хозяев мицелиальных грибов включают, промоторы, полученные из генов ТАКА-амилазы *Aspergillus oryzae*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei*, нейтральной альфа-амилазы *Aspergillus niger*, кислотоустойчивой альфа-амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы (*glaA*) *Aspergillus niger* или *Aspergillus awamori*, липазы *Rhizomucor miehei*, щелочной протеазы *Aspergillus oryzae*, триозофосфатизомеразы *Aspergillus oryzae*, ацетамидазы *Aspergillus nidulans* и трипсин-подобной протеазы *Fusarium oxysporum* (см., например, W096/00787), а также промотор NA2-tpi (гибрид промоторов генов нейтральной альфа-амилазы *Aspergillus niger* и триозофосфатизомеразы *Aspergillus oryzae*) и их мутантные, укороченные и гибридные промоторы. Примеры промоторов дрожжевых

клеток можно получать из генов енолазы (ENO-1) *Saccharomyces cerevisiae*, галактокиназы (GAL1) *Saccharomyces cerevisiae*, алкогольдегидрогеназы/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ADH2/GAP) *Saccharomyces cerevisiae* и 3-фосфоглицераткиназы *Saccharomyces cerevisiae*. Другие промоторы дрожжевых клеток, которые можно использовать, известны в этой области (см., например, Romanos et al., Yeast 8:423-488 [1992]).

[0164] В некоторых вариантах осуществления контрольная последовательность также является подходящей последовательностью терминатора транскрипции (т.е. последовательностью, распознаваемой клеткой-хозяином для терминации транскрипции). В некоторых вариантах осуществления последовательность терминатора функционально связана с 3'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид PAL. В настоящем изобретении можно использовать любой подходящий терминатор, являющийся функциональным в выбранной клетке-хозяине. Примеры терминаторов транскрипции для клеток-хозяев мицелиальных грибов можно получать из генов ТАКА-амилазы *Aspergillus oryzae*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, антранилатсинтазы *Aspergillus nidulans*, альфа-глюкозидазы *Aspergillus niger* и трипсин-подобной протеазы *Fusarium oxysporum*. Примеры терминаторов для дрожжевых клеток-хозяев можно получать из генов енолазы *Saccharomyces cerevisiae*, цитохрома С (CYC1) *Saccharomyces cerevisiae* и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae*. В этой области известны другие терминаторы для дрожжевых клеток-хозяев, которые можно использовать (см., например, Romanos et al., выше).

[0165] В некоторых вариантах осуществления контрольная последовательность также является подходящей лидерной последовательностью (т.е. нетранслируемой областью мРНК, важной для трансляции клеткой-хозяином). В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность функционально связана с 5'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид PAL. В настоящем изобретении можно использовать любую подходящую лидерную последовательность, являющуюся функциональной в выбранной клетке-хозяине. Примеры лидерных последовательностей для клеток-хозяев мицелиальных грибов получают из генов ТАКА-

амилазы *Aspergillus oryzae* и триозофосфатизомеразы *Aspergillus nidulans*. Подходящие лидерные последовательности для дрожжевых клеток-хозяев получают из генов енолазы (ENO-1) *Saccharomyces cerevisiae*, 3-фосфоглицераткиназы *Saccharomyces cerevisiae*, альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и алкогольдегидрогеназы/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ADH2/GAP) *Saccharomyces cerevisiae*.

[0166] В некоторых вариантах осуществления, контрольная последовательность также является последовательностью полиаденилирования (т.е. последовательностью, функционально связанной с 3'-концом последовательности нуклеиновой кислоты и при транскрипции распознаваемой клеткой-хозяином в виде сигнала для добавления остатков полиаденозина к транскрибируемой мРНК). В настоящем изобретении можно использовать любую подходящую последовательность полиаденилирования, являющуюся функциональной в выбранной клетке-хозяине. Примеры последовательностей полиаденилирования для клеток-хозяев мицелиальных грибов, включают, в качестве неограничивающих примеров, гены ТАКА-амилазы *Aspergillus oryzae*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, антранилатсинтазы *Aspergillus nidulans*, трипсин-подобной протеазы *Fusarium oxysporum* и альфа-глюкозидазы *Aspergillus niger*. В этой области известны последовательности полиаденилирования для дрожжевых клеток, которые можно использовать (см., например, Guo and Sherman, Mol. Cell. Bio., 15:5983-5990 [1995]).

[0167] В некоторых вариантах осуществления контрольная последовательность также является сигнальным пептидом (т.е. кодирующей областью, кодирующей аминокислотную последовательность, соединенную с амино-концом полипептида и направляющую кодируемый полипептид в секреторный путь клетки). В некоторых вариантах осуществления 5'-конец кодирующей последовательности в последовательности нуклеиновой кислоты, по существу, содержит кодирующую область сигнального пептида, как правило, соединенную в трансляционной рамке считывания с сегментом кодирующей области, кодирующей секретируемый полипептид. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления 5'-конец кодирующей последовательности содержит кодирующую

область сигнального пептида, являющуюся чужеродной для кодирующей последовательности. Для экспрессии сконструированных полипептидов можно использовать любую подходящую кодирующую область сигнального пептида, направляющего экспрессируемый полипептид в секреторный путь выбранной клетки-хозяина. Эффективные кодирующие области сигнального пептида для бактериальных клеток-хозяев, являющиеся кодирующими областями сигнального пептида, включают, в качестве неограничивающих примеров, области, полученные из генов мальтогенной амилазы *Bacillus* NCIB 11837, альфа-амилазы *Bacillus stearothermophilus*, субтилизина *Bacillus licheniformis*, бета-лактамазы *Bacillus licheniformis*, нейтральных протеаз (nprT, nprS, nprM) *Bacillus stearothermophilus* и prsA *Bacillus subtilis*. В этой области известны дополнительные сигнальные пептиды (см., например, Simonen and Palva, Microbiol. Rev., 57:109-137 [1993]). В некоторых вариантах осуществления эффективные кодирующие области сигнального пептида для клеток-хозяев мицелиальных грибов включают, в качестве неограничивающих примеров, кодирующие области сигнального пептида, полученные из генов ТАКА-амилазы *Aspergillus oryzae*, нейтральной амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei*, целлюлазы *Humicola insolens* и липазы *Humicola lanuginosa*. Сигнальные пептиды для дрожжевых клеток, которые можно использовать, включают, в качестве неограничивающих примеров, сигнальные пептиды из генов альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и инвертазы *Saccharomyces cerevisiae*.

[0168] В некоторых вариантах осуществления контрольная последовательность также является кодирующей областью пропептида, кодирующей аминокислотную расположенную на аминоконце полипептида. Получаемый полипептид обозначают как "профермент", "прополипептид" или "зимоген". Прополипептид может преобразовываться в зрелый активный полипептид посредством каталитического или аутокаталитического отщепления пропептида от прополипептида. Кодирующую область пропептида можно получать из любого подходящего источника, включая, в качестве неограничивающих примеров, гены щелочной протеазы (aprE)

Bacillus subtilis, нейтральной протеазы (nprT) *Bacillus subtilis*, альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei* и лактазы *Myceliophthora thermophila* (см., например, WO95/33836). Если и сигнальный пептид, и область пропептида находятся на амино-конце полипептида, область пропептида находится рядом с амино-концом полипептида, а область сигнального пептида находится рядом с амино-концом области пропептида.

[0169] В некоторых вариантах осуществления также используют регуляторные последовательности. Эти последовательности облегчают регуляцию экспрессии полипептида относительно роста клетки-хозяина. Примерами регуляторных систем являются системы, заставляющие экспрессию гена "включаться" или "выключаться" в ответ на химический или физический стимул, включая наличие регуляторного соединения. В прокариотических клетках-хозяевах подходящие регуляторные последовательности включают, в качестве неограничивающих примеров, системы операторов *lac*, *tac* и *trp*. В дрожжевых клетках-хозяевах подходящие регуляторные системы включают, в качестве неограничивающих примеров, систему ADH2 или систему GAL1. В мицелиальных грибах подходящие регуляторные последовательности включают, в качестве неограничивающих примеров, промотор ТАКА альфа-амилазы, промотор глюкоамилазы *Aspergillus niger* и промотор глюкоамилазы *Aspergillus oryzae*.

[0170] В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному экспрессирующему вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид PAL, и одну или более областей регуляции экспрессии, таких как промотор и терминатор, точка начала репликации и т.д., в зависимости от типа организма-хозяина, в который их встраивают. В некоторых вариантах осуществления различные последовательности нуклеиновых кислот и контрольные последовательности, представленные в настоящем описании, соединяют для получения рекомбинантных экспрессирующих векторов, включающих один или более подходящих участков рестрикции, чтобы сделать возможной инсерцию или замену последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид PAL, в таких участках. Альтернативно, в некоторых вариантах

осуществления последовательность нуклеиновой кислоты по изобретению экспрессируют посредством встраивания последовательности нуклеиновой кислоты или конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, в соответствующий вектор для экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, включающих получение экспрессирующего вектора, кодирующая последовательность располагается в векторе таким образом, что кодирующая последовательность функционально связана с соответствующими контрольными последовательностями для экспрессии.

[0171] Рекомбинантный вектор экспрессии может являться любым подходящим вектором (например, плазмидой или вирусом), который легко можно подвергать способам рекомбинантной ДНК и достигать экспрессии полинуклеотидной последовательности РАL. Выбор вектора, как правило, зависит от совместимости вектора с клеткой-хозяином, в которую вектор будут встраивать. Векторы могут являться линейными или замкнутыми кольцевыми плазмидами.

[0172] В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии является автономно реплицирующимся вектором (т.е. вектором, существующим в виде экстрахромосомной единицы, репликация которой не зависит от репликации хромосом, такой как плазида, экстрахромосомный элемент, мини-хромосома или искусственная хромосома). Вектор может содержать любые средства для обеспечения саморепликации. В некоторых альтернативных вариантах осуществления вектор является вектором, который при встраивании в клетку-хозяина интегрируется в геном и реплицируется вместе с хромосомами, в которые он интегрирован. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления используют отдельный вектор или плазида, или два или более вектора или плазмиды, которые вместе содержат всю ДНК, подлежащую встраиванию в геном клетки-хозяина, и/или транспозон.

[0173] В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии содержит один или более селективных маркеров, делающих возможной легкую селекцию трансформированных клеток. "Селективный маркер" является геном, продукт которого обеспечивает резистентность к биоцидному средству или вирусу, резистентность к тяжелым

металлам, придает прототрофность ауксотрофам и т.п. Неограничивающие примеры бактериальных селективных маркеров включают гены *dal* *Bacillus subtilis* или *Bacillus licheniformis* или маркеры, придающие резистентность к антибиотикам, такую как резистентность к ампициллину, канамицину, хлорамфениколу или тетрациклину. Подходящие маркеры для дрожжевых клеток-хозяев включают, в качестве неограничивающих примеров, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 и URA3. Селективные маркеры для использования с клетками-хозяевами мицелиальных грибов включают, в качестве неограничивающих примеров, *amdS* (ацетамидазу; например, *A. nidulans* или *A. oryzae*), *argB* (орнитинкарбамоилтрансферазы), *bar* (фосфинотрицин-ацетилтрансферазу; например, *S. hygrosopicus*), *hph* (гигромицин-фосфотрансферазу), *niaD* (нитратредуктазу), *pyrG* (оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазу; например, *A. nidulans* или *A. oryzae*), *sC* (сульфатаденилтрансферазу) и *trpC* (антранилатсинтазу), а также их эквиваленты. В другом аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один сконструированный полипептид PAL по изобретению, при этом полинуклеотиды функционально связаны с одной или более контрольными последовательностями для экспрессии сконструированных ферментов PAL в клетке-хозяине. Клетки-хозяева, подходящие для использования в экспрессии полипептидов, кодируемых экспрессирующими векторами по изобретению, хорошо известны в этой области и включают, в качестве неограничивающих примеров, бактериальные клетки, такие как клетки *E. coli*, *Vibrio fluvialis*, *Streptomyces* и *Salmonella typhimurium*; клетки грибов, такие как дрожжевые клетки (например, *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris* (регистрационный номер ATCC 201178)); клетки насекомых, такие как клетки *Drosophila* S2 и *Spodoptera* Sf9; клетки животных, такие как CHO, COS, ВНК, 293 и клетки меланомы Боуэса; и клетки растений. Примеры клеток-хозяев также включают различные штаммы *Escherichia coli* (например, W3110 (Δ fhuA) и BL21).

[0174] Таким образом, в другом аспекте настоящее

изобретение относится к способам получения сконструированных полипептидов PAL, где способы включают культивирование клеток-хозяев, которые могут экспрессировать полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид PAL, в условиях, подходящих для экспрессии полипептида. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают стадии выделения и/или очистки полипептидов PAL, как представлено в настоящем описании.

[0175] В этой области известны подходящие среды для культивирования и условия роста клеток-хозяев. Предполагают, что в настоящем изобретении можно использовать любой подходящий способ встраивания полинуклеотидов для экспрессии полипептидов PAL в клетки. Подходящие способы включают, в качестве неограничивающих примеров, электропорацию, биолистическую бомбардировку частицами, опосредованную липосомами трансфекцию, трансфекцию с хлоридом кальция и слияние протопластов.

[0176] Сконструированные полипептиды PAL с описываемыми свойствами можно получать, подвергая полинуклеотид, кодирующий встречающийся в природе или сконструированный полипептид PAL, любым подходящим способам мутагенеза и/или направленной эволюции, известным в этой области и/или представленным в настоящем описании. Примером способа направленной эволюции является мутагенез и/или перестановка ДНК (см., например, Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751 [1994]; WO95/22625; WO97/0078; WO97/35966; WO98/27230; WO00/42651; WO01/75767 и патент США № 6537746). Другие способы направленной эволюции, которые можно использовать включают, помимо прочего, способ ступенчатой достройки (StEP), рекомбинацию *in vitro* (см., например, Zhao et al., Nat. Biotechnol., 16:258-261 [1998]), ПЦР-мутагенез (см., например, Caldwell et al., PCR Methods Appl., 3:S136-S140 [1994]) и кассетный мутагенез (см., например, Black et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:3525-3529 [1996]).

[0177] Способы мутагенеза и направленной эволюции легко можно использовать по отношению к полинуклеотидам, кодирующим PAL, для получения библиотеки вариантов, которые можно подвергать экспрессии, скринингу и анализу. В настоящем изобретении можно использовать любые подходящие способы мутагенеза и направленной

ЭВОЛЮЦИИ, и они известны в этой области (см. например, патенты США №№ 5605793, 5811238, 5830721, 5834252, 5837458, 5928905, 6096548, 6117679, 6132970, 6165793, 6180406, 6251674, 6265201, 6277638, 6287861, 6287862, 291242, 6297053, 6303344, 6309883, 6319713, 6319714, 6323030, 6326204, 6335160, 6335198, 6344356, 6352859, 6355484, 6358740, 6358742, 6365377, 6365408, 6368861, 6372497, 6337186, 6376246, 6379964, 6387702, 6391552, 6391640, 6395547, 6406855, 6406910, 6413745, 6413774, 6420175, 6423542, 6426224, 6436675, 6444468, 6455253, 6479652, 6482647, 6483011, 6484105, 6489146, 6500617, 6500639, 6506602, 6506603, 6518065, 6519065, 6521453, 6528311, 6537746, 6573098, 6576467, 6579678, 6586182, 6602986, 6605430, 6613514, 6653072, 6686515, 6703240, 6716631, 6825001, 6902922, 6917882, 6946296, 6961664, 6995017, 7024312, 7058515, 7105297, 7148054, 7220566, 7288375, 7384387, 7421347, 7430477, 7462469, 7534564, 7620500, 7620502, 7629170, 7702464, 7747391, 7747393, 7751986, 7776598, 7783428, 7795030, 7853410, 7868138, 7783428, 7873477, 7873499, 7904249, 7957912, 7981614, 8014961, 8029988, 8048674, 8058001, 8076138, 8108150, 8170806, 8224580, 8377681, 8383346, 8457903, 8504498, 8589085, 8762066, 8768871, 9593326 и связанные с ними патенты США и не-США; Ling et al., *Anal. Biochem.*, 254(2):157-78 [1997]; Dale et al., *Meth. Mol. Biol.*, 57:369-74 [1996]; Smith, *Ann. Rev. Genet.*, 19:423-462 [1985]; Botstein et al., *Science*, 229:1193-1201 [1985]; Carter, *Biochem. J.*, 237:1-7 [1986]; Kramer et al., *Cell*, 38:879-887 [1984]; Wells et al., *Gene*, 34:315-323 [1985]; Minshull et al., *Curr. Op. Chem. Biol.*, 3:284-290 [1999]; Christians et al., *Nat. Biotechnol.*, 17:259-264 [1999]; Crameri et al., *Nature*, 391:288-291 [1998]; Crameri et al., *Nat. Biotechnol.*, 15:436-438 [1997]; Zhang et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:4504-4509 [1997]; Crameri et al., *Nat. Biotechnol.*, 14:315-319 [1996]; Stemmer, *Nature*, 370:389-391 [1994]; Stemmer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91:10747-10751 [1994]; WO95/22625; WO97/0078; WO97/35966; WO98/27230; WO00/42651; WO01/75767; WO2009/152336; и публикации патентных заявок США №№ 2011/0082055, 2014/0005057, 2014/0214391, 2014/0221216, 2015/0133307, 2015/0134315 и 2015/0050658; все из которых

включены в настоящее описание в качестве ссылки).

[0178] В некоторых вариантах осуществления клоны фермента, полученные после мутагенеза, подвергают скринингу, подвергая препараты ферментов воздействию определенных температур (или других условий анализа) и измеряя степень ферментативной активности, оставшейся после тепловой обработки или соответствующих условий анализа. Затем клоны, содержащие полинуклеотид, кодирующий полипептид PAL, выделяют из гена, секвенируют для идентификации изменений нуклеотидной последовательности (если они есть) и используют для экспрессии фермента в клетке-хозяине. Измерение ферментативной активности в экспрессионной библиотеке можно осуществлять любым подходящим способом, известным в этой области (например, стандартными биохимическими способами, такими как анализ ВЭЖХ).

[0179] В случае сконструированных полипептидов с известной последовательностью, полинуклеотиды, кодирующие фермент, можно получать стандартными твердофазными способами в соответствии с известными способами синтеза. В некоторых вариантах осуществления фрагменты размером до приблизительно 100 оснований можно синтезировать индивидуально, а затем соединять (например, способами ферментативного или химического лигирования или полимераз-опосредованными способами) для получения любой желаемой непрерывной последовательности. Например, полинуклеотиды и олигонуклеотиды, представленные в настоящем описании, можно получать посредством химического синтеза с использованием классического фосфорамидитного способа (см., например, Beaucage et al., Tet. Lett., 22:1859-69 [1981]; и Matthes et al., EMBOJ., 3:801-05 [1984]), как правило, осуществляемого на практике в автоматизированных способах синтеза. В фосфорамидитном способе олигонуклеотиды синтезируют (например, с помощью автоматизированного ДНК-синтезатора), очищают, отжигают, лигируют и клонируют в соответствующие векторы.

[0180] Таким образом, в некоторых вариантах осуществления способ получения сконструированного полипептида PAL может включать: (а) синтез полинуклеотида, кодирующего полипептид,

содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотной последовательности любых вариантов, представленных в настоящем описании, и (b) экспрессию полипептида PAL, кодируемого полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления способа аминокислотная последовательность, кодируемая полинуклеотидом, необязательно, может содержать одну или более (например, до 3, 4, 5 или до 10) делеций, инсерций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность, необязательно, содержит 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-15, 1-20, 1-21, 1-22, 1-23, 1-24, 1-25, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45 или 1-50 делеций, инсерций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность, необязательно, содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 30, 35, 40, 45 или 50 делеций, инсерций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность, необязательно, содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 делеций, инсерций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления замены являются консервативными или неконсервативными заменами.

[0181] Экспрессируемый сконструированный полипептид PAL можно анализировать на любое желаемое улучшенное свойство или комбинацию свойств (например, активность, селективность, стабильность, кислотоустойчивость, чувствительность к протеазам и т.д.) с использованием любого подходящего анализа, известного в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, анализы и условия, представленные в настоящем описании.

[0182] В некоторых вариантах осуществления любые из сконструированных полипептидов PAL, экспрессируемых в клетках-хозяевах, выделяют из клеток и/или среды для культивирования любым одним или более из хорошо известных способов очистки белка, включая, помимо прочего, обработку лизоцимом, обработку ультразвуком, фильтрацию, высаливание, ультрацентрифугирование и хроматографию.

[0183] Хроматографические способы выделения полипептидов PAL включают, помимо прочего, обращенно-фазовую хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, хроматографию гидрофобных взаимодействий, эксклюзионную хроматографию, электрофорез в геле и аффинную хроматографию. Условия очистки конкретного фермента частично зависят от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность, гидрофильность, молекулярная масса, форма молекулы и т.д., они будут очевидны специалисту в этой области. В некоторых вариантах осуществления для выделения улучшенных ферментов PAL можно использовать аффинные способы. Для очистки посредством аффинной хроматографии можно использовать любое антитело, специфически связывающееся с интересующим полипептидом PAL. Для получения антител различных животных-реципиентов, включая, в качестве неограничивающих примеров, кроликов, мышей, крыс и т.д., иммунизируют посредством инъекции полипептида PAL или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления полипептид PAL или его фрагмент присоединяют к подходящему носителю, такому как BSA, с помощью функциональных групп боковых цепей или линкеров, присоединенных к функциональным группам боковых цепей.

[0184] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид PAL получают в клетке-хозяине способом, включающим культивирование клетки-хозяина (например, штамма *E. coli*), содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую сконструированный полипептид PAL, как представлено в настоящем описании, в условиях, способствующих продукции сконструированного полипептида PAL и выделению сконструированного полипептида PAL из клеток и/или среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин продуцирует несколько сконструированных полипептидов PAL.

[0185] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу получения сконструированного полипептида PAL, включающему культивирование рекомбинантных бактериальных клеток, содержащих полинуклеотидную последовательность, кодирующую сконструированный полипептид PAL, имеющий по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности

относительно референсной последовательности SEQ ID NO:4, 6, 8, 10, и/или 12 и одно или более отличий аминокислотных остатков по сравнению с SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12, как представлено в настоящем описании, в подходящих условиях культивирования, чтобы сделать возможным продукцию сконструированного полипептида PAL и, необязательно, выделение сконструированного полипептида PAL из культуры и/или культивируемых бактериальных клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин продуцирует несколько сконструированных полипептидов PAL.

[0186] В некоторых вариантах осуществления после выделения сконструированных полипептидов PAL из рекомбинантных клеток-хозяев и/или культуральной среды их дополнительно очищают любым подходящим способом, известным в этой области. В некоторых дополнительных вариантах осуществления очищенные полипептиды PAL комбинируют с другими ингредиентами и соединениями для получения композиций и составов, содержащих сконструированный полипептид PAL, подходящий для различного применения (например, фармацевтических композиций).

Композиции:

[0187] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам PAL, подходящим для применения в многочисленных композициях. Эти композиции можно использовать во множестве областей, включая, в качестве неограничивающих примеров, фармацевтику, пищевые добавки, пищу, корма и тонкое химическое производство. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к пище и/или кормам, содержащим по меньшей мере один сконструированный вариант PAL и/или по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один вариант PAL. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к напиткам, содержащим по меньшей мере один сконструированный вариант PAL.

[0188] В некоторых вариантах осуществления сконструированный вариант PAL в пище, кормах и/или пищевой добавке является гликозилированным. Кроме того, сконструированные варианты PAL можно использовать в любой подходящей съедобной матрице для доставки фермента. В некоторых вариантах осуществления

сконструированные варианты P_{AL} находятся в съедобной матрице для доставки фермента, предназначенной для быстрого диспергирования варианта P_{AL} в пищеварительном тракте животного после потребления варианта.

[0189] Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам P_{AL}, подходящим для применения в получении тонких химических соединений и других промышленно важных соединений (см., например, патентные заявки США № 2013/0340119, 2013/0005012 и 2005/0260724 и WO2012/122333).

Фармацевтические и другие композиции:

[0190] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам P_{AL}, подходящим для применения в фармацевтических и других композициях, таких как пищевые добавки.

[0191] В зависимости от способа введения, эти композиции, содержащие терапевтически эффективное количество сконструированной P_{AL} по изобретению, находятся в твердой, полутвердой или жидкой форме. В некоторых вариантах осуществления композиции включают другие фармацевтически приемлемые компоненты, такие как дилуенты, буферы, эксципиенты, соли, эмульгаторы, консерванты, стабилизаторы, наполнители и другие ингредиенты. Подробности способов составления и введения хорошо известны в этой области и описаны в литературе.

[0192] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды P_{AL} составляют для использования в пероральных фармацевтических композициях. В настоящем изобретении можно использовать любой подходящий формат доставки сконструированных полипептидов P_{AL}, включая, в качестве неограничивающих примеров, пилюли, таблетки, гелевые таблетки, капсулы, пастилки, драже, порошки, мягкие желатиновые капсулы, золь-гелевые средства, гели, эмульсии, имплантаты, пластыри, спреи, мази, линименты, кремы, пасты, желе, красители, аэрозоли, жевательные резинки, смягчительные средства, стики, суспензии (включая, в качестве неограничивающих примеров суспензии на основе масел, эмульсии "масло-в-воде" и т.д.), сиропы, составы с контролируемым высвобождением, суппозитории и т.д. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды P_{AL} предоставляют в

формате, подходящем для инъекций (т.е. в инъекируемом составе). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL предоставляют в биосовместимых матрицах, таких как золь-гелевые средства, включая золь-гелевые средства на основе диоксида кремния (например, оксисилан). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL инкапсулируют. В некоторых альтернативных вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL инкапсулируют в наноструктурах (например, нанотрубки, нанотрубочки, нанокапсулы или микрокапсулы, микросферы, липосомы и т.д.). Фактически, это не означает, что настоящее изобретение ограничено каким-либо конкретным составом для доставки и/или средствами для доставки. Следует понимать, что сконструированные полипептиды PAL будут вводить любыми подходящими способами, известными в этой области, включая, в качестве неограничивающих примеров, парентеральное, пероральное, местное, трансдермальное, интраназальное, внутриглазное, интратекальное введение, введение с помощью имплантатов и т.д.

[0193] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL химически модифицируют посредством гликозилирования, пегилирования (т.е. модифицируют с использованием полиэтиленгликоля [PEG] или активированного PEG и т.д.) или с помощью других соединений (см., например, Ikeda, Amino Acids 29:283-287 [2005]; патенты США №№ 7531341, 7534595, 7560263 и 753653; патентные заявки США №№ 2013/0039898, 2012/0177722 и т.д.). Фактически, это не означает, что настоящее изобретение ограничено каким-либо конкретным способом и/или механизмом доставки.

[0194] В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL предоставляют в составах, содержащих стабилизированные кристаллы ферментов. В некоторых вариантах осуществления состав содержит перекрестно-сшитый кристаллический сконструированный фермент PAL и полимер с реакционноспособным веществом, прикрепляющимся к кристаллам фермента. Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам PAL в полимерах.

[0195] В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие сконструированные полипептиды P_{AL} по изобретению, включают одно или более общеупотребительных соединений-носителей, включая, в качестве неограничивающих примеров, сахара (например, лактозу, сахарозу, маннит и/или сорбит), крахмалы (например, кукурузный, пшеничный, рисовый, картофельный или другой растительный крахмал), целлюлозу (например, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, натрий-карбоксиметилцеллюлозу), камеди (например, гуммиарабик, трагакантовую камедь, гуаровую камедь и т.д.) и/или белки (например, желатин, коллаген и т.д.). Дополнительные компоненты в пероральных составах могут включать красители или подсластители (например, глюкозу, сахарозу и маннит) и смазки (например, стеарат магния), а также растворяющиеся в кишечнике покрытия (например, полимеры метакрилата, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы и/или любое другое подходящее растворяющееся в кишечнике покрытие, известное в этой области). В некоторых вариантах осуществления составы включают разрыхлители или солюбилизаторы (например, перекрестно-сшитый поливинилпирролидон, агар, альгиновую кислоту или ее соли, такие как альгинат натрия). В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид P_{AL} комбинируют с различными дополнительными компонентами, включая, в качестве неограничивающих примеров, консерванты, суспендирующие средства, загустители, увлажняющие средства, спирты, жирные кислоты и/или эмульгаторы, особенно, в жидких составах.

[0196] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид P_{AL} комбинируют с различными дополнительными компонентами, включая, в качестве неограничивающих примеров, консерванты, суспендирующие средства, загустители, увлажняющие средства, спирты, жирные кислоты и/или эмульгаторы, особенно, в жидких составах. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды P_{AL} вводят индивидуумам в комбинации с другими соединениями, используемыми в лечении PKU, включая, в качестве неограничивающих примеров, тетрагидробиоптерин KUVAN® (BioMarin Pharmaceuticals, Inc.,

Novato, CA), антациды (например, омепразол, эзомепразол и другие празолы), а также любые другие подходящие соединения.

[0197] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к сконструированным полипептидам PAL, подходящим для использования в снижении концентрации фенилаланина в жидкостях, таких как кровь, спинномозговая жидкость и т.д. Доза сконструированных полипептидов PAL, вводимых пациенту с повышенными уровнями фенилаланина в крови, зависит от генотипа пациента, общего состояния пациента и других факторов, известных в этой области. В некоторых вариантах осуществления пациенты с PKU с повышенными уровнями фенилаланина в крови имеют концентрации фенилаланина в крови более 360 мкМ. Однако не следует понимать, что настоящее изобретение ограничено введением пациентам с концентрациями фенилаланина в крови, составляющими более 360 мкМ, т.к. настоящее изобретение можно использовать в отношении пациентов с более низкими концентрациями фенилаланина в крови. В некоторых вариантах осуществления композиции предназначены для однократного или повторного введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления предусмотрено, что концентрация сконструированных полипептидов PAL в композициях, вводимых пациенту, является достаточной для эффективного лечения, улучшения и/или профилактики симптомов заболевания (например, PKU и/или связанных с PKU состояний, заболеваний и/или симптомов). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL вводят в комбинации с другими фармацевтическими и/или пищевыми композициями.

[0198] В некоторых вариантах осуществления ферменты PAL можно использовать в качестве терапевтического белка для лечения нарушений метаболизма тирозина, таких как тирозинемия типа I, тирозинемия типа II, тирозинемия типа III и алкаптонурия. Эти нарушения метаболизма тирозина являются аутосомными метаболическими генетическими нарушениями, при которых один из ферментов, участвующих в деградации тирозина, является частично функциональным или нефункциональным по причине мутации в соответствующем гене. Это отсутствие функционирования приводит к повышению уровней тирозина и других метаболитов тирозина в

кровенотоке. Т.к. тирозин образуется из фенилаланина, пациентам с нарушением метаболизма тирозина полезно ограничивать потребление фенилаланина и тирозина. Таким образом, ферменты PAL представляют собой потенциальное лечение нарушений метаболизма тирозина.

[0199] Если пациентов с нарушением метаболизма тирозина не подвергают лечению на ранней стадии, высокие уровни тирозина и некоторых из его продуктов распада могут вызывать значительные медицинские нарушения, включая печеночную и почечную недостаточность, рак печени, умственную отсталость и даже смерть.

[0200] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к сконструированным полипептидам PAL, подходящим для использования в снижении концентрации фенилаланина в жидкостях, таких как кровь, спинномозговая жидкость и т.д., у пациентов с тирозинемией и алкаптонурией. Доза сконструированных полипептидов PAL, вводимых пациенту с повышенными уровнями тирозина в крови, зависит от генотипа пациента, общего состояния пациента и других факторов, известных в этой области. В некоторых вариантах осуществления композиции предназначены для однократного или повторного введения пациенту с тирозинемией или алкаптонурией. В некоторых вариантах осуществления предусмотрено, что концентрация сконструированных полипептидов PAL в композициях, вводимых пациенту, является достаточной для эффективного лечения, улучшения и/или профилактики симптомов заболевания (например, тирозинемии типа I, типа II или типа III или алкаптонурии и/или их симптомов). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL вводят пациентам с тирозинемией и алкаптонурией в комбинации с нитизиноном или другими фармацевтическими и/или пищевыми композициями.

Промышленные композиции:

[0201] Предполагают, что сконструированные полипептиды PAL по изобретению можно использовать в промышленных композициях. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL составляют для использования в пищевой и/или кормовой промышленности. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL составляют в гранулированных

или пеллетированных продуктах, смешиваемых с компонентами кормов для животных, таких как дополнительные ферменты (например, целлюлазы, лакказы и амилазы). В некоторых альтернативных вариантах осуществления сконструированные полипептиды PAL используют в жидких композициях кормов для животных (например, водных или масляных суспензиях). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сконструированные варианты PAL по изобретению являются в достаточной степени теплоустойчивыми и термостабильными, чтобы переносить обработку, используемую для получения гранул и другой переработанной пищи/кормов.

[0202] Сконструированные варианты PAL по изобретению также можно использовать в получении фенилаланина и/или производных фенилаланина.

[0203] Изложенные выше и другие аспекты изобретения могут быть более понятны из следующих неограничивающих примеров. Примеры представлены исключительно в иллюстративных целях, и не предназначены для какого-либо ограничения объема изобретения.

ПРИМЕРЫ

[0204] Следующие примеры, включающие описание экспериментов и полученных результатов, представлены исключительно в иллюстративных целях, и не следует истолковывать их как ограничение настоящего изобретения.

[0205] В представленном ниже описании экспериментов используют следующие сокращения: м.д. (части на миллион); М (моль); мм (миллимоль), мкМ (микромоль); нМ (наномоль); г (грамм); мг (миллиграмм); мкг (микрограмм); л (литр); мл (миллилитр); см (сантиметры); мм (миллиметры); мкм (микрометры); сек (секунды); мин (минуты); ч. (часы); ед. (единицы); MW (молекулярная масса); об./мин (обороты в минуту); фунт/дюйм² (фунты на квадратный дюйм); °C (градусы Цельсия); RT и rt (комнатная температура); CDS (кодирующая последовательность); ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота); РНК (рибонуклеиновая кислота); AUC (площадь под кривой); W3110E. *coli* (общепотребительный лабораторный штамм *E. coli*, доступный в Coli Genetic Stock Center [CGSC], New Haven, CT); НТР

(высокопроизводительный); ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография); CFSE (сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина); IPTG (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид); PES (полиэфирсульфон); PHE и phe (фенилаланин); BSA (бычий сывороточный альбумин); PBMC (моноклеарные клетки периферической крови); PKU (фенилкетонурия); MHC (главный комплекс гистосовместимости); HLA (лейкоцитарный антиген человека); HLA-DR (рецептор поверхности клеток MHC класса II, кодируемый комплексом HLA на хромосоме 6); FIOPC (кратное улучшение относительно положительного контроля); LB (бульон Лuria); Athens Research (Athens Research Technology, Athens, GA); ProSpec (ProSpec Tany Technogene, East Brunswick, NJ); Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); Ram Scientific (Ram Scientific, Inc., Yonkers, NY); Pall Corp. (Pall, Corp., Pt. Washington, NY); Millipore (Millipore, Corp., Billerica MA); Difco (Difco Laboratories, BD Diagnostic Systems, Detroit, MI); Molecular Devices (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA); Kuhner (Adolf Kuhner, AG, Basel, Switzerland); Biospringer (Biospringer North America, Milwaukee, WI); Cambridge Isotope Laboratories, (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Tewksbury, MA); Applied Biosystems (Applied Biosystems, часть Life Technologies, Corp., Grand Island, NY), Agilent (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA); Thermo Scientific (часть Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA); Corning (Corning, Inc., Palo Alto, CA); Constant Systems (Constant Systems Ltd., Daventry, United Kingdom); Megazyme (Megazyme International, Wicklow, Ireland); Enzo (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY); GE Healthcare (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ); Harlan (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN); ABSciex (ABSciex, Framingham, MA); PetAg Inc. (PetAg, Hampshire, IL) и Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

[0206] В настоящем изобретении использовали следующие полинуклеотидные и полипептидные последовательности. В некоторых случаях (как показано ниже) после полинуклеотидной последовательности представлен кодируемый полипептид.

Полинуклеотидная последовательность AvPAL WT (SEQ IDNO: 1):

ATGAAAACCCTGAGCCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCTTTACCGGC
 AATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGCACGTGTTGC
 CCGTAATGGCACCCCTGGTTAGCCTGACCAATAATACCGATATTCTGCAGGGTATTTCAGGCCAGCT
 GTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAGCGGTGAACCGATTTATGGTGTACCAGCGGTTTTGGT
 GGTATGGCAAATGTTGCAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACTGCAGACCAATCTGGTTTGGTT
 TCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAGATGTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGTG
 CAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGTATTTCGTCTGGAAGTGAATTAACGCATGGAAATCTTT
 CTGAATGCCGGTGTTACCCCGTATGTTTATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGT
 TCCGCTGAGCTATATTACCGGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAATG
 GCAAAGAAATGGACGCACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGCTGCCG
 AAAGAAGGTCTGGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTGTGTTTA
 TGATACCCAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATTCAGGCACTGAATG
 GTACAAATCAGAGCTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTCAGCTGTGGGCA
 GCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCAATAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGGATGGTAAACA
 TGATTATCGTGATCATGAACTGATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCTGCCGCAGTATCTGG
 GTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAATTGAGATTAACAGCGTTACC
 GATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCATGGTGGTAATTTTCTGGGTGAGTA
 TGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATCGGTCTGCTGGCAAACATCTGGATGTTT
 AGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAGCAATGGTCTGCCTCCGAGTCTGCTGGGTAATCGT
 GAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAAAGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCT
 GACCTTTTATGGTAATAGTATTGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAACCAGAATA
 TTAACAGCCAGGGTTATACCAGCGCAACCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTTTTTCAAGATTAT
 GTTGCCATTGCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCA
 TTATGATGCACGTGCCTGTCTGTCACCGGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTTCGTCATGTTG
 TTGGTCAGAAACCGACCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGGATGAA
 CATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTTTCAGGCCGTTTCAGGACAT
 TCTGCCGTGTCTGCAT (SEQ ID NO:1)

Полипептидная последовательность AvPAL WT (SEQ IDNO: 2):

MKTLSPAQSKTSSQQFSFTGNSSANVIIGNQKLTINDVARVARNGTLVSLTNNTDILQGI
 QASCDYINNAVESGEPIYGVTSFGFGMANVAISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAM
 LLRANSHMRGASGIRLELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKV
 DFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLLPKEGLAMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQ
 ALNGTNQSFHPFIHNSKPHPGQLWAADQMISLLANSQLVRDELDGKHDIRDHELIQDRYSLRCLP
 QYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYIIGLLAKH
 LDVQIALLASPEFSNGLPPSLGNRERKVMMLKGLQICGNSIMPLLTIFYGNSIADRFPTHAEQF

NQNINSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLRTYKKTGHYDARACLS PATERLYSAV
 RHVVGQKPTSDRPYIWNDNEQGLDEHIARISADIAAGGVIVQAVQDILPCLH (SEQ ID
 NO: 2)

**Полинуклеотидная последовательность варианта #1 (SEQ ID
 NO: 3)**

ATGAAAACCCTGAGTCAGGCACAGAGCAAAACCAGCAGCCAGCAGTTTAGCCATACCGGC
 AATAGCAGCGCAAATGTGATTATTGGTAATCAGAACTGACCATCAATGATGTTGTACGTGTTGC
 CCGTAATGGCACC GCGGTTAGCCTGACCAATAATAAAGATATTCTGCAGCGTATTCAGGCCAGCT
 GTGATTATATCAATAATGCAGTTGAAAAAGGTGAACCGATTTATGGTGT TACCAGCGGTTTTGGT
 GGTATGGCAAATGTTGTAATTAGCCGTGAACAGGCAAGCGAACTGCAGACCAATCTGGTTTTGGTT
 TCTGAAAACCGGTGCAGGTAATAAACTGCCGCTGGCAGATGTTTCGTGCAGCAATGCTGCTGCGTG
 CAAATAGCCACATGCGTGGTGCAAGCGGTATTCGTCTGGAAGTGAATTAACGCATGGAAATCTTT
 CTGAATGCCGGTGTTACCCCGTATGTTTATGAATTTGGTAGCATTGGTGCCAGCGGTGATCTGGT
 TCCGCTGAGCTATATTACCGGTAGCCTGATTGGCCTGGACCCGAGCTTTAAAGTTGATTTTAATG
 GCAAAGAAATGGACGCACCGACCGCACTGCGTCAGCTGAATCTGAGTCCGCTGACCCTGCAGCCG
 AAAGAAGGTCTGGCAATGATGAATGGCACCAGCGTTATGACCGGTATTGCAGCAAATTTGTGTTTA
 TGATACCCGAGATTCTGACCGCAATTGCAATGGGTGTTTCATGCACTGGATATT CAGGCACTGAATG
 GTACAAATCAGAGCTTTTCATCCGTTTATCCATAACAGCAAACCGCATCCGGGTCAGCTGTGGGCA
 GCAGATCAGATGATTAGCCTGCTGGCCGGTAGCCAGCTGGTTCGTGATGAACTGGATGGTAAACA
 TGATTATATGGATGGTGAAGTATCCAGGATCGTTATAGCCTGCGTTGTCTGCCGCAGTATCTGG
 GTCCGATTGTTGATGGTATTAGCCAGATTGCCAAACAAATCGAAATTGAGATTAACAGCGTTACC
 GATAACCCGCTGATTGATGTTGATAATCAGGCAAGCTATCATGGTGGTAATTTTCTGGGTCAGTA
 TGTTGGTATGGGTATGGATCATCTGCGCTATTATATCGGTCTGCTGGCAAACATCTGGATGTTTC
 AGATTGCACTGCTGGCATCACCGGAATTTAGCAATGGTCTGCCTCCGAGTCTGGTGGGTAATCGT
 GAACGTAAAGTTAATATGGGTCTGAAAGGTCTGCAGATTTGCGGTAATAGCATTATGCCGCTGCT
 GACCTTTTATGGTAATAGTATTGCAGATCGTTTTCCGACCCATGCCGAACAGTTTAACCAGAATA
 TTAACAGCCAGGGTTATACCAGCGCAACCCTGGCACGTCGTAGCGTTGATATTTTTCAGAATTAT
 GTTGCCATTGCCCTGATGTTTGGTGTTCAGGCAGTTGATCTGCGTACCTACAAAAAACCGGTCA
 TTATGATGCACGTGCCCGAGCTGTCACCGGCAACCGAACGTCTGTATAGCGCAGTTCGT CATGTTG
 TTGGTAAAAAACCGAGCTCAGATCGTCCGTATATTTGGAATGATAATGAACAGGGTCTGGATGAA
 CATATTGCACGTATTAGTGCAGATATTGCAGCCGGTGGTGTATTGTT CAGGCCGTT CAGGACAT
 TCTGCCGCCGCTGCAT (SEQ ID NO: 3)

Полипептидная последовательность варианта #1 (SEQ ID NO: 4)

MKTLSQLQSKTSSQQFSHTGNSSANVIIGNQKLTINDVVRVARNGTAVSLTNNKDILQRI
 QASCDYINNAVEKGEPIYGVTSFGFGMANVVISREQASELQTNLVWFLKTGAGNKLPLADVRAAM
 LLRANSHMRGASGIRLELIKRMEIFLNAGVTPYVYEFSGSIGASGDLVPLSYITGSLIGLDPSFKV

DFNGKEMDAPTALRQLNLSPLTLQPKEGLAMMNGTSVMTGIAANCVYDTQILTAIAMGVHALDIQ
 ALNGTNQSFHPPFIHNSKPHPGQLWAADQMISLLAGSQLVRDELDGKHDYMDGELIQDRYSLRCLP
 QYLGPIVDGISQIAKQIEIEINSVTDNPLIDVDNQASYHGGNFLGQYVGMGMDHLRYIIGLLAKH
 LDVQIALLASPEFSNGLPPSLVGNRERKVMGLKGLQICGNSIMPLLTFFYGNSIADRFPTHAEQF
 NQNINSQGYTSATLARRSVDIFQNYVAIALMFGVQAVDLRITYKKTGHYDARAQLSPATERLYSAV
 RHVVGKPKSSDRPYIWNNDNEQGLDE HIARISADIAAGGVIVQAVQDILPPLH (SEQ ID
 NO:4)

ПРИМЕР 1

Получение гена PAL и конструирование экспрессирующих векторов

[0207] Конструировали последовательность гена фенилаланин-аммиаклиазы (AvPAL) *Anabaena variabilis* с кодонами для оптимизированной экспрессии в *E. coli*, клонировали в вектор экспрессии *E. coli* pET16b для получения pET16b-AvPAL и субклонировали, как описано в примере 1 патента США № 9611468. Штамм *E. coli*, полученный из W3110, трансформировали с использованием плазмидной конструкции. Для получения библиотек вариантов генов из этой плазмидной конструкции, а также производных AvPAL, использовали способы направленной эволюции, как правило, известные специалистам в этой области (см., например, патент США № 8383346, и WO2010/144103). В некоторых вариантах осуществления использовали экспрессирующие векторы, в которых отсутствуют маркеры резистентности к антибиотикам.

ПРИМЕР 2

Высокопроизводительное (НТР) выращивание и анализы

Высокопроизводительное (НТР) выращивание PAL и вариантов PAL

[0208] Трансформированные клетки *E. coli* подвергали селекции, высевая их на чашки с агаром LB, содержащим 1% глюкозы и 30 мкг/мл хлорамфеникола. После инкубации в течение ночи при 37°C колонии помещали в лунки 96-луночных неглубоких плоскодонных планшетов (NUNC™, Thermo-Scientific), наполненные 180 мкл/лунку LB, дополненного 1% глюкозой и 30 мкг/мл хлорамфеникола. Культурам позволяли расти в течение ночи в течение 18-20 часов на шейкере (200 об./мин, 30°C и относительной влажности 85%;

Kuhner). Выращенные в течение ночи образцы (20 мкл) переносили в 96-луночные глубокие планшеты Costar, наполненные 380 мкл среды Terrific Broth, дополненной 30 мкг/мл хлорамфеникола. Планшеты инкубировали в течение 135 минут на шейкере (250 об./мин, 30°C и относительная влажность 85%; Kuhner). Затем клетки индуцировали 40 мкл 10 мМ IPTG в стерильной воде и инкубировали в течение ночи в течение 20-24 часов на шейкере (250 об./мин, 30°C и относительная влажность 85%; Kuhner). Клетки осаждали (4000 об./мин в течение 20 мин), выбрасывали супернатант и замораживали клетки при -80°C перед анализом.

Лизис осадков НТР

[0209] Сначала к клеточным осадкам добавляли 500 мкл лизирующего буфера (20 мМ фосфата натрия, рН 8, 150 мМ NaCl, 1 мг/мл лизоцима и 0,5 мг/мл сульфата полимиксина В). Смесь перемешивали в течение 1,5-2 ч. при комнатной температуре и центрифугировали (4000 об./мин в течение 5 мин) перед использованием очищенного лизата в различных анализах НТР, представленных в настоящем описании. Анализ этих лизатов посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS показал наличие гиперэкспрессированного белка с кажущейся MW ~60 кДа, что соответствует ожидаемой MW PAL.

Анализ очищенных лизатов

[0210] Активность вариантов PAL определяли посредством измерения образования коричной кислоты по изменению поглощения при 290 нм с течением времени. Для этого анализа в лунки полиакрилатного 96-луночного планшета для микротитрования (Costar #3635, Corning) добавляли 100 мкл 200 мМ Трис/50 мМ фенилаланина, рН 7,5, или 200 мМ фосфата натрия/50 мМ фенилаланина, рН 7,0, 80 мкл воды и 20 мкл очищенного лизата. Реакционные смеси быстро перемешивали и определяли активность, измеряя поглощение при 290 нм с течением времени (каждые 12-20 сек. в течение 5-20 мин) с использованием спектрофотометров для микропланшетов SpectraMax® Plus 384 или SpectraMax® 190 (MolecularDevices).

НТР-анализ очищенных лизатов, предварительно обработанных

протеазой

[0211] Активность вариантов PAL определяли после инкубации с химотрипсином и трипсином для симуляции среды кишечника (например, верхних отделов кишечника). Сначала 30 мкл смеси протеаз (0,01-100 мг/мл химотрипсина (C4129, Sigma Aldrich), 0,01-100 мг/мл трипсина (T7409, SigmaAldrich), 1 мМ CaCl₂ и 1 мМ HCl), 0-30 мкл 20 мМ таурохолата натрия в 500 мМ фосфата натрия, pH 7,0, и 90-120 мкл очищенного лизата добавляли в лунки 96-луночного круглодонного планшета для микротитрования (Costar #3798, Corning). Планшеты закрывали и инкубировали при 37°C со встряхиванием (шейкер Thermotron® HT, Infors AJ185, 400 об./мин, амплитуда 1 дюйм (2,54 см)) в течение 1 часа до анализа. Для анализа 100 мкл 200 мМ Трис/50 мМ фенилаланина, pH 7,5, или 200 мМ фосфата натрия/50 мМ фенилаланина, pH 7,0, и 100 мкл обработанного протеазой лизата добавляли в лунки полиакрилатного 96-луночного планшета для микротитрования (Costar #3635, Corning). Реакционные смеси быстро перемешивали и определяли активность, измеряя поглощение при 290 нм с течением времени (каждые 12-20 сек. в течение 5-20 мин) с использованием спектрофотометров для микропланшетов SpectraMax® Plus 384 или SpectraMax® 190 (MolecularDevices). Результаты приведены в таблицах ниже.

НТР-анализ вариантов PAL после хранения при повышенных температурах

[0212] Лизаты вариантов PAL, выращенных с высокой производительностью, инкубировали при 65°C в течение 1 ч. и осаждали нерастворимый материал (4000 об./мин в течение 10 мин). Супернатант переносили в новый 96-луночный планшет для микротитрования (NUNC™, Thermo-Scientific), замораживали и лиофилизировали до сухого порошка. Лيوфилизированные ферменты инкубировали при 45°C на шейкере Thermotron® HT (Infors AJ185) в течение до 10 дней. Затем лиофилизированные ферменты ресуспендировали в 400 мкл ddH₂O и смешивали посредством встряхивания в течение 10 мин. Для анализа 100 мкл 200 мМ фосфата натрия/50 мМ фенилаланина, pH 7,0, 80 мкл ddH₂O и 20 мкл

суспензии фермента добавляли в лунки полиакрилатного 96-луночного планшета для микротитрования (Costar #3635, Corning). Реакционные смеси быстро перемешивали и определяли активность, измеряя поглощение при 290 нм с течением времени (каждые 12-20 сек. в течение 5-20 мин) с использованием спектрофотометров для микропланшетов SpectraMax® Plus 384 или SpectraMax® 190 (MolecularDevices).

ПРИМЕР 3

Лиофилизированные лизаты из культур во встряхиваемых колбах (SF)

[0213] Выбранные культуры НТР, выращенные, как описано в примере 2 выше, высевали на чашки с LB-агаром с 1% глюкозой и 30 мкг/мл хлорамфеникола и выращивали в течение ночи при 37°C. Одну колонию из каждой культуры переносили в 50 мл среды Луриа-Бертани с 1% глюкозы и 30 мкг/мл хлорамфеникола. Культуры выращивали в течение 18 ч. при 30°C и 250 об./мин и субкультивировали в разведении приблизительно 1:10 в 250 мл среды Terrific Broth с 30 мкг/мл хлорамфеникола до конечной OD600 0,2. Культуры инкубировали в течение 135 минут при 30°C и 250 об./мин до OD600 0,6 и индуцировали с помощью 1 мМ IPTG. Индуцированные культуры инкубировали в течение 20 ч. при 30°C и 250 об./мин. После этой инкубации культуры центрифугировали при 4000 об./мин в течение 10 мин. Супернатант выбрасывали и ресуспендировали осадки в 30 мл 20 мМ фосфата натрия, pH 8, 150 мМ NaCl. Клетки осаждали при 2860×g в течение 10 мин), ресуспендировали в 12 мл 50 мМ фосфата натрия, pH 7,5, и лизировали с использованием системы One Shot Cell Disruption (ConstantSystems) при давлении 17000 фунт/дюйм² (117,21 МПа). Лизат осаждали (10000 об./мин в течение 30 мин) и супернатант замораживали и лиофилизировали для получения порошка фермента.

Очистка PAL из культур во встряхиваемых колбах

[0214] Выбранные варианты выращивали в культурах во встряхиваемых колбах до насыщения, как описано выше. Насыщенные культуры осаждали посредством центрифугирования (4000 об./мин в течение 20 мин) и клеточные осадки хранили при -80°C перед

очисткой. Клеточные осадки размораживали при комнатной температуре и ресуспендировали в 20 мМ фосфата натрия, pH 8, 150 мМ NaCl в 5 мл буфера на грамм клеток. Образец суспензии лизировали с использованием микрофлюидизатора с установленным давлением 110 фунт/дюйм² (0,76 МПа). Полученный лизат очищали посредством центрифугирования при 10000 об./мин в течение 1 часа, а затем фильтрации с помощью фильтра PES 0,2 мкм (Millipore).

[0215] После фильтрации полученный лизат нагревали при 55-65°C в течение 1,5-2 часов в присутствии или отсутствие 10 мМ фенилаланина. Лизат прекращали нагревать и очищали посредством центрифугирования при 10000 об./мин при 4°C в течение 1 часа. Затем супернатант, содержащий растворимую PAL, фильтровали с помощью фильтра PES 0,2 мкм.

[0216] Массовую кристаллизацию осуществляли с использованием раствора, не содержащего твердые частицы. Фильтрованный концентрат и антирастворитель (0,1 М HEPES, 0,2 М NaCl, pH 7,5, 25% (масс./об.) PEG 3350) отдельно нагревали до 40°C. Антирастворитель медленно, постепенно добавляли до достижения точки помутнения. Контактной нуклеации достигали посредством добавления небольшого количества существующих кристаллов в раствор после достижения им точки помутнения (эта стадия не является обязательной). Раствор линейно охлаждали с 40°C до 4°C за 6 часов. Периодически суспензию осторожно перемешивали для ресуспендирования твердых веществ. Суспензию в течение 12-24 часов держали при 4°C. Сливали жидкость с оставшихся осевших кристаллов. Кристаллические твердые вещества промывали водой для удаления остаточного PEG. Промытые кристаллы сушили посредством лиофилизации в течение ночи.

ПРИМЕР 4

Характеризация очищенной PAL и вариантов PAL

[0217] В этом примере описаны анализы, осуществленные для характеристики PAL дикого типа и вариантов PAL.

Переносимость условий хранения

[0218] Лيوфилизированные варианты ферментов инкубировали на

шейкере Thermotron® HT (Infors AJ185) при 45°C в течение 1, 5, 7 или 10 дней. Лيوфилизированный фермент ресуспендировали в 400 мкл ddH₂O и солюбилизировали посредством встряхивания в течение 10 мин. Для анализа 100 мкл 200 мМ фосфата натрия/50 мМ фенилаланина, pH 7,0, 80 мкл ddH₂O и 20 мкл суспензии добавляли в лунки полиакрилатного 96-луночного планшета для микротитрования (Costar #3635, Corning). Реакционные смеси быстро перемешивали и определяли активность, измеряя поглощение при 290 нм с течением времени (каждые 12-20 сек в течение 5-20 мин) с использованием спектрофотометров для микропланшетов SpectraMax® Plus 384 или SpectraMax® 190 (MolecularDevices).

Устойчивость к кишечному соку

[0219] Образцы вариантов P_{AL}, полученные, как описано в примере 3, растворяли в количестве 2 г/л в искусственном кишечном соке. Варианты P_{AL} растворяли в каждом из четырех искусственных кишечных соков: искусственный кишечный сок с симуляцией состояния натошак (таурохолат натрия 3 мМ, лецитин 0,2 мМ, малеиновая кислота 19,12 мМ, гидроксид натрия 34,8 мМ, хлорид натрия 68,62 мМ, pH 6,5), искусственный кишечный сок с симуляцией ранних стадий пищеварения (таурохолат натрия 10 мМ, лецитин 3 мМ, малеиновая кислота 28,6 мМ, гидроксид натрия 52,5 мМ, хлорид натрия 145,2 мМ, глицерил монохолат 6,5 мМ, олеат натрия 40 мМ, pH 6,5), искусственный кишечный сок с симуляцией средних стадий пищеварения (таурохолат натрия 7,5 мМ, лецитин 2 мМ, малеиновая кислота 44 мМ, гидроксид натрия 65,3 мМ, хлорид натрия 122,8 мМ, глицерил монохолат 5 мМ, олеат натрия 30 мМ, pH 5,8), искусственный кишечный сок с симуляцией поздних стадий пищеварения (таурохолат натрия 4,5 мМ, лецитин 0,5 мМ, малеиновая кислота 58,09 мМ, гидроксид натрия 72 мМ, хлорид натрия 51 мМ, глицерил монохолат 1 мМ, олеат натрия 0,8 мМ, pH 5,4). Трипсин свиньи и бычий химотрипсин (100 мг каждого) растворяли в 2 мл 100 мМ фосфата натрия, pH 7,0, и разводили до 1,5 мг/мл в каждом искусственном кишечном соке. Измеряли ферментативную активность в каждом искусственном кишечном соке с течением времени с трипсином и химотрипсином и без них.

Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 1-24 ч. на шейкере Thermotron® HT (Infors AJ185) при 400 об./мин (амплитуда 1 дюйм (2,54 см)). Затем 20 мкл реакционной смеси смешивали с 80 мкл воды и 100 мкл 100 мМ фосфата натрия, 50 мМ фенилаланина, pH 7,0. Каждый раствор быстро перемешивали и определяли активность, измеряя поглощение при 290 нм с течением времени (каждые 12-20 сек. в течение 5-20 мин) с использованием спектрофотометров для микропланшетов SpectraMax® Plus 384 или SpectraMax® 190 (MolecularDevices).

ПРИМЕР 5

Получение вариантов PAL посредством ферментации и кристаллизации

[0220] Среда для периодической ферментации ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,52 г/л, дигидрат цитрата натрия 0,59 г/л, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 7,5 г/л, KH_2PO_4 3,7 г/л, дрожжевой экстракт (Biospringer) 2,0 г/л, полипропиленгликоль (PPG 2000) 0,3 мл/л, цитрат железа (III) аммония 0,05 г/л, стоковый раствор микроэлементов 5,0 мл/л ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,0 г/л, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,2 г/л, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 г/л, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,0 г/л, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1 г/л, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,02 г/л, доведенные до pH 2-3 с помощью H_2SO_4) дополняли глюкозой при начальной концентрации приблизительно 10 г/л. После инокуляции культуру держали при 37°C и уровне растворенного кислорода не менее 45%. Подпитку периодической культуры (моногидрат глюкозы 500 г/л и безводный сульфат магния 5,1 г/л) начинали после истощения глюкозы, о чем свидетельствовало повышение pH относительно заданного показателя 7,00-7,05. Подпитку глюкозой начинали со скоростью 0,41 мл/мин и повышали до конечной скорости 2,42 мл/мин с использованием экспоненциального профиля в течение 12 часов. Затем поддерживали подпитку с постоянной скоростью 2,42 мл/мин в оставшееся время ферментации.

[0221] После того как в ферментер вводили совокупный объем 0,94 л питательного раствора, температуру снижали до 30°C и индуцировали экспрессию вариантов PAL посредством добавления IPTG до концентрации 1 мМ. Фазу экспрессии заканчивали после того, как в ферментер вводили общий объем подпитки 3,84 л. Общее

время индукции составляло приблизительно 20 часа.

[0222] Клетки собирали посредством центрифугирования (3752×g) в течение 10 мин и осадок использовали напрямую или хранили в замороженном виде. Холодный буфер (4°C), состоящий из 20 мМ фосфата натрия, 150 мМ NaCl, pH 8,0, использовали для ресуспендирования осадка до исходного объема сбора. Во время ресуспендирования pH доводили до $8,0 \pm 0,2$ с помощью NaOH. Перед гомогенизацией суспензию охлаждали до 6°C. Внутриклеточный фермент высвобождали из клетки с использованием гомогенизатора высокого давления (APV 1000), оборудованного соответствующим клапаном для разрушения клеток с 11500 ± 500 фунт/дюйм² изб. ($79,29 \pm 3,45$ МПа). Сразу после разрушения клеток гомогенат охлаждали до $15 \pm 2^\circ\text{C}$ и доводили pH гомогената до $8,0 \pm 0,2$ с помощью NaOH. К гомогенату клеток добавляли 10% масс./об. SuperFloc C581. Во время добавления гомогенат и смесь C581 встряхивали для обеспечения полного смешивания. Суспензию инкубировали со встряхиванием при $10 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 30 минут, затем нагревали до $55^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ и держали при 55°C в течение 1 часа. Термически обработанную суспензию охлаждали до $10 \pm 2^\circ\text{C}$. Твердые вещества отделяли от жидкой фракции посредством центрифугирования. Гомогенат центрифугировали при 5050×g в течение 35 мин. Стадию концентрирования осуществляли для достижения концентрации белка от 30 г/л до 40 г/л. Концентрированный очищенный лизат подвергали диафильтрации с использованием двух объемов 20 мМ фосфата натрия/150 мМ NaCl, pH 8,0. Концентрирование и замену буфера в растворе осуществляли с помощью кассет TangenX 30kD PES NovaSet™-LS. Концентрат стерилизовали фильтрацией с помощью одноразового фильтровального блока 0,2 мкм Nalgene™ Rapid-Flow™ с мембраной PES.

[0223] Фильтрованный концентрат и антирастворитель (0,1 М HEPES, 0,2 М NaCl pH 7,5 25% (масс./об.) PEG 3350) отдельно нагревали до 40°C. Антирастворитель медленно добавляли к концентрату варианта PAL до достижения точки помутнения. Контактную нуклеацию осуществляли посредством добавления

небольшого количества кристаллов к раствору после достижения точки помутнения. Раствор линейно охлаждали с 40°C до 4°C за 6 часов с периодическим осторожным перемешиванием. Суспензию держали в течение 12–24 часов при 4°C. Жидкость сливали и кристаллические твердые вещества промывали водой для удаления остатков PEG. Затем промытые кристаллические твердые вещества лиофилизировали в течение ночи до сухого состояния.

ПРИМЕР 6

Результаты скрининга

[0224] Получали варианты SEQ ID NO:4 ("варианта #1), включая вариант #2 (SEQ ID NO:6), содержащий дополнительную мутацию F450A, включенную в последовательность варианта #1. Также получали варианты с использованием варианта #2 в качестве основы. Эти варианты тестировали на активность PAL после инкубации в лиофилизированной форме при 45°C в течение 0 или 10 дней, как описано в примере 2. Кроме того, варианты с мутациями остатков фенилаланина тестировали только в день 0. Данные повторного тестирования активных вариантов с соответствующим кратным улучшением относительно положительного контроля (FIOP) представлены в таблице 6.1 ниже. В этом наборе данных положительным контролем является вариант #2.

Таблица 6.1. Скрининг вариантов, полученных из SEQ ID NO:6 (варианта #2), на активность PAL			
Вариант #	Замены аминокислот относительно варианта #2 (SEQ ID NO:6)	FIOP (T=0)	FIOP (T=10 дней)
3	T102Q/D470E	+	++
4	I285R/D470E/T495A	++	++
5	T102Q	+	++
6	N44H/T239A/I285R/V469I/T495A	+	+
7	T239A/I285R	++	+
8	N44H/I56V	++	++
9	I285L/D470E	++	+++
10	N44H/T239A/V469I/D470E	++	+++
11	N44H/I56V/T102Q/T239A/I285L/V469I/D470E/T495A	+	++
12	N44H/T239A/I285L/D470E	++	++
13	I285L/V469I/D470E/T495A	+	+

14	N44C/T239A/T495A	+	++
15	N44H/T239A/T495A/S546A	+	+
16	N44H/V469I/D470E	++	+
17	N44H/T239A/D470E/S546A	++	+
18	T239A/I285L/V469I	+	++
19	T239A/V469I/D470E/T495A	++	+
20	V469I/D470E	++	+
21	N44H/T239A/I285R/D470E	++	+
22	N44H/T239A	+	+
23	F16S	++++	
24	F472A	+++	
25	F16W	++	
26	F16A	++	
27	F16E	+++	
28	F162W	++	
29	F482N	++	
30	F16V	+++	
31	F16T	+++	
32	F162Q	+	
33	F16W	++	
34	F16R	++	
35	F267V	++	
36	F267G	++	
37	F188I	++	
38	F16T	++	
39	F482C	++	
40	F264H	+++	
41	F16N	+++	
42	F16K/F150A	++	
43	L364E	+	+++
44	N455S	++	+
45	L364S	+	++++
46	L364T	+	+
47	L364H	+++	++++
48	I165L	++	++

[0225] В приведенной выше таблице кратное улучшение (FIOP) активности сравнивают с основой SEQ ID NO:6 (вариантом #2) и определяют следующим образом: "-"=менее чем 0,2-кратная активность; "+"=более чем 0,2-кратная, но менее чем 1-кратная активность; "++"=более чем 1-кратная, но менее чем 1,25-кратная повышенная активность; "+++"=более чем 1,25-кратная, но менее

чем 1,5-кратная повышенная активность; и "++++"=более чем 1,5-кратная активность.

ПРИМЕР 7

Подтверждение совпадений

[0226] Учитывая результаты, представленные в таблице 6.1 выше, подтверждали активность вариантов, приведенных в таблице 7.1 ниже, для образцов ферментов, полученных, как описано в примере 3.

Таблица 7.1 Подтверждение активности выбранных вариантов, полученных из варианта #2 (SEQ ID NO:6)			
Вариант #	Замены аминокислот относительно варианта #2 (SEQ ID NO:6)	FIOP (T=0)	FIOP (T=10 дней)
2		+	+
24	F472A	++	+++
29	F482N	++	+
47	L364H	++	+
23	F16S	+++	+++
40	F264H	+	+

[0227] В приведенной выше таблице кратное улучшение (FIOP) активности сравнивают с основой SEQ ID NO:6 (вариантом #2) и определяют следующим образом: "+"=более чем 0,95-кратная, но менее чем 1-кратная повышенная активность; "++"=более чем 1-кратная, но менее чем 1,25-кратная повышенная активность; и "+++ "=более чем 1,25-кратная повышенная активность.

ПРИМЕР 8

Результаты скрининга дополнительных вариантов

[0228] Благоприятные мутации, идентифицированные, как описано в примере 6, рекомбинировали в SEQ ID NO:8 (вариант #23) (представленной в таблицах 6.1 и 7.1) и новые варианты тестировали на активность PAL после инкубации в лиофилизированной форме при 45°C в течение 0 и 10 дней. Данные повторного тестирования активных вариантов с соответствующим кратным улучшением относительно положительного контроля (FIOP) представлены в таблице 8.1, при этом вариант #23 использовали в качестве положительного контроля. В следующей таблице некоторые из вариантов содержат одинаковые замены (т.е. являются повторениями, такими как варианты 52 и 61), т.к. результаты

этого анализа получали до получения данных секвенирования этих вариантов.

Таблица 8.1 Результаты скрининга вариантов, полученных из SEQ ID NO:8 (варианта #23)			
Вариант #	Замены аминокислот относительно варианта #23 (SEQ ID NO:8)	FIOP (первичное T=0)	FIOP (первичное T=10 дней)
49	S209P/I285R/L364H/D470E/T495A	++++	+++
50	R204K/S209P/L364H	+++	+++
51	S209P/I285L/L364H/D470E	+++	++
52	A47K/T239A/I285R/L364H	+++	++
53	L364H	++	+++
54	R204K/L364H	+++	+
55	N44H/R204K/I285R/L364H/D470E/T495A	+++	++++
56	A47K/R204K/I285R/L364H/T495A	+++	+++
57	L364H/D470E	+++	++
58	R204K/S209P/L364H/T495A	+++	++
59	A47K/S209P/T239A/L364H	++	++
60	S209P/L364H/T495A	+++	++
61	A47K/T239A/I285R/L364H	+++	++
62	N44H/A47K/L364H/D470E/T495A	+++	++
63	A47K/D470E	+++	++
64	I56V	+++	++
65	T239A/L364H	+++	+++
66	K54E/I56V/R204K/S209P/D470E	+++	+++
67	R204K	+++	++
68	N44H/K54P/I285R/D470E	+++	+++
69	R204K/D470E	+++	+++
70	S209P/L364H	+++	++
71	R204K/S209P/T239A/I285R/D470E/T495A	++	+++
72	A47K/K54P/S209P	+++	+++
73	K54E/I285R/D470E	+++	+++
74	D470E	++	++
75	R204K/T239A	+++	++
76	K54P/D470E	+++	+++
77	S209P/D470E	++	++
78	N44H/S209P/I285R/T460G/T495A	++++	++
79	R204K/T239A/I285R	++++	+++
80	K54E/I56V/R204K/S209P/T495A	+++	+++
81	R204K/T239A/I285R	+++	++
82	R204K/T239A/I285R	++	++

83	N44H/K54P/I56V/R204K/T239A/D470E/T495A	+++	++
84	A47K/R204K/S209P/T239A/I285R/T495A	++	++
85	N44H/R204K/S209P/I285R	++	++
86	K54E	++	++
87	K54P/I285L/D470E	++	++
88	K54P/I56V/R204K/T495A	+++	++
89	K54P/I56V/I285L/D470E	+++	+++
90	N44H/A47K/R204K/S209P/I285R	++	++
91	K54P/I56V	++++	++
92	K54E/I56V/I285R/L364S/D470E	++	+++
93	K54P/I56V/S209P/I562N	++	++
94	K54P/T239A/T495A	++	++
95	I165L	++	++
96	N44H/K54P/I56V/R204K/T239A/I285R/L364S/T495A	++++	++
97	R204K/T239A/I285R	++++	+++
98	S209P/I285R/L364E/D470E	++	++
99	K54P/I165L/R204K/S209P/T239A/I285R/D470E/T495A	++	++
100	S209P/I285R/L364E/D470E/T495A	+++	++
101	R204K/S209P/L364E/T495A	++	++
102	N44C/I285R/L364E	++++	+
103	I285R/L364H	++++	+++
104	I285R/L364H/T495A	+++	+++
105	L364H	+++	++
106	N44C/T102Q/I285R/L364H	+++	+++
107	T495A	+++	+

[0229] В приведенной выше таблице кратное улучшение (FIOP) активности сравнивают с основой (SEQ ID NO:8 (вариант #23) и определяют следующим образом: "-"=менее чем 0,2-кратная активность; "+"=более чем 0,2-кратная, но менее чем 1-кратная активность; "++"=более чем 1-кратная, но менее чем 1,25-кратная повышенная активность; "+++"=более чем 1,25-кратная активность, но менее чем 1,5-кратная повышенная активность; и "++++"=более чем 1,5-кратная повышенная активность.

ПРИМЕР 9

Удаление остатков фенилаланина

[0230] Результаты анализа активности вариантов SEQ ID NO:6 (варианта #2), в которых остатки фенилаланина заменяют без

потери активности (т.е. осуществляют мутации фенилаланина, являющиеся нейтральными или благоприятными для активности), представлены в таблице 9.1. Как и в таблице 8.1, в следующей таблице некоторые из вариантов содержат одинаковые замены, т.к. результаты этого анализа получали до получения данных секвенирования этих вариантов.

Таблица 9.1 Мутации остатков фенилаланина в SEQ ID NO:6 (варианте #2), которые можно заменять без потери функции		
Вариант #	Замены аминокислот относительно SEQ ID NO:6 (варианта #2)	Первичное FICP (T=0)
108	F162M	+
32	F162Q	+
28	F162W	+
26	F16A	+
109	F16A	+
27	F16E	+
110	F16K	+
42	F16K/F150A	+
111	F16L	+
112	F16M	+
41	F16N	+
113	F16P	+
34	F16R	+
23	F16S	+
31	F16T	+
38	F16T	+
30	F16V	+
114	F16V	+
25	F16W	+
33	F16W	+
115	F188A	+
37	F188I	+
116	F188N	+
40	F264H	+
36	F267G	+
117	F267L	+
118	F267Q	+
119	F267S	+
35	F267V	+
120	F398H	+

121	F434V	+
24	F472A	+
122	F472A	+
123	F472L	+
124	F472V	+
39	F482C	+
29	F482N	+
125	F482S	+

[0231] В приведенной выше таблице кратное улучшение (FIOP) активности сравнивают с основой SEQ ID NO:6 (вариантом #2) и определяют следующим образом: "+"=схожая активность с SEQ ID NO:6 (вариантом #2) или SEQ ID NO:8 (вариантом #23)

ПРИМЕР 10

Результаты раунда 9 скрининга

[0232] Создавали комбинаторную библиотеку на основе анализа предыдущих результатов с использованием SEQ ID NO:12 (варианта #126) в качестве основы, т.к. вариант #126 продемонстрировал улучшенную стабильность при хранении, а также устойчивость к протеазам при высокопроизводительном скрининге. Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант #126 (SEQ ID NO:11), содержит мутацию a21t по сравнению с вариантом #51 (SEQ ID NO:9). Этот вариант сравнивали с AvPAL дикого типа в различных искусственных кишечных соках, как описано в примере 4. Активные мутации с соответствующим кратным улучшением активности в T=0 и T=10 дней после инкубации лиофилизированного фермента при 45°C относительно варианта #126 представлены в таблице 10.1 ниже. Как и в других таблицах в примерах, в следующей таблице некоторые из вариантов содержат одинаковые замены, т.к. результаты этого анализа получали до получения данных секвенирования этих вариантов.

Таблица 10.1 Скрининг вариантов, полученных из варианта #126, на активность PAL			
Вариант #	Замены аминокислот относительно SEQ ID NO:12	FIOP (T=0)	FIOP (T=10)
127	I56V/F162W/F398H	++	++
128	K54E/I56V/F162W/R204K/L285I	+++	+++
129	I56V/R204K/F398H/F472L	++	+

130	K54P/I56V/R204K/F398H/F472L	++	++
131	I56V/L285I	+++	++
132	I56V/R204K/F398H	++	+
133	K54P/I56V/R204K/F398H	++	++
134	K54P/R204K/L285I/F398H/F472L	++	+
135	I56V/F398H	++	+
136	K54E/I56V/F398H/F472L	++	+
137	I56V/L285I/F398H/F472L	++	+
138	K54P/I56V/F398H	++	+
139	I56V/F398H	++	++
140	K54P/L285I/F398H	++	+
141	K54P/I56V/F162W/R204K/F398H	++	++
142	K54P/I56V/L285I	++	++
143	K54P/I56V/R204K/L285I	++	+
144	I56V/F398H/F472L	++	++
145	K54E/R204K/F398H	++	+
146	I56V/R204K/L285I	++	++
147	T201A/R204K/F398H	++	++
148	I56V/L285H	++	+
149	K54E/F162W/F398H	++	+
150	K54P/F162W/F398H	++	++
151	K54E/F162W/R204K/F398H	++	++
152	K54P/L285I/F398H/F472L	++	+
153	I56V/R204K/F398H/T460G	++	+

[0233] В этой таблице кратное улучшение (FIOP) активности сравнивают с основой SEQ ID NO:12 (вариантом #126) и определяют следующим образом: "-"=менее чем 0,2-кратная активность; "+"=более чем 0,2-кратная, но менее чем 1-кратная активность; "++"=более чем 1-кратная, но менее чем 1,25-кратная повышенная активность; и "+++"=более чем 1,25-кратная активность.

ПРИМЕР 11

Уровни фенилаланина в плазме

[0234] Образцы плазмы анализировали на фенилаланин и коричную кислоту. Внутренние стандарты получали посредством растворения фенилаланина или коричной кислоты в 50/50 ацетонитриле:DMSO, а затем разводили до рабочих концентраций 10-40000 нг/мл в 50% ацетонитриле. Эти образцы разводили в контрольной плазме собаки (10 мкл:90 мкл), а затем разводили в 300 мкл внутреннего стандарта (d₈-Phe или d₇-CA в концентрации

250 нг/мл в ацетонитриле). Образцы плазмы животных (20 мкл) разводили ацетонитрилом (80 мкл), а затем разводили в 300 мкл внутреннего стандарта. Для анализа концентраций фенилаланина 30 мкл образцов инъецировали с использованием автосемплера для ВЭЖХ/СТС Shimadzu с колонкой Luna C18 (2,1×100 мм, 5 мкм). Образцы элюировали с использованием градиента 0,5% муравьиной кислоты, 5 мМ ацетата аммония в воде и 90% ацетонитрила и 10% воды с 0,5% муравьиной кислоты в течение 2,5 минут, при этом фенилаланин элюировали через 1,3 мин.

[0235] Для анализа коричной кислоты 30 мкл образца инъецировали с использованием автосемплера для ВЭЖХ/СТС Shimadzu с колонкой с диоксидом кремния Thermo (2,1×100 мм, 5 мкм). Образцы элюировали с использованием градиента 5 мМ ацетата аммония в воде и 90% ацетонитрила/10% воды в течение 3,5 минут, при этом коричную кислоту элюировали через 2,3 мин. Аналиты определяли с использованием масс-спектрометра API-4000Q-trap, осуществляя сканирование MRM в ESI-положительном режиме (фенилаланин) или отрицательном режиме (коричная кислота). Переходы для меченых изотопами производных фенилаланина составляли 166,2/120,0, 171,2/125,1 и 174,2/128,2. Переходы для меченой изотопами коричной кислоты составляли 146,8/102,9, 151,9/107,9 и 153,9/110,1.

ПРИМЕР 12

Активность варианта #126 в кишечнике в модели на собаках

[0236] Для анализа стабильности и активности вариантов PAl при их транзите через желудочно-кишечный тракт, собакам породы бигль через желудочный зонд вводили очищенные варианты фермента. Измеряли эффект этих вариантов в отношении концентраций фенилаланина и коричной кислоты в крови собак. Собак заставляли голодать в течение ночи (12–16 часов) и в течение исследования до достижения 8 часов после введения фермента. Всем собакам вводили пероральную дозу фамотидина (40 мг/собаку) за 2 часа до начала исследования и снова через +3 часа для минимизации закисления желудка. Образцы плазмы до исследования (~2 мл) получали в -2 часа (непосредственно перед введением первой дозы

фамотидина), -30 мин и -10 мин (среднее значение для этих 3 измерений использовали для нормализации значений после введения доз). Точно через 5 минут после введения дозы носителя или варианта #126 в $t=0$ всем собакам вводили PO дозу 900 мг/кг порошка белка козьего молока Esbilac (PetAg) в суспензии (4 мл/кг). Дополнительные образцы плазмы получали в +15 мин, +30 мин и +1, +2, +4, +6, +8 и +24 ч. после введения дозы. Образцы плазмы анализировали на Phe и СА, как описано в примере 11.

[0237] Результаты представлены на фигурах 3, 4 и 5. На фигуре 3 показаны относительные уровни фенилаланина в крови в разных группах. После введения носителя наблюдали 1,35-кратное повышение уровня фенилаланина. Введение всех доз варианта #126 подавляло это немедленное повышение фенилаланина и приводило к снижению фенилаланина в крови в $t=1$ ч., за исключением группы, которой вводили дозу 200 мг/кг. Через 2 ч. в группе, которой вводили дозу 120 мг/кг, наблюдали снижение фенилаланина в крови на 34%.

[0238] На фигуре 5 показаны уровни коричной кислоты в разных группах. Во всех группах, за исключением группы носителя, наблюдали быстрое появление коричной кислоты после введения варианта #126. Быстрое начало образования коричной кислоты приводит к $C_{\max}$ через 15 минут в случае дозы 120 мг/кг, через 30 мин в случае дозы PAl 60 мг/кг и через 1 ч. в случае дозы 200 мг/кг. Коричную кислоту определяли в плазме в течение 10 ч. во всех группах, которым вводили дозы. В группе, которой вводили дозу 200 мг/кг, коричная кислота продолжала превышать исходный уровень в течение 24 ч.

[0239] На фигуре 5 количество коричной кислоты, образовавшейся в течение первых 4 ч. после введения варианта #126, количественно анализировали как AUC. AUC для групп, которым вводили дозы 60, 120 и 200 мг/кг, статистически значимо отличалась от группы, которой вводили носитель.

ПРИМЕР 13

Активность варианта #126 в кишечнике у яванских макак

[0240] Яванских макак использовали для анализа эффективности варианта #126 в превращении фенилаланина в коричную кислоту,

измеряя уровни фенилаланина и коричной кислоты в плазме. Некоторым из животных вводили дозу фамотидина (20 мг на обезьяну) за два часа до введения варианта #126. Фермент вводили с помощью желудочного зонда, а через 5 минут вводили 900 мг/кг белка козьего молока Esbilac (PetAg) для начала исследования ($t=0$). Образцы плазмы анализировали на Phe и СА, как описано в примере 11.

[0241] На фигуре 6 показан график относительных уровней фенилаланина в плазме в разных группах за первые 8 ч. после введения варианта #126. Введение носителя приводило к 1,7-кратному повышению уровней фенилаланина через 1 ч. Введение всех доз варианта #126 подавляло это повышение фенилаланина и приводило к снижению фенилаланина в крови через 1-2 ч. Во всех группах, которым вводили вариант #126, наблюдали снижение фенилаланина в плазме на 20-38% через 1 час по сравнению с группой, которой вводили носитель.

[0242] Как показано на фигуре 7, относительное снижение фенилаланина количественно анализировали как AUC для периода времени от 0 до 4 ч. Во всех группах, которым вводили вариант #126, наблюдали в среднем на 22% меньшую AUC для фенилаланина по сравнению с контрольной группой, которой вводили носитель.

[0243] На фигуре 8 показана временная зависимость концентрации коричной кислоты в плазме для групп с разными дозами. На фигуре 8 (вверху) показано образование коричной кислоты в группах, которым предварительно вводили фамотидин; на фигуре 8 (внизу) показаны такие данные для групп, которым не вводили фамотидин перед введением доз. Уровни коричной кислоты быстро росли до достижения $C_{\max}$ через 1 ч., а затем снижались до значения, близкого к исходному, через 4 ч. В контрольной группе, которой вводили носитель, коричную кислоту не определяли.

[0244] Как показано на фигуре 9, образование коричной кислоты в течение начальных 0-4 ч. после введения количественно анализировали как AUC. На фигуре 9 (вверху) показана AUC в группах, которым предварительно вводили фамотидин. 10-кратное повышение дозы приводило к менее чем 2-кратному повышению продукции коричной кислоты. На фигуре 9 (в середине) показана

AUC в группах, которым предварительно не вводили фамотидин, и во всех группах наблюдали схожий уровень образования коричной кислоты. На фигуре 9 (внизу) показано прямое сравнение групп, которым вводили одинаковое количество варианта #126, но предварительно вводили или не вводили фамотидин. Введение фамотицина не имело статистически значимого эффекта.

[0245] Результаты, показанные на фигурах 6-9, свидетельствуют о том, что пероральное введение варианта #126 здоровым яванским макакам имеет статистически значимый эффект в отношении уровней фенилаланина в плазме. Кроме того, после перорального введения варианта #126 яванским макакам образуется количество коричной кислоты, соответствующее удалению приблизительно 9 мг/кг фенилаланина. Это количество является значимым в отношении потребления фенилаланина здоровыми индивидуумами и пациентами с PKU.

ПРИМЕР 14

Результаты скрининга отдельных вариантов с мутациями

[0246] Все мутации аминокислот по отдельности включали в вариант #126 (SEQ ID NO:12) и тестировали на активность PAL после инкубации в лиофилизированной форме при 45°C в течение 0 (T=0) или 10 (T=10) дней и на стабильность при воздействии протеаз, каждый вариант тестировали в трех параллелях. В следующей таблице представлены мутации и результаты анализа.

Таблица 14.1 Скрининг вариантов, полученных из варианта #126 (SEQ ID NO:12), на активность PAL				
Вариант #	Замены аминокислот (относительно SEQ ID NO:12)	FIOP (T=0)	FIOP в анализе действия протеаз	FIOP (T=10)
154	S16E	+++	+++	+
155	S16I	+++	+++	+
156	S16L	++	++	+
157	S16D	++	++	+
158	S16K	++	++	+
159	S16H	++	++	+
160	S16M	++	++	+
161	Q214N	++	++	+++
162	S16C	++	++	+

163	S16T	++	++	+
164	S16A	++	++	+
165	H364M	++	++	+
166	G307I	++	++	+
167	S16Q	++	++	+
168	V39Y	++	+	++
169	S16F	++	++	+
170	Q214C	++	++	++
171	S16N	++	+	+
172	S16R	++	++	+
173	S16P	++	+	+
174	R59F	++	+	++
175	Q503E	++	++	++
176	H364Y	++	++	+
177	S16V	++	+	+
178	L285N	++	+	+
179	K521Y	++	++	++
180	Q214D	+	++	+
181	S16W	+	++	+
182	H364E	+	+	+
183	H364L	+	+	+
184	L285C	+	+	+
185	G307Q	+	+	+
186	L285A	+	+	+
187	V39H	+	+	+
188	G307A	+	+	+
189	H364K	+	+	+
190	L285H	+	+	+
191	G307L	+	+	+
192	Q214W	+	+	+
193	G307H	+	+	+
194	R59N	+	+	+
195	A47D	+	+	+
196	V39N	+	+	+
197	G307E	+	+	+
198	V39Q	+	+	+
199	L285E	+	+	+
200	G307C	+	+	+
201	L285G	+	+	+
202	K54Q	+	+	+
203	H364N	+	+	+

204	K521G	+	+	+
205	H364T	+	+	+
206	V39R	+	+	+
207	Q214E	+	+	+
208	L285V	+	+	+
209	K54I	+	+	+
210	Q214G	+	+	+
211	H18V	+	+	+
212	L285M	+	+	+
213	K521P	+	+	+
214	A47E	+	+	+
215	H18P	+	+	+
216	Q503G	+	+	+
217	H364Q	+	+	+
218	K73I	+	+	+
219	G290D	+	++	+
220	Q503A	+	+	+
221	Q503V	+	+	+
222	Q503I	+	+	+
223	K521M	+	+	+
224	V407I	+	+	+
225	H364I	+	+	+
226	K54D	+	+	+
227	V39E	+	+	+
228	V39K	+	+	+
229	G307F	+	+	+
230	G307V	+	+	+
231	V39T	+	+	+
232	G307S	+	+	+
233	K73R	+	+	+
234	K521V	+	+	+
235	V39G	+	+	+
236	V407R	+	+	+
237	Q503Y	+	+	+
238	G307T	+	+	+
239	K521C	+	+	+
240	M305A	+	++	+
241	V407K	+	+	+
242	P565E	+	+	+
243	V39F	+	+	+
244	L285Q	+	+	+

245	M305N	+	+	+
246	K521L	+	+	+
247	H18N	+	+	+
248	V91T	+	+	+
249	K54C	+	+	+
250	P209S	+	+	+
251	K521A	+	+	+
252	L285T	+	+	+
253	A47S	+	+	+
254	K54A	+	+	+
255	P209N	+	+	+
256	G307M	+	+	+
257	L285K	+	+	+
258	V39W	+	+	+
259	K521H	+	+	+
260	K73V	+	+	+
261	K73Y	+	+	+
262	L285F	+	+	+
263	K521W	+	+	+
264	K54L	+	+	+
265	P565V	+	+	+
266	H18Q	+	+	+
267	Q503D	+	+	+
268	M305L	+	+	+
269	M305S	+	+	+
270	M305K	+	+	+
271	G290P	+	-	+
272	S524L	+	+	+
273	H18Y	+	+	+
274	G307R	+	+	+
275	K73L	+	+	+
276	V407C	+	+	+
277	K54M	+	+	+
278	G290S	+	++	+
279	H364V	+	+	+
280	P565D	+	+	+
281	V407M	+	+	+
282	G290Q	+	+	+
283	E470M	+	+	+
284	V91S	+	+	+
285	Q503S	+	+	+

286	H18D	+	+	+
287	K54T	+	+	+
288	K73E	+	+	+
289	E470T	+	+	+
290	P565G	+	+	+
291	K521E	+	+	+
292	G307Y	+	+	+
293	V407A	+	+	+
294	K54S	+	+	+
295	L285R	+	+	+
296	S524H	+	+	+
297	A47G	+	+	+
298	P565K	+	+	+
299	K54V	+	+	+
300	P209A	+	+	+
301	V39L	+	+	+
302	A47I	+	+	+
303	Q503T	+	+	+
304	S524W	+	+	+
305	Q214S	+	+	+
306	K73T	+	+	+
307	K521S	+	+	+
308	P565R	+	+	+
309	E470Q	+	+	+
310	Q503C	+	+	+
311	E470W	+	+	+
312	V39S	+	+	+
313	R59L	+	+	+
314	V39D	+	+	+
315	S524E	+	+	+
316	Q214T	+	+	+
317	A47K	+	+	+
318	K54E	+	+	+
319	V39M	+	+	+
320	L285S	+	+	+
321	K73A	+	+	+
322	K521D	+	+	+
323	S524R	+	+	+
324	Q503F	+	+	+
325	K521I	+	+	+
326	A47T	+	+	+

327	Q214A	+	+	+
328	Q214F	+	+	+
329	P565F	+	+	+
330	V39I	+	+	+
331	G290N	+	++	+
332	K73M	+	+	+
333	V407L	+	+	+
334	M305D	+	+	+
335	K73S	+	+	+
336	M305C	+	+	+
337	E470D	+	+	+
338	K54R	+	+	+
339	S524K	+	+	+
340	A47H	+	+	+
341	R59C	+	+	+
342	H364A	+	+	+
343	R59S	+	+	+
344	V91A	+	+	+
345	V407T	+	+	+
346	E470K	+	+	+
347	S524C	+	+	+
348	E470A	+	+	+
349	K54P	+	+	+
350	P565H	+	+	+
351	Q214H	+	+	+
352	A47Q	+	+	+
353	A47V	+	+	+
354	A47M	+	+	+
355	K54H	+	+	+
356	P209D	+	+	+
357	G307D	+	+	+
358	V407H	+	+	+
359	Q503M	+	+	+
360	K73G	+	+	+
361	M305E	+	+	+
362	E470I	+	+	+
363	K521F	+	+	+
364	Q503L	+	+	+
365	P565Q	+	+	+
366	G290K	+	+	+
367	P209Y	+	+	+

368	P565Y	+	+	+
369	P209G	+	+	+
370	A47R	+	+	+
371	Q214Y	+	+	+
372	A47W	+	+	+
373	Q503K	+	+	+
374	V407N	+	+	+
375	G307W	+	+	+
376	P209C	+	+	+
377	K73Q	+	+	+
378	E470H	+	+	+
379	E470R	+	+	+
380	R59G	+	+	+
381	K521N	+	+	+
382	P565S	+	+	+
383	P209E	+	+	+
384	G290T	+	++	+
385	V39C	+	+	+
386	E470V	+	+	+
387	K73C	+	+	+
388	S524G	+	+	+
389	L285W	+	+	+
390	K54N	+	+	+
391	E470G	+	+	+
392	V91C	+	+	+
393	L285D	+	+	+
394	K521R	+	+	+
395	K521T	+	+	+
396	P565N	+	+	+
397	R59A	+	+	+
398	K54Y	+	+	+
399	E470F	+	+	+
400	P565I	+	+	+
401	P209K	+	+	+
402	H18W	+	+	+
403	E470C	+	+	+
404	M305T	+	+	+
405	S524T	+	+	+
406	P209R	+	+	+
407	R59D	+	+	+
408	K521Q	+	+	+

409	Q503R	+	+	+
410	A47P	+	+	+
411	A47Y	+	+	+
412	S524V	+	+	+
413	R59H	+	+	+
414	V407Q	+	+	+
415	P565L	+	+	+
416	S524D	+	+	+
417	L285I	+	+	+
418	V39P	+	+	+
419	P209W	+	+	+
420	K54F	+	+	+
421	P209Q	+	+	+
422	Q214M	+	+	+
423	K73W	+	+	+
424	K73N	+	+	+
425	A47C	+	+	+
426	P209V	+	+	+
427	K73D	+	+	+
428	A47F	+	+	+
429	Q503N	+	+	+
430	P209I	+	+	+
431	R59K	+	+	+
432	Q214L	+	+	+
433	Q503H	+	+	+
434	M305Q	+	+	+
435	E470Y	+	+	+
436	S524M	+	+	+
437	V91P	+	+	+
438	K73H	+	+	+
439	S524A	+	+	+
440	R59E	+	+	+
441	P565M	+	+	+
442	S16G	+	+	+
443	P209H	+	+	+
444	S524I	+	+	+
445	P209F	+	+	+
446	P565T	+	+	+
447	R59P	+	+	+
448	K54W	+	+	+
449	H18R	+	+	+

450	K73F	+	+	+
451	G290H	+	+	+
452	M305H	+	+	+
453	R59Y	+	++	+
454	P209L	+	+	+
455	A47L	+	+	+
456	P565C	+	+	+
457	M305I	+	+	+
458	H18K	+	+	+
459	E470L	+	+	+
460	E470N	+	+	+
461	E470S	+	+	+
462	P209M	+	+	+
463	S524Y	+	+	+
464	S524Q	+	+	+
465	E470P	+	+	+
466	S524P	+	+	+
467	S524N	+	+	+
468	G290R	+	+	+
469	R59M	+	+	+
470	M305V	+	+	+
471	S524F	+	+	+
472	G290A	+	+	+
473	M305W	+	+	+
474	V39A	+	+	+
475	M305G	+	+	+
476	R59Q	+	+	+
477	G290C	+	+	+
478	R59W	+	+	+
479	A450R	+	+	+
480	V91G	+	+	+
481	V407Y	+	+	+
482	H18A	+	+	+
483	R59V	+	+	+
484	R59I	+	+	+
485	M305F	+	+	+
486	H18F	+	+	+
487	V407F	+	+	+
488	V91I	+	+	+
489	A450G	+	+	+
490	H364C	+	+	+

491	P565W	+	+	+
492	A450S	+	+	+
493	P209T	+	+	+
494	H18S	+	+	+
495	G290E	+	+	+
496	R59T	+	-	+
497	H18I	+	+	+
498	A450T	+	+	+
499	P565A	+	+	+
500	M305Y	+	+	+
501	H18E	+	+	+
502	G307N	+	+	+
503	A450V	+	+	+
504	Q214I	+	+	+
505	V91N	+	+	+
506	H18G	+	+	+
507	M305P	+	+	+
508	A450K	+	+	+
509	K73P	+	-	+
510	G290M	+	+	+
511	V407S	+	+	+
512	G290Y	+	+	+
513	Q214V	+	+	+
514	H18T	+	+	+
515	Q214P	+	-	+
516	H18C	+	+	+
517	Q214K	+	+	+
518	G290F	+	+	+
519	A450M	+	+	+
520	A450N	+	+	+
521	A450Q	+	+	+
522	Q503P	+	+	+
523	V91F	+	-	+
524	V91L	+	+	+
525	V91D	+	+	+
526	H18M	+	+	+
527	Q214R	+	+	+
528	A450C	+	+	+
529	L285Y	+	+	+
530	L285P	+	+	-
531	A450H	+	+	+

532	H364S	+	+	+
533	A450F	+	+	+
534	G290L	+	+	+
535	G290V	+	+	+
536	A450I	+	+	+
537	V407G	+	+	-
538	V91M	+	+	+
539	A450E	+	+	+
540	V91H	+	+	+
541	V91Y	+	-	+
542	G307K	+	+	+
543	A450Y	+	+	+
544	G290I	+	+	+
545	H18L	+	+	+
546	V91Q	+	+	+
547	V407P	+	+	+
548	G290W	+	+	+
549	H364F	+	+	-
550	V91E	+	+	+
551	V91K	+	+	-
552	A450W	+	+	+
553	M305R	+	+	+
554	V91R	+	-	+
555	A450D	-	+	-
556	K54G	-	+	+
557	V91W	-	-	-
558	V407E	-	-	-
559	G307P	-	-	-
560	H364G	-	-	-
561	V407D	-	-	-
562	V407W	-	-	-
563	H364D	-	-	-
564	S16Y	-	-	-
565	H364P	-	-	-
566	A450P	-	-	-
567	Q503W	-	-	-
568	A47N	-	-	-
569	H364R	-	-	-
570	H364W	-	-	-
571	A450L	-	-	-

[0247] В приведенной выше таблице кратное улучшение (FIOP)

активности сравнивают с SEQ ID NO:12 (вариантом #126) и определяют следующим образом: "-"=менее чем 0,2-кратная активность; "+"=более чем 0,2-кратная, но менее чем 1-кратная активность; "++"=более чем 1-кратная, но менее чем 1,25-кратная повышенная активность; и "+++"=более чем 1,25-кратная активность.

ПРИМЕР 15

Результаты комбинаторного скрининга дополнительных вариантов

[0248] Мутации, идентифицированные в варианте #126 (SEQ ID NO:12) комбинаторно добавляли в SEQ ID NO:2. Новые варианты тестировали на активность PAL после инкубации в лиофилизированной форме при 45°C в течение 0 (T=0) или 7 дней (T=7), а также на стабильность в присутствии протеаз. Данные для вариантов с соответствующим кратным улучшением относительно положительного контроля (FIOP) представлены в таблице 15.1, при этом SEQ ID NO:12 (вариант #126) использовали в качестве положительного контроля.

Таблица 15.1 Скрининг вариантов на активность PAL				
Вариант #	Замены в аминокислотной последовательности (относительно SEQ ID NO:2)	FIOP (T=0)	FIOP в анализе действия протеаз	FIOP (T=7)
572	A39V/G59R/A202T/L407V/T524S/C565P	-	-	-
573	A39V/G59R/L364H/F450A/D470E/C565P	-	-	-
574	A39V/G59R/S73K/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
575	A39V/L214Q/H307G/C503Q/T524S	-	+	-
576	A39V/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/C503Q/Q521K/T524S	+	-	+
577	A39V/L47A/A91V/L214Q	-	-	-
578	A39V/L47A/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
579	A39V/L47A/G59R/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	-	+

580	A39V/L47A/G59R/A91V/S98G/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/P403T/L407V/F450A/D470E/C503Q/T524S/C565P	+	+	+
581	A39V/L47A/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
582	A39V/L47A/I285L/C503Q	-	-	-
583	A39V/L47A/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	++
584	A39V/L47A/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/R305M/L364H/L407V/F450A/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
585	A39V/L47A/T54K/A91V/L214Q/I285L/N290G/H307G/L364H/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
586	A39V/L47A/T54K/A91V/S209P/I285L/N290G/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
587	A39V/L47A/T54K/A91V/S209P/L214Q/I285L/R305M/H307G/L407V/C503Q/Q521K/C565P	+	+	+
588	A39V/L47A/T54K/G59R/A91V/S98G/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/T524S	+	-	+
589	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	-	+
590	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/C565P	+	+	+
591	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
592	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
593	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
594	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
595	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L407V/F450A/D470E/C5	+	-	+

	03Q/Q521K/T524S/C565P			
596	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L407V/R412H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
597	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/H307G/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/C565P	+	+	+
598	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	-	+
599	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/R305M/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
600	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/L364H/L407V/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
601	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
602	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q	+	-	+
603	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
604	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/S209P/L214Q/I285L/N290G/H307G/L407V/F450A/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
605	A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
606	A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/R305M/L364H/L407V/F450A/C503Q/T524S	+	+	+
607	A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
608	A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/R305M/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
609	A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L407V/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+

610	A39V/S209P/F450A/D470E/C503Q	-	-	-
611	A39V/S209P/L214Q/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K	-	-	-
612	A39V/S73K/N290G/H307G/L364H/L407V/F450A/T524S/C565P	-	+	-
613	A39V/T54K/G59R/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q/T524S/C565P	+	-	+
614	A39V/T54K/G59R/A91V/S98G/I285L/N290G/C503Q/Q521K/T524S/C565P	-	-	-
615	A39V/T54K/G59R/A91V/S98G/S209P/L287Q/N290V/S291G/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/Q521K/T524S	-	++	-
616	A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/H307G/L364H/L407V/F450A/C503Q/T524S	+	+	+
617	A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/R305M/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
618	A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/L364H/L407V/D470E/C503Q/T524S/C565P	+	+	+
619	A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q	+	+	+
620	A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
621	A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/N290G/R305M/H307G/L407V/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
622	A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/N290G/R305M/L407V/F450A/C503Q/T524S/C565P	+	+	+
623	A39V/T54K/G59R/S73K/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
624	A39V/T54K/G59R/S73K/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/C503Q/Q521K/C565P	+	+	+
625	A39V/T54K/G59R/S73K/S98G/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q	+	+	+
626	A39V/T54K/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/L364H/C503Q/T524S/C565P	+	+	+

627	A91V/A97T/S209P/I285L	-	-	-
628	A91V/S209P/L214Q/D470E/C565P	-	-	-
629	A91V/S209P/L214Q/F450A/Q521K/T524S/C565P	-	-	-
630	A91V/S209P/L214Q/L364H/L407V/F450A/D470E/C565P	-	-	-
631	A91V/S209P/L214Q/L407V/C503Q/C565P	-	-	-
632	A91V/S209P/L214Q/Q255L/I285L/N290G/H307G/F450A	-	-	-
633	A91V/S209P/L407V	-	-	-
634	C503Q	-	-	+
635	D55H/N290G/R305M/L364H/F450A/C503Q	-	-	-
636	F16S/A39V/D55E/G59R/C503Q/C565P	-	-	-
637	F16S/A39V/L214Q/L407V/C503Q/C565P	-	-	-
638	F16S/A39V/L214Q/Q255R/L407V/C565P	-	-	-
639	F16S/A39V/L214Q/T524S	-	-	-
640	F16S/A39V/L407V/F450A/D470E/Y475F	-	-	-
641	F16S/A39V/L47A/G59R/S73K/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/T524S/C565P	++	+	++
642	F16S/A39V/L47A/S73K/A91V/I285L/N290G/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
643	F16S/A39V/L47A/S73K/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	++	-	++
644	F16S/A39V/L47A/T54K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	++	+	++
645	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/L214Q/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	-	+
646	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/H307G/L364H/L407V/F450A/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
647	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
648	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/R305M/L364H/L407V/F450A/C503Q/T524S/C565P	+	++	+
649	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/L214Q/N290G/L364H/L407V/F450A/D470E/T524S/C565P	+	-	+

650	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P /I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/D47 0E/C503Q/Q521K/T524S	+	++	+
651	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P /L214Q/I285L/N290G/H307G/F450A/D470E/C50 3Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
652	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P /L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L40 7V/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
653	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P /L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L40 7V/F450A/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	++	+
654	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P /L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L40 7V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	++	++	+
655	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P /L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L40 7V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	++	+	+
656	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P /L214Q/I285L/N290G/R305M/L364H/L407V/C50 3Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
657	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P /L214Q/I285L/N290G/R305M/L364H/L407V/F45 0A/C503Q/Q521K	++	+	++
658	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P /L214Q/I285L/N290G/R305M/L364H/L407V/F45 0A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	++
659	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P /L214Q/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F45 0A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
660	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P /L214Q/N290G/R305M/L407V/F450A/D470E/C50 3Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
661	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S98G/ S209P/L214Q/I285L/N290G/H307G/L364H/L407 V/F450A/D470E/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
662	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S98G/ S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364 H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C5 65P	+	+	+
663	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/H307G/L364 H/L407V/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+

664	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/T524S	+	+	+
665	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/S98G/S209P/I285L/R305M/H307G/L407V/F450A/D470E/C503Q/T524S	+	+	+
666	F16S/A39V/L47A/T54K/S209P/H307G/C503Q	-	+	-
667	F16S/A39V/L47A/T54K/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
668	F16S/A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
669	F16S/A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/L407V/F450A/D470E/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
670	F16S/A39V/Q521K/C565P	-	-	-
671	F16S/A39V/S73K/L364H	-	-	-
672	F16S/A39V/T54K/G59R/A91V/I285L/N290G/R305M/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
673	F16S/A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K	+	+	+
674	F16S/A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
675	F16S/A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/L214Q/N290G/R305M/H307G/L407V/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	++	+
676	F16S/A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
677	F16S/A91V/I285L/N290G/L364H/L407V	-	-	-
678	F16S/A91V/L214Q/L407V/C503Q	-	-	-
679	F16S/A91V/S209P/L214Q	+	-	+
680	F16S/A91V/S209P/L214Q/L364H/F450A	-	-	-
681	F16S/C565P	-	-	-
682	F16S/F18H/A39V/A91V/C503Q/Q521K	-	-	-
683	F16S/F18H/A39V/G45D/L47A/T54K/G59R/S73K/S98G/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+

684	F16S/F18H/A39V/L47A/A91V/N290G/L407V/	-	-	-
685	F16S/F18H/A39V/L47A/G59R/L214Q/C503Q/C565P	-	-	-
686	F16S/F18H/A39V/L47A/G59R/S73K/A91V/L214Q/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K	+	+	+
687	F16S/F18H/A39V/L47A/S49I/T54K/G59R/S73K/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
688	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/A91V/L214Q/I285L/N290G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K	+	-	+
689	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/C503Q/Q521K/T524S	+	-	+
690	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/A91V/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
691	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/A91V/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
692	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
693	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/A91V/S98G/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
694	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K	+	+	+
695	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
696	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
697	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/C503Q	+	-	+
698	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+

699	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/ S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L407V/F450 A/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
700	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/ S209P/L214Q/I285L/N290G/H307G/L364H/L407 V/F450A/D470E/C503Q/T524S/C565P	+	+	+
701	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/ S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364 H/F450A/D470E/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
702	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/ S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364 H/L407V/F450A/C503Q/Q521K/T524S	++	++	+
703	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/ S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364 H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	++	++	+
704	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/ S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364 H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C5 65P	++	+	++
705	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/ S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364 H/L407V/F450A/D470E/Q521K/T524S/C565P	+	++	+
706	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/ S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/R313 H/L364H/F450A/C503Q/Q521K/T524S/C565P	-	-	-
707	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/ S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/L364H/L407 V/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
708	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/ S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/L364H/L407 V/F450A/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
709	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/ S98G/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A /D470E/C503Q/T524S/C565P	+	+	+
710	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/I285L /N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D47 0E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
711	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/S209P/L214Q/L40 7V/C503Q/T524S/C565P	-	-	-
712	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P /I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F45 0A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+

713	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K/C565P	+	+	+
714	F16S/F18H/A39V/L47A/T54K/S73K/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	++	+	++
715	F16S/F18H/A39V/R43G/N44K/G59R/S209P/C503Q/C565P	-	-	-
716	F16S/F18H/A39V/T54K/A91V/L214Q/I285L/N290G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	-	+
717	F16S/F18H/A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
718	F16S/F18H/A39V/T54K/G59R/S73K/L214Q/I285L/N290G/R305M/L364H/L407V/F450A/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
719	F16S/F18H/A39V/T54K/G59R/S73K/S209P/L214Q/I285L/N290G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
720	F16S/F18H/A39V/T54K/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
721	F16S/F18H/A39V/T54K/S73K/A91V/S209P/P210S/I285L/N290G/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
722	F16S/F18H/A39V/T54K/S73K/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
723	F16S/F18H/A39V/T54K/S73K/S98G/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
724	F16S/F18H/A91V/L214Q/L407V/Q521K/T524S/C565P	-	-	-
725	F16S/F18H/A91V/S209P/L407V/C503Q	-	-	-
726	F16S/F18H/C503Q	+	-	-
727	F16S/F18H/D55H/S209P/I285L/R305M	-	-	-
728	F16S/F18H/G59R/S209P/F450A/C503Q/T524S	-	-	-
729	F16S/F18H/I285L/N290G/D470E	-	-	-
730	F16S/F18H/L214Q/L407V/F450A/C503Q	-	-	-
731	F16S/F18H/L47A/G59R/I285L/L407V/F450A/C565P	-	-	-
732	F16S/F18H/L47A/I285L/L364H/C503Q/Q521K	-	-	-

733	F16S/F18H/L47A/L364H/L407V	-	-	+
734	F16S/F18H/L47A/S209P	-	-	-
735	F16S/F18H/L47A/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
736	F16S/F18H/L47A/S73K/L214Q/H307G/C503Q	-	-	-
737	F16S/F18H/L47A/S73K/N290G/L407V/F450A	-	-	-
738	F16S/F18H/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S98G/I285L/N290G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
739	F16S/F18H/L47A/T54K/G59R/S73K/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
740	F16S/F18H/L47A/T54K/G59R/S73K/S98G/S209P/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
741	F16S/F18H/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
742	F16S/F18H/S209P/F450A/C503Q	-	-	-
743	F16S/F18H/S23G/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	++	++	+
744	F16S/F18H/S73K/S209P/L214Q/F450A	+	-	-
745	F16S/F18H/T19I/L214Q/L407V	-	-	-
746	F16S/F18H/T54K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/H307G/L364H/L407V/F450A/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
747	F16S/F18H/T54K/G59R/N290G/L407V/F450A/C503Q/T524S	+	-	-
748	F16S/F18H/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/C503Q/Q521K	+	+	+
749	F16S/F18H/T54K/L407V	-	-	-
750	F16S/F18H/T54K/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/L407V/D561G	-	-	-
751	F16S/F450A/D470E/T524S	+	-	-
752	F16S/G59R/L364H/L407V/F450A/T524S	-	-	-
753	F16S/G59R/S73K/A91V/M370Q/C503Q/T524S	-	-	-
754	F16S/G59R/S73K/C503Q/C565P	-	-	-
755	F16S/G59R/S73K/L407V/F450A/C503Q/C565P	-	-	-
756	F16S/L214Q/D470E	-	-	-

757	F16S/L214Q/L364H/D470E	+	-	+
758	F16S/L214Q/L407V/C565P	-	-	-
759	F16S/L364H/C503Q/C565F	-	-	-
760	F16S/L407V/D470E	-	-	-
761	F16S/L407V/T524S/C565P	-	-	-
762	F16S/L47A/A91V/L214Q/H307G/L407V/D470E/C503Q/C565P	-	-	-
763	F16S/L47A/F450A/D470E/C565P	-	-	-
764	F16S/L47A/F450A/Q521K	-	-	-
765	F16S/L47A/G59R/L364H/L407V/P523T	-	-	-
766	F16S/L47A/G59R/T524S	-	-	-
767	F16S/L47A/L407V/F450A/T524S	-	-	-
768	F16S/L47A/S209P/L214Q/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K/C565P	-	-	-
769	F16S/L47A/S209P/L407V	-	-	-
770	F16S/L47A/S73K/A91V/L214Q/I285L/L407V/C565P	-	-	-
771	F16S/L47A/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
772	F16S/L47A/S73K/L214Q/R305M/L407V/C565P	-	-	-
773	F16S/L47A/T54K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L407V/F450A/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	++	+
774	F16S/L47A/T54K/A91V/S209P/D470E/T524S/C565P	-	-	-
775	F16S/L47A/T54K/G59R/A91V/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	-	-	-
776	F16S/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/H307G/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
777	F16S/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/F450A/D470E/C503Q/T524S/C565P	+	+	+
778	F16S/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
779	F16S/L47A/T54K/L214Q/N290G/L364H/L407V/C503Q/Q521K/T524S	+	-	+
780	F16S/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+

781	F16S/N290G/R305M/L364H/L407V/D470E/A479T	-	-	-
782	F16S/S209P/L214Q/L407V/C503Q/T524S	-	-	+
783	F16S/S22G/L214Q/C503Q/T524S/C565P	-	+	-
784	F16S/S73K/A91V/S209P/D470E	-	-	-
785	F16S/S73K/L214Q/T524S	+	-	-
786	F16S/T54K/G59R/A91V/S209P/L364H/L407V/F450A/Q521K	-	-	-
787	F16S/T54K/G59R/L214Q/C565P	-	-	-
788	F16S/T54K/G59R/S209P/L214Q/I285L/F450A	-	-	-
789	F16S/T54K/G59R/S73K/A91V/N290G/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
790	F16S/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/H307G/F450A/D470E/C503Q/T524S	+	+	+
791	F16S/T54K/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L407V/F450A/D470E/T524S	+	+	+
792	F16S/T54K/S73K/L407V/F450A/D470E/C503Q	+	-	-
793	F18H	-	-	-
794	F18H/A39V/D55N/L407V/D470E/C503Q	-	-	-
795	F18H/A39V/L214Q/L364H/F450A/D470E/Q521K/T524S	+	-	-
796	F18H/A39V/L214Q/L364H/L407V/D470E/C503Q	+	-	-
797	F18H/A39V/L47A/G59R/S73K/A91V/L214Q/I285L/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
798	F18H/A39V/L47A/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
799	F18H/A39V/L47A/G59R/S73K/S98G/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/T524S	+	+	+
800	F18H/A39V/L47A/S209P/L214Q/N290G/C565P	-	-	-
801	F18H/A39V/L47A/S73K/A91V/S209P/L214Q/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q	+	+	+
802	F18H/A39V/L47A/T54K/A91V/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L407V/F450A/C503Q/Q521K/T524S	+	++	+
803	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/A91V/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
804	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+

805	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/A91V/S209P/L214Q/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	++	+
806	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/A91V/S98G/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
807	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/L214Q/D470E/C503Q/Q521K/T524S	-	-	-
808	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L407V/F450A/C503Q/Q521K/T524S	+	-	+
809	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/C565P	+	+	+
810	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/T524S	+	-	+
811	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
812	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
813	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/T524S/C565P	+	++	+
814	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q	+	+	+
815	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
816	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/C503Q/Q521K/T524S	+	++	+
817	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	++	++
818	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
819	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P	+	+	+

	/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S			
820	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/T524S/C565P	+	+	+
821	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
822	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	++	-	+
823	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/N290G/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
824	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/N290G/R305M/H307G/L407V/C503Q/T524S/C565P	+	++	+
825	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/N290G/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K/C565P	+	-	+
826	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S98G/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/T524S	+	-	+
827	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S98G/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
828	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S98G/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/T524S	+	+	+
829	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/L214Q/I285L/N290G/R305M/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/T524S	++	-	++
830	F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/C503Q/Q521K/C565P	+	+	+
831	F18H/A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/G154S/S209P/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
832	F18H/A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+

833	F18H/A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/D470E/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
834	F18H/A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/C565P	+	-	+
835	F18H/A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
836	F18H/A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/F450A/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	++	+
837	F18H/A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	++	+	+
838	F18H/A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/R305M/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K	+	-	+
839	F18H/A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S98G/I285L/N290G/R305M/F450A/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
840	F18H/A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S98G/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
841	F18H/A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S98G/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
842	F18H/A39V/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/R305M/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	++
843	F18H/A39V/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
844	F18H/A39V/T54K/G59R/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
845	F18H/A39V/T54K/G59R/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/T524S	+	-	+
846	F18H/A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
847	F18H/A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C5	+	+	+

	03Q/Q521K/T524S/C565P			
848	F18H/A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/H307G/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
849	F18H/A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K	+	+	+
850	F18H/A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
851	F18H/A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/C503Q/Q521K/T524S	+	-	+
852	F18H/A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K	+	+	+
853	F18H/A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
854	F18H/A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
855	F18H/A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/S98G/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
856	F18H/A39V/T54K/G59R/S73K/A91V/S98G/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/Q521K/T524S	-	-	-
857	F18H/A39V/T54K/G59R/S73K/I285L/N290G/H307G/L364H/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
858	F18H/A39V/T54K/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q	+	+	+
859	F18H/A39V/T54K/S73K/A91V/S98G/I285L/N290G/R305M/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
860	F18H/A39V/T54K/S73K/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/C503Q/Q521K/T524S	+	++	+
861	F18H/A91V/L214Q	-	-	-
862	F18H/A91V/L214Q/L407V/T524S/C565P	-	-	-
863	F18H/A91V/L364H/F450A/C565P	-	-	-

864	F18H/A91V/L364H/L407V	-	-	-
865	F18H/A91V/L364H/L407V/F450A	-	-	-
866	F18H/A91V/L407V/C503Q	-	-	-
867	F18H/A91V/L407V/D470E/Q521K/T524S	-	-	-
868	F18H/A91V/S209P/L364H/L407V	-	-	-
869	F18H/F450A/C503Q	-	-	-
870	F18H/G59R/A91V/C565P	-	-	-
871	F18H/G59R/A91V/S209P/L214Q/L364H	-	-	-
872	F18H/G59R/C503Q/T524S	-	-	-
873	F18H/G59R/L407V/F450A	-	-	-
874	F18H/G59R/R305M/L364H/D470E/C565P	-	-	-
875	F18H/G59R/S209P	-	-	-
876	F18H/L214Q/L364H/L407V/D470E/C503Q/T524S	+	-	-
877	F18H/L214Q/L407V	+	-	+
878	F18H/L364H/C503Q	-	-	-
879	F18H/L364H/F450A/Q521K/T524S/C565P	+	-	-
880	F18H/L407V/F450A/C503Q/C565P	-	-	-
881	F18H/L47A/A97T/S98G/I182F/S209P/L364H/L407V/C503Q	-	-	-
882	F18H/L47A/F450A/D470E	-	-	-
883	F18H/L47A/G59R/A97T/S98G/L407V/C503Q	-	-	-
884	F18H/L47A/G59R/L214Q/F450A/Q521K	+	-	-
885	F18H/L47A/G59R/L214Q/I285L/C565P	-	-	-
886	F18H/L47A/G59R/L214Q/N362Y/L407V	-	-	-
887	F18H/L47A/L214Q/I285L/L287Q/N290G/D470E/C503Q	+	-	+
888	F18H/L47A/L214Q/L407V/T524S/C565P	-	-	-
889	F18H/L47A/L364H/C503Q	-	-	-
890	F18H/L47A/L364H/C503Q/C565P	-	-	-
891	F18H/L47A/L364H/D470E	-	-	-
892	F18H/L47A/Q521K/C565P	-	-	-
893	F18H/L47A/S209P/L407V/F450A/C503Q	-	-	-
894	F18H/L47A/S209P/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K	+	-	-
895	F18H/L47A/S209P/N290G/L364H/D470E	-	-	-
896	F18H/L47A/S73K/A91V/L364H/L407V/C503Q	-	-	-
897	F18H/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/H307G/L364H/L407V/Q485H/C503Q/T524S/C565P	+	+	+
898	F18H/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D4	+	+	+

	70E/C503Q/Q521K/T524S			
899	F18H/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/N290G/R305M/L364H/L407V/F450A/C503Q/T524S	+	+	+
900	F18H/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
901	F18H/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L407V/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
902	F18H/N290G/C565P	-	-	+
903	F18H/R43S/R305M/L364H/M416I/F450A	-	-	-
904	F18H/S209P	-	-	-
905	F18H/S209P/L364H/L407V/Q521K/C565P	-	-	-
906	F18H/S22G/A39V/A91V/L214Q/I285L/F450A/D470E/C503Q	-	-	-
907	F18H/S73K/A91V/I182F/L287P/L407V/F450A/C503Q	-	-	-
908	F18H/S73K/I285L/L364H/L407V/D470E	-	-	-
909	F18H/S73K/I285L/Q521K/T524S	-	-	-
910	F18H/S73K/L364H/F450A/C565P	-	-	-
911	F18H/S73K/L407V	-	-	-
912	F18H/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
913	F18H/T54K/S73K/L214Q/H307G	-	+	-
914	F18I	-	-	-
915	F450A/C503Q	-	-	-
916	F450A/T524S	+	-	+
917	G59R/A91V/L407V/F450A	-	-	-
918	G59R/C565P	-	-	-
919	G59R/F450A/C503Q	-	-	-
920	G59R/L214Q	-	-	-
921	G59R/L214Q/F450A/C503Q	+	-	-
922	G59R/L214Q/L364H/L407V/Q452R/C503Q	-	-	-
923	G59R/L407V/C503Q/Q521K/T524S	-	-	-
924	G59R/S209P/L364H/D470E/C503Q	-	-	-
925	G59R/S73K/N290G/L407V/C503Q/V554I	-	-	-
926	G59R/S73K/R305M/H307G/C503Q	-	-	-
927	L214Q/D470E/C503Q	-	-	-
928	L214Q/D470E/Q521K	-	-	-

929	L214Q/I285L/H307G/C503Q/C565P	-	-	-
930	L214Q/L407V/C503Q/C565P	-	-	-
931	L364H	-	-	-
932	L364H/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	-	-
933	L364H/L407V/C565P	-	-	-
934	L364H/L407V/K419N/F450A/D470E/Q521K/C565P	-	-	-
935	L407V	-	-	-
936	L407V/C503Q	-	-	-
937	L407V/F450A/C565P	-	-	-
938	L47A	-	-	-
939	L47A/D55N	-	-	-
940	L47A/G59R/A91V/C503Q/Q521K	-	-	-
941	L47A/G59R/A91V/L407V/D470E/C503Q/C565P	-	-	-
942	L47A/G59R/F450A/D470E/C503Q	-	-	-
943	L47A/G59R/S209P	-	-	-
944	L47A/I285L/N290G/L364H/C503Q/C565P	-	-	-
945	L47A/L214Q/L364H/C503Q	+	-	-
946	L47A/L214Q/L407V	-	-	-
947	L47A/L364H/L407V/D470E/Q521K/T524S	+	-	-
948	L47A/L364H/T524S/C565P	-	-	-
949	L47A/L407V	-	-	-
950	L47A/L407V/C565P	-	-	-
951	L47A/L407V/F450A/Q521K/T524S	-	-	-
952	L47A/R305M	-	-	-
953	L47A/S209P/C503Q/T524S/C565P	-	-	-
954	L47A/S209P/L214Q/R305M/H307G/L364H/C503Q/Q521K/T524S	-	+	-
955	L47A/S73K	-	-	-
956	L47A/S73K/A91V/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
957	L47A/S73K/A91V/L214Q	-	-	-
958	L47A/S73K/A91V/N290G/L407V/M416I/F450A/C503Q/Q521K/T524S	-	-	-
959	L47A/S73K/L214Q/L364H/L407V	+	-	+
960	L47A/S73K/L214Q/R305M/H307G/L364H/C503Q/C565P	-	+	-
961	L47A/S73K/L214Q/R305M/L407V/C503Q/C565P	-	+	-
962	L47A/S73K/L407V/D470E/C503Q	+	-	+
963	L47A/S73K/S209P/L364H/F450A/Q521K	-	-	-
964	L47A/T524S/C565P	-	-	-

965	L47A/T54K/A91V/A97T/S209P/L364H/C503Q/C565P	-	-	-
966	L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/N290G/Q311R/L364H/L407V/C503Q/Q521K/T524S/C565P	-	+	-
967	L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/I285L/R305M/H307G/L407V/D470E/Q521K/T524S	+	++	+
968	L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/C503Q/T524S/C565P	+	-	+
969	L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+
970	L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
971	L47A/T54K/G59R/S73K/S209P/I285L/N290G/L364H/L407V/L432P/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	-	+	-
972	L47A/T54K/G59R/S73K/S98G/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	-	+
973	L47A/T54K/S73K/A91V/I285L/N290G/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	-	+
974	L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
975	N290G/D470E	-	-	-
976	Q15H/F18H/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
977	R305M/L407V/Q521K	-	-	-
978	S209P	-	-	-
979	S209P/D470E	+	-	-
980	S209P/L214Q/H307G/L407V/F450A/C503Q	-	-	-
981	S209P/L214Q/L407V/F450A/D470E/C503Q	-	-	-
982	S209P/L214Q/R305M	-	-	-
983	S73K/A91V/L214Q/T524S/C565P	-	-	-
984	S73K/A91V/Q521K	-	-	-
985	T51I/L407V/D470E/C503Q/T524S	-	-	-
986	T524S	-	-	-
987	T54K/C503Q	-	-	-
988	T54K/F450A	-	-	-

989	T54K/G59R/A91V/S209P/L407V	-	-	-
990	T54K/G59R/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/L364H/L407V/D470E/C503Q/T524S/C565P	+	+	+
991	T54K/S209P/D470E/C503Q/T524S/C565P	-	-	-
992	T54K/S209P/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/C565P	+	+	+
993	T54K/S209P/L407V/F450A/D470E/C565P	-	-	-
994	T54K/S73K/A91V/L214Q/F450A/C503Q/Q521K/T524S	-	-	-
995	T54K/S73K/A91V/R305M/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K	-	-	-
996	T54K/S73K/F450A	+	-	-
997	A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	+	+
998	A39V/L47A/T54K/S73K/A91V/S209P/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/L407V/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S/C565P	+	++	+
999	A91V/L214Q	-	-	-
1000	F16S/A39V/L47A/T54K/G59R/S73K/A91V/L214Q/I285L/N290G/R305M/H307G/L364H/F450A/D470E/C503Q/Q521K/T524S	+	+	+

[0249] В приведенной выше таблице кратное улучшение (FIOP) активности сравнивают с SEQ ID NO:12 (вариантом #126) и определяют следующим образом: "-"=менее чем 0,2-кратная; "+"=более чем 0,2-кратная, но менее чем 1-кратная; "++"=более чем 1-кратная, но менее чем 1,25-кратная повышенная активность; и "+++"=более чем 1,25-кратная активность.

[0250] Хотя настоящее изобретение описано со ссылкой на конкретные варианты осуществления, можно осуществлять различные изменения и заменять эквиваленты для адаптации к конкретной ситуации, материалу, композиции, способу, стадии или стадиям способов, таким образом, достигая преимуществ изобретения без отклонения от объема формулы изобретения.

[0251] В США для всех целей каждую публикацию и патентный документ, процитированный в настоящем описании, включают в него в качестве ссылки так, как если бы каждая такая публикация или документ были конкретно и индивидуально указаны как включенные в настоящее описание в качестве ссылки. Цитирование публикаций и

патентных документов ни указывает на то, что любой такой документ относится к предшествующему уровню техники, ни является признанием его таковым в отношении его содержания или даты.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> КОДЕКСИС, ИНК.

ЧНГ, Чинпинг

ХЭЛЛОУЗ, Уилльям, Кейси

АГАРД, Николас, Дж.

АЛВИЗО, Оскар

ДЕЛЛАС, Никки

ХЕЙСМАН, Гьялт, В.

НИКОЛЗ, Джон, Джозеф

<120> СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ ФЕНИЛАЛАНИН-АММИАКЛИАЗЫ

<130> CX7-159USP1

<140> Не назначено

<141> 2017-02-13

<160> 12

<210> 1

<211> 1701

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> PAL *Anabaena variabilis*

<400> 1

```

atgaaaaccc tgagccaggc acagagcaaa accagcagcc agcagtttag ctttaccggc 60
aatagcagcg caaatgtgat tattggtaat cagaaactga ccatcaatga tggtgcacgt 120
gttgcccgta atggcaccct ggtagcctg accaataata cccgatattct gcagggtatt 180
caggccagct gtgattatat caataatgca gttgaaagcg gtgaaccgat ttatgggtgtt 240
accagcgggt ttggtggtat ggcaaatggt gcaattagcc gtgaacaggc aagcgaactg 300
cagaccaatc tggtttggtt tctgaaaacc ggtgcaggta ataaactgcc gctggcagat 360
gttcgtgcag caatgctgct gcgtgcaaat agccacatgc gtggtgcaag cgggtattcgt 420
ctggaactga ttaaacgcat ggaaatcttt ctgaatgccg gtgttaccct gtatgtttat 480
gaatttggtg gcattgggtgc cagcgggtgat ctggttccgc tgagctatat taccggtagc 540
ctgattggcc tggaccgag ctttaaagtt gattttaatg gcaaagaaat ggacgcaccg 600
accgcactgc gtcagctgaa tctgagtcgc ctgaccctgc tgccgaaaga aggtctggca 660
atgatgaatg gcaccagcgt tatgaccggt attgcagcaa attgtgttta tgataccag 720
attctgaccg caattgcaat ggggtgttcat gcactggata ttcaggcact gaatgggtaca 780
aatcagagct ttcattcgtt tatccataac agcaaaccgc atccgggtca gctgtgggca 840
gcagatcaga tgattagcct gctggccaat agccagctgg ttcgtgatga actggatgg 900
aaacatgatt atcgtgatca tgaactgac caggatcgtt atagcctgcg ttgtctgccg 960
cagtatctgg gtccgattgt tgatggtatt agccagattg ccaaacaaat cgaaattgag 1020
attaacagcg ttaccgataa cccgctgatt gatgttgata atcaggcaag ctatcatggt 1080
ggtaattttc tgggtcagta tgttggtatg ggtatggatc atctgcgcta ttatatcgg 1140
ctgctggcaa aacatctgga tgttcagatt gcactgctgg catcaccgga atttagcaat 1200
ggctctgcctc cgagtctgct gggtaatcgt gaacgtaaag ttaatatggg tctgaaagg 1260
ctgcagattt gcggtaatag cattatgccg ctgctgacct tttatggtaa tagtattgca 1320
gatcgttttc cgacccatgc cgaacagttt aaccagaata ttaacagcca gggttatacc 1380
agcgcaaccc tggcacgtcg tagcgttgat atttttcaga attatggtgc cattgccctg 1440
atgtttggtg ttcaggcagt tgatctgctg acctacaaaa aaaccgggtc ttatgatgca 1500
cgtgcctgtc tgtcaccggc aaccgaacgt ctgtatagcg cagttcgtca tggtgttggt 1560
cagaaaccga cctcagatcg tccgtatatt tggaatgata atgaacaggg tctggatgaa 1620
catattgcac gtattagtgc agatattgca gccggtggtg ttattgttca ggccgttcag 1680
gacattctgc cgtgtctgca t

```

<210> 2

<211> 567

<212> БЕЛОК

<213> PAL *Anabaena variabilis*

<220>

<223> PAL *Anabaena variabilis*

<400> 2

Met	Lys	Thr	Leu	Ser	Gln	Ala	Gln	Ser	Lys	Thr	Ser	Ser	Gln	Gln	Phe
1				5					10					15	
Ser	Phe	Thr	Gly	Asn	Ser	Ser	Ala	Asn	Val	Ile	Ile	Gly	Asn	Gln	Lys
			20					25					30		
Leu	Thr	Ile	Asn	Asp	Val	Ala	Arg	Val	Ala	Arg	Asn	Gly	Thr	Leu	Val
		35				40						45			
Ser	Leu	Thr	Asn	Asn	Thr	Asp	Ile	Leu	Gln	Gly	Ile	Gln	Ala	Ser	Cys
	50					55					60				
Asp	Tyr	Ile	Asn	Asn	Ala	Val	Glu	Ser	Gly	Glu	Pro	Ile	Tyr	Gly	Val
65					70					75					80
Thr	Ser	Gly	Phe	Gly	Gly	Met	Ala	Asn	Val	Ala	Ile	Ser	Arg	Glu	Gln
				85					90					95	
Ala	Ser	Glu	Leu	Gln	Thr	Asn	Leu	Val	Trp	Phe	Leu	Lys	Thr	Gly	Ala
			100					105					110		
Gly	Asn	Lys	Leu	Pro	Leu	Ala	Asp	Val	Arg	Ala	Ala	Met	Leu	Leu	Arg
		115					120					125			
Ala	Asn	Ser	His	Met	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Arg	Leu	Glu	Leu	Ile
	130					135					140				
Lys	Arg	Met	Glu	Ile	Phe	Leu	Asn	Ala	Gly	Val	Thr	Pro	Tyr	Val	Tyr
145					150					155					160
Glu	Phe	Gly	Ser	Ile	Gly	Ala	Ser	Gly	Asp	Leu	Val	Pro	Leu	Ser	Tyr
				165					170					175	
Ile	Thr	Gly	Ser	Leu	Ile	Gly	Leu	Asp	Pro	Ser	Phe	Lys	Val	Asp	Phe
			180					185					190		
Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Asp	Ala	Pro	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Leu	Asn	Leu
		195					200					205			
Ser	Pro	Leu	Thr	Leu	Leu	Pro	Lys	Glu	Gly	Leu	Ala	Met	Met	Asn	Gly
	210					215					220				
Thr	Ser	Val	Met	Thr	Gly	Ile	Ala	Ala	Asn	Cys	Val	Tyr	Asp	Thr	Gln
225					230					235					240
Ile	Leu	Thr	Ala	Ile	Ala	Met	Gly	Val	His	Ala	Leu	Asp	Ile	Gln	Ala
				245					250					255	
Leu	Asn	Gly	Thr	Asn	Gln	Ser	Phe	His	Pro	Phe	Ile	His	Asn	Ser	Lys
		260					265						270		
Pro	His	Pro	Gly	Gln	Leu	Trp	Ala	Ala	Asp	Gln	Met	Ile	Ser	Leu	Leu
		275					280					285			
Ala	Asn	Ser	Gln	Leu	Val	Arg	Asp	Glu	Leu	Asp	Gly	Lys	His	Asp	Tyr
	290					295					300				
Arg	Asp	His	Glu	Leu	Ile	Gln	Asp	Arg	Tyr	Ser	Leu	Arg	Cys	Leu	Pro
305					310					315					320
Gln	Tyr	Leu	Gly	Pro	Ile	Val	Asp	Gly	Ile	Ser	Gln	Ile	Ala	Lys	Gln
				325					330					335	
Ile	Glu	Ile	Glu	Ile	Asn	Ser	Val	Thr	Asp	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Val
				340					345					350	
Asp	Asn	Gln	Ala	Ser	Tyr	His	Gly	Gly	Asn	Phe	Leu	Gly	Gln	Tyr	Val
		355					360					365			
Gly	Met	Gly	Met	Asp	His	Leu	Arg	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys
	370					375					380				
His	Leu	Asp	Val	Gln	Ile	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Pro	Glu	Phe	Ser	Asn
385					390					395					400
Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Leu	Leu	Gly	Asn	Arg	Glu	Arg	Lys	Val	Asn	Met
				405					410					415	
Gly	Leu	Lys	Gly	Leu	Gln	Ile	Cys	Gly	Asn	Ser	Ile	Met	Pro	Leu	Leu
			420					425					430		
Thr	Phe	Tyr	Gly	Asn	Ser	Ile	Ala	Asp	Arg	Phe	Pro	Thr	His	Ala	Glu
		435					440					445			
Gln	Phe	Asn	Gln	Asn	Ile	Asn	Ser	Gln	Gly	Tyr	Thr	Ser	Ala	Thr	Leu
	450					455					460				

Ala	Arg	Arg	Ser	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Asn	Tyr	Val	Ala	Ile	Ala	Leu
465					470					475					480
Met	Phe	Gly	Val	Gln	Ala	Val	Asp	Leu	Arg	Thr	Tyr	Lys	Lys	Thr	Gly
				485					490						495
His	Tyr	Asp	Ala	Arg	Ala	Cys	Leu	Ser	Pro	Ala	Thr	Glu	Arg	Leu	Tyr
			500					505					510		
Ser	Ala	Val	Arg	His	Val	Val	Gly	Gln	Lys	Pro	Thr	Ser	Asp	Arg	Pro
		515					520					525			
Tyr	Ile	Trp	Asn	Asp	Asn	Glu	Gln	Gly	Leu	Asp	Glu	His	Ile	Ala	Arg
	530					535					540				
Ile	Ser	Ala	Asp	Ile	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ile	Val	Gln	Ala	Val	Gln
545					550					555					560
Asp	Ile	Leu	Pro	Cys	Leu	His									
				565											

<210> 3

<211> 1701

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант PAL *Anabaena variabilis*

<400> 3

atgaaaaccc	tgagtcaggc	acagagcaaa	accagcagcc	agcagtttag	ccataccggc	60
aatagcagcg	caaattgtgat	tattggtaat	cagaaactga	ccatcaatga	tgttgtagct	120
gttgcccgta	atggcaccgc	ggttagcctg	accaataata	aagatattct	gcagcgattt	180
caggccagct	gtgattatat	caataatgca	gttgaaaaag	gtgaaccgat	ttatgggtgtt	240
accagcgggt	ttgggtggtat	ggcaaatgtt	gtaattagcc	gtgaacaggc	aagcgaactg	300
cagaccaatc	tggtttggtt	tctgaaaacc	ggtgcaggta	ataaactgcc	gctggcagat	360
gttcgtgcag	caatgctgct	gcgtgcaaat	agccacatgc	gtggtgcaag	cgggtattcgt	420
ctggaactga	ttaaacgcat	ggaaatcttt	ctgaatgccg	gtgttacccc	gtatgtttat	480
gaatttggtg	gcattgggtg	cagcgggtgat	ctgggtccgc	tgagctatat	taccggtagc	540
ctgattggcc	tggacccgag	ctttaaaagt	gattttaatg	gcaaagaaat	ggacgcaccg	600
accgcactgc	gtcagctgaa	tctgagtccg	ctgaccctgc	agccgaaaga	aggtctggca	660
atgatgaatg	gcaccagcgt	tatgaccggg	attgcagcaa	attgtgttta	tgatacccgag	720
attctgaccg	caattgcaat	gggtgttcat	gcactggata	ttcaggcact	gaatgggtaca	780
aatcagagct	ttcatccggt	tatccataac	agcaaaccgc	atccgggtca	gctgtgggca	840
gcagatcaga	tgattagcct	gctggccggg	agccagctgg	ttcgtgatga	actggatggg	900
aaacatgatt	atatggatgg	tgaactgac	caggatcggt	atagcctgcg	ttgtctgccg	960
cagtatctgg	gtccgattgt	tgatgggtat	agccagattg	ccaaacaaat	cgaaattgag	1020
attaacagcg	ttaccgataa	cccgcgtgatt	gatgttgata	atcaggcaag	ctatcatggg	1080
ggtaattttc	tgggtcagta	tgttgggtat	ggatgggac	atctgcgcta	ttatatcggt	1140
ctgctggcaa	aacatctgga	tgttcagatt	gcactgctgg	catcacggga	atttagcaat	1200
ggctctgcctc	cgagtctggg	gggtaatcgt	gaacgtaaag	ttaatatggg	tctgaaagggt	1260
ctgcagattt	gcggtaatag	cattatgccg	ctgctgacct	tttatggtaa	tagtattgca	1320
gatcgttttc	cgacccatgc	cgaacagttt	aaccagaata	ttaacagcca	gggttatacc	1380
agcgcaaccc	tggcacgtcg	tagcgttgat	atttttcaga	attatgttgc	cattgccctg	1440
atgtttggtg	ttcaggcagt	tgatctgcgt	acctacaaaa	aaaccgggtca	ttatgatgca	1500
cgtgcccgag	tgtcaccggc	aaccgaacgt	ctgtatagcg	cagttcgtca	tggtgttggt	1560
aaaaaaccca	gctcagatcg	tccgtatatt	tggaatgata	atgaacaggg	tctggatgaa	1620
catattgcac	gtattagtgc	agatattgca	gccggtgggtg	ttattgttca	ggccgttcag	1680
gacattctgc	cgccgctgca	t				1701

<210> 4

<211> 567

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант PAL *Anabaena variabilis*

<400> 4

Met	Lys	Thr	Leu	Ser	Gln	Ala	Gln	Ser	Lys	Thr	Ser	Ser	Gln	Gln	Phe
1			5						10				15		
Ser	His	Thr	Gly	Asn	Ser	Ser	Ala	Asn	Val	Ile	Ile	Gly	Asn	Gln	Lys
			20					25					30		
Leu	Thr	Ile	Asn	Asp	Val	Val	Arg	Val	Ala	Arg	Asn	Gly	Thr	Ala	Val
			35				40					45			
Ser	Leu	Thr	Asn	Asn	Lys	Asp	Ile	Leu	Gln	Arg	Ile	Gln	Ala	Ser	Cys
	50					55					60				
Asp	Tyr	Ile	Asn	Asn	Ala	Val	Glu	Lys	Gly	Glu	Pro	Ile	Tyr	Gly	Val
65					70					75					80
Thr	Ser	Gly	Phe	Gly	Gly	Met	Ala	Asn	Val	Val	Ile	Ser	Arg	Glu	Gln
				85					90					95	
Ala	Ser	Glu	Leu	Gln	Thr	Asn	Leu	Val	Trp	Phe	Leu	Lys	Thr	Gly	Ala
			100					105					110		
Gly	Asn	Lys	Leu	Pro	Leu	Ala	Asp	Val	Arg	Ala	Ala	Met	Leu	Leu	Arg
		115					120					125			
Ala	Asn	Ser	His	Met	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Arg	Leu	Glu	Leu	Ile
	130					135					140				
Lys	Arg	Met	Glu	Ile	Phe	Leu	Asn	Ala	Gly	Val	Thr	Pro	Tyr	Val	Tyr
145					150					155					160
Glu	Phe	Gly	Ser	Ile	Gly	Ala	Ser	Gly	Asp	Leu	Val	Pro	Leu	Ser	Tyr
				165					170					175	
Ile	Thr	Gly	Ser	Leu	Ile	Gly	Leu	Asp	Pro	Ser	Phe	Lys	Val	Asp	Phe
			180					185					190		
Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Asp	Ala	Pro	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Leu	Asn	Leu
		195					200					205			
Ser	Pro	Leu	Thr	Leu	Gln	Pro	Lys	Glu	Gly	Leu	Ala	Met	Met	Asn	Gly
	210					215					220				
Thr	Ser	Val	Met	Thr	Gly	Ile	Ala	Ala	Asn	Cys	Val	Tyr	Asp	Thr	Gln
225					230					235					240
Ile	Leu	Thr	Ala	Ile	Ala	Met	Gly	Val	His	Ala	Leu	Asp	Ile	Gln	Ala
				245					250					255	
Leu	Asn	Gly	Thr	Asn	Gln	Ser	Phe	His	Pro	Phe	Ile	His	Asn	Ser	Lys
			260					265					270		
Pro	His	Pro	Gly	Gln	Leu	Trp	Ala	Ala	Asp	Gln	Met	Ile	Ser	Leu	Leu
		275					280					285			
Ala	Gly	Ser	Gln	Leu	Val	Arg	Asp	Glu	Leu	Asp	Gly	Lys	His	Asp	Tyr
	290					295					300				
Met	Asp	Gly	Glu	Leu	Ile	Gln	Asp	Arg	Tyr	Ser	Leu	Arg	Cys	Leu	Pro
305					310					315					320
Gln	Tyr	Leu	Gly	Pro	Ile	Val	Asp	Gly	Ile	Ser	Gln	Ile	Ala	Lys	Gln
				325					330					335	
Ile	Glu	Ile	Glu	Ile	Asn	Ser	Val	Thr	Asp	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Val
			340					345					350		
Asp	Asn	Gln	Ala	Ser	Tyr	His	Gly	Gly	Asn	Phe	Leu	Gly	Gln	Tyr	Val
		355					360					365			
Gly	Met	Gly	Met	Asp	His	Leu	Arg	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys
	370					375					380				
His	Leu	Asp	Val	Gln	Ile	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Pro	Glu	Phe	Ser	Asn
385					390					395					400
Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Leu	Val	Gly	Asn	Arg	Glu	Arg	Lys	Val	Asn	Met
				405					410					415	
Gly	Leu	Lys	Gly	Leu	Gln	Ile	Cys	Gly	Asn	Ser	Ile	Met	Pro	Leu	Leu
			420					425					430		
Thr	Phe	Tyr	Gly	Asn	Ser	Ile	Ala	Asp	Arg	Phe	Pro	Thr	His	Ala	Glu
		435					440						445		
Gln	Phe	Asn	Gln	Asn	Ile	Asn	Ser	Gln	Gly	Tyr	Thr	Ser	Ala	Thr	Leu
	450					455					460				
Ala	Arg	Arg	Ser	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Asn	Tyr	Val	Ala	Ile	Ala	Leu
465					470					475					480
Met	Phe	Gly	Val	Gln	Ala	Val	Asp	Leu	Arg	Thr	Tyr	Lys	Lys	Thr	Gly
				485					490					495	
His	Tyr	Asp	Ala	Arg	Ala	Gln	Leu	Ser	Pro	Ala	Thr	Glu	Arg	Leu	Tyr

Leu	Thr	Ile	Asn	Asp	Val	Val	Arg	Val	Ala	Arg	Asn	Gly	Thr	Ala	Val
		35					40					45			
Ser	Leu	Thr	Asn	Asn	Lys	Asp	Ile	Leu	Gln	Arg	Ile	Gln	Ala	Ser	Cys
	50					55					60				
Asp	Tyr	Ile	Asn	Asn	Ala	Val	Glu	Lys	Gly	Glu	Pro	Ile	Tyr	Gly	Val
	65				70					75					80
Thr	Ser	Gly	Phe	Gly	Gly	Met	Ala	Asn	Val	Val	Ile	Ser	Arg	Glu	Gln
				85					90					95	
Ala	Ser	Glu	Leu	Gln	Thr	Asn	Leu	Val	Trp	Phe	Leu	Lys	Thr	Gly	Ala
			100					105					110		
Gly	Asn	Lys	Leu	Pro	Leu	Ala	Asp	Val	Arg	Ala	Ala	Met	Leu	Leu	Arg
		115					120					125			
Ala	Asn	Ser	His	Met	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Arg	Leu	Glu	Leu	Ile
	130					135					140				
Lys	Arg	Met	Glu	Ile	Phe	Leu	Asn	Ala	Gly	Val	Thr	Pro	Tyr	Val	Tyr
	145				150					155					160
Glu	Phe	Gly	Ser	Ile	Gly	Ala	Ser	Gly	Asp	Leu	Val	Pro	Leu	Ser	Tyr
				165					170					175	
Ile	Thr	Gly	Ser	Leu	Ile	Gly	Leu	Asp	Pro	Ser	Phe	Lys	Val	Asp	Phe
			180					185					190		
Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Asp	Ala	Pro	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Leu	Asn	Leu
		195					200					205			
Ser	Pro	Leu	Thr	Leu	Gln	Pro	Lys	Glu	Gly	Leu	Ala	Met	Met	Asn	Gly
	210					215					220				
Thr	Ser	Val	Met	Thr	Gly	Ile	Ala	Ala	Asn	Cys	Val	Tyr	Asp	Thr	Gln
	225				230					235					240
Ile	Leu	Thr	Ala	Ile	Ala	Met	Gly	Val	His	Ala	Leu	Asp	Ile	Gln	Ala
				245					250					255	
Leu	Asn	Gly	Thr	Asn	Gln	Ser	Phe	His	Pro	Phe	Ile	His	Asn	Ser	Lys
			260					265					270		
Pro	His	Pro	Gly	Gln	Leu	Trp	Ala	Ala	Asp	Gln	Met	Ile	Ser	Leu	Leu
		275					280					285			
Ala	Gly	Ser	Gln	Leu	Val	Arg	Asp	Glu	Leu	Asp	Gly	Lys	His	Asp	Tyr
	290					295					300				
Met	Asp	Gly	Glu	Leu	Ile	Gln	Asp	Arg	Tyr	Ser	Leu	Arg	Cys	Leu	Pro
	305				310					315					320
Gln	Tyr	Leu	Gly	Pro	Ile	Val	Asp	Gly	Ile	Ser	Gln	Ile	Ala	Lys	Gln
				325					330					335	
Ile	Glu	Ile	Glu	Ile	Asn	Ser	Val	Thr	Asp	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Val
			340					345					350		
Asp	Asn	Gln	Ala	Ser	Tyr	His	Gly	Asn	Phe	Leu	Gly	Gln	Tyr	Val	
		355					360				365				
Gly	Met	Gly	Met	Asp	His	Leu	Arg	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys
	370					375					380				
His	Leu	Asp	Val	Gln	Ile	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Pro	Glu	Phe	Ser	Asn
	385				390					395					400
Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Leu	Val	Gly	Asn	Arg	Glu	Arg	Lys	Val	Asn	Met
				405					410					415	
Gly	Leu	Lys	Gly	Leu	Gln	Ile	Cys	Gly	Asn	Ser	Ile	Met	Pro	Leu	Leu
			420					425					430		
Thr	Phe	Tyr	Gly	Asn	Ser	Ile	Ala	Asp	Arg	Phe	Pro	Thr	His	Ala	Glu
		435					440					445			
Gln	Ala	Asn	Gln	Asn	Ile	Asn	Ser	Gln	Gly	Tyr	Thr	Ser	Ala	Thr	Leu
	450					455					460				
Ala	Arg	Arg	Ser	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Asn	Tyr	Val	Ala	Ile	Ala	Leu
	465				470					475					480
Met	Phe	Gly	Val	Gln	Ala	Val	Asp	Leu	Arg	Thr	Tyr	Lys	Lys	Thr	Gly
				485					490					495	
His	Tyr	Asp	Ala	Arg	Ala	Gln	Leu	Ser	Pro	Ala	Thr	Glu	Arg	Leu	Tyr
			500					505				510			
Ser	Ala	Val	Arg	His	Val	Val	Gly	Lys	Lys	Pro	Ser	Ser	Asp	Arg	Pro
		515					520					525			
Tyr	Ile	Trp	Asn	Asp	Asn	Glu	Gln	Gly	Leu	Asp	Glu	His	Ile	Ala	Arg
	530					535					540				

Ile Ser Ala Asp Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Val Gln Ala Val Gln
 545 550 555 560
 Asp Ile Leu Pro Pro Leu His
 565

<210> 7
 <211> 1701
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант PAL *Anabaena variabilis*

<400> 7
 atgaaaaccc tgagtcaggg acagagcaaa accagcagcc agcagtctag ccataccggc 60
 aatagcagcg caaatgtgat tattggtaat cagaaactga ccatcaatga tgttgtagct 120
 gttgcccgtg atggcaccgc ggtagcctg accaataata aagatattct gcagcgtatt 180
 caggccagct gtgattatat caataatgca gttgaaaaag gtgaaccgat ttatgggtgtt 240
 accagcgggt ttgggtggtat ggcaaagtgt gtaattagcc gtgaacaggc aagcgaactg 300
 cagaccaatc tggtttggtt tctgaaaacc ggtgcaggta ataaactgcc gctggcagat 360
 gttcgtgcag caatgctgct gcgtgcaaat agccacatgc gtggtgcaag cgggtattcgt 420
 ctggaactga ttaaagcgtt ggaaatcttt ctgaatgccg gtgttaccct gtatgtttat 480
 gaatttggtg gcattgggtgc cagcgggtgat ctgggtccgc tgagctatat taccggtagc 540
 ctgattggcc tggaccgcag ctttaaagtt gattttaatg gcaaagaaat ggacgcaccg 600
 accgcactgc gtcagctgaa tctgagtcgc ctgaccctgc agccgaaaga aggtctggca 660
 atgatgaatg gcaccagcgt tatgaccggt attgcagcaa attgtgttta tgataccag 720
 attctgaccg caattgcaat ggggtgttcat gcaactggata ttcaggcact gaatgggtaca 780
 aatcagagct ttcattcgtt tatccataac agcaaaccgc atccgggtca gctgtgggca 840
 gcagatcaga tgattagcct gctggccggg agccagctgg ttcgtgatga actggatggg 900
 aaacatgatt atatggatgg tgaactgac caggatcggt atagcctgcg ttgtctgccg 960
 cagtatctgg gtccgattgt tgatgggtatt agccagattg ccaaacaaat cgaaattgag 1020
 attaacagcg ttaccgataa cccgctgatt gatgttgata atcaggcaag ctatcatggt 1080
 ggtaattttc tgggtcagta tgttggtatg ggtatggatc atctgcgcta ttatatcggt 1140
 ctgctggcaa aacatctgga tgttcagatt gcactgctgg catcaccgga atttagcaat 1200
 ggtctgcctc cgagtctggt gggtaatcgt gaacgtaaag ttaatatggg tctgaaagg 1260
 ctgcagattt gcggtaatag cattatgccg ctgctgacct tttatggtaa tagtattgca 1320
 gatcgttttc cgacccatgc cgaacaggca aaccagaata ttaacagcca gggttatacc 1380
 agcgcaacc tggcacgtcg tagcgttgat atttttcaga attatgttgc cattgccctg 1440
 atgtttggtg ttcaggcagt tgatctgcgt acctacaaaa aaaccgggtca ttatgatgca 1500
 cgtgcccagc tgtaaccggc aaccgaacgt ctgtatagcg cagttcgtca tgttggtggt 1560
 aaaaaaccga gtcagatcg tccgtatatt tggaatgata atgaacaggg tctggatgaa 1620
 catattgcac gtattagtgc agatattgca gccggtgggt ttattgttca ggccggtcag 1680
 gacattctgc cgccgctgca t 1701

<210> 8
 <211> 567
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Вариант PAL *Anabaena variabilis*

<400> 8
 Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Ser
 1 5 10 15
 Ser His Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys
 20 25 30
 Leu Thr Ile Asn Asp Val Val Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Ala Val
 35 40 45
 Ser Leu Thr Asn Asn Lys Asp Ile Leu Gln Arg Ile Gln Ala Ser Cys
 50 55 60
 Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Lys Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val

<210> 9
<211> 1701
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант PAL *Anabaena variabilis*

<400> 9

```
atgaaaaccc tgagtcaggc acagagcaaa accagcagcc agcagtcctag ccataccggc 60
aatagcagcg caaatgtgat tattggtaat cagaaactga ccatcaatga tgttgtagct 120
gttgcccgta atggcaccgc ggtagcctg accaataata aagatattct gcagcgtatt 180
caggccagct gtgattatat caataatgca gttgaaaaag gtgaaccgat ttatgggtgtt 240
accagcgggt ttgggtggat ggcaaatgtt gtaattagcc gtgaacaggc aagcgaactg 300
cagaccaatc tggtttggtt tctgaaaacc ggtgcaggta ataaactgcc gctggcagat 360
gttcgtgcag caatgctgct gctgcaaat agccacatgc gtggtgcaag cgggtattcgt 420
ctggaactga ttaaacgcat ggaaatcttt ctgaatgccg gtgttacccc gtatgtttat 480
gaatttggtg gcattgggtg cagcgggtgat ctggttccgc tgagctatat taccggtagc 540
ctgattggcc tggaccgag ctttaaagtt gattttaatg gcaaagaaat ggacgcaccg 600
accgcactga gacagctgaa tctgccgccg ctgaccctgc agccgaaaga aggtctggca 660
atgatgaatg gcaccagcgt tatgaccggg attgcagcaa attgtgttta tgataccag 720
attctgaccg caattgcaat ggggtgttcat gactggata ttcaggcact gaatgggtaca 780
aatcagagct ttcattccgtt tatccataac agcaaaccgc atccgggtca gctgtgggca 840
gcagatcaga tgctaagcct gctggccggg agccagctgg ttcgtgatga actggatggg 900
aaacatgatt atatggatgg tgaactgata caggatcgtt atagcctgcg ttgtctgccg 960
cagtatctgg gtccgattgt tgatgggtatt agccagattg ccaaacaaat cgaaattgag 1020
attaacagcg ttaccgataa cccgctgatt gatgttgata atcaggcaag ctatcatggg 1080
ggtaattttc atgggtcagta tgttggtatg ggtatggatc atctgcgcta ttatatcggt 1140
ctgctggcaa aacatctgga tgttcagatt gactgctgg catcaccgga atttagcaat 1200
ggctctgcctc cgagtctggg gggtaatcgt gaacgtaaag ttaatatggg tctgaaagg 1260
ctgcagattt gcggtaatag cattatgccg ctgctgacct tttatggtaa tagtattgca 1320
gatcgttttc cgacccatgc cgaacaggca aaccagaata ttaacagcca gggttatacc 1380
agcgcaaccc tggcacgtcg tagcgttgaa atttttcaga attatgttgc cattgccctg 1440
atgtttggtg ttcaggcagt tgatctgctg acctacaaaa aaaccgggtca ttatgatgca 1500
cgtgcccagc tgtcaccggc aaccgaacgt ctgtatagcg cagttcgtca tgttggtgg 1560
aaaaaaccca gctcagatcg tccgtatatt tggaatgata atgaacaggg tctggatgaa 1620
catattgcac gtattagtgc agatattgca gccggtgggt ttattgttca ggccgttcag 1680
gacattctgc cgccgctgca t 1701
```

<210> 10
<211> 567
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант PAL *Anabaena variabilis*

<400> 10

```
Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Ser
1      5      10      15
Ser His Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys
20      25      30
Leu Thr Ile Asn Asp Val Val Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Ala Val
35      40      45
Ser Leu Thr Asn Asn Lys Asp Ile Leu Gln Arg Ile Gln Ala Ser Cys
50      55      60
Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Lys Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val
65      70      75      80
Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Val Ile Ser Arg Glu Gln
85      90      95
Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala
100      105      110
```

Gly	Asn	Lys	Leu	Pro	Leu	Ala	Asp	Val	Arg	Ala	Ala	Met	Leu	Leu	Arg
		115					120					125			
Ala	Asn	Ser	His	Met	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Ile	Arg	Leu	Glu	Leu	Ile
		130				135					140				
Lys	Arg	Met	Glu	Ile	Phe	Leu	Asn	Ala	Gly	Val	Thr	Pro	Tyr	Val	Tyr
145					150					155					160
Glu	Phe	Gly	Ser	Ile	Gly	Ala	Ser	Gly	Asp	Leu	Val	Pro	Leu	Ser	Tyr
			165						170					175	
Ile	Thr	Gly	Ser	Leu	Ile	Gly	Leu	Asp	Pro	Ser	Phe	Lys	Val	Asp	Phe
			180					185					190		
Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Asp	Ala	Pro	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Leu	Asn	Leu
		195					200					205			
Pro	Pro	Leu	Thr	Leu	Gln	Pro	Lys	Glu	Gly	Leu	Ala	Met	Met	Asn	Gly
		210				215					220				
Thr	Ser	Val	Met	Thr	Gly	Ile	Ala	Ala	Asn	Cys	Val	Tyr	Asp	Thr	Gln
225					230					235					240
Ile	Leu	Thr	Ala	Ile	Ala	Met	Gly	Val	His	Ala	Leu	Asp	Ile	Gln	Ala
			245						250					255	
Leu	Asn	Gly	Thr	Asn	Gln	Ser	Phe	His	Pro	Phe	Ile	His	Asn	Ser	Lys
		260					265						270		
Pro	His	Pro	Gly	Gln	Leu	Trp	Ala	Ala	Asp	Gln	Met	Leu	Ser	Leu	Leu
		275					280					285			
Ala	Gly	Ser	Gln	Leu	Val	Arg	Asp	Glu	Leu	Asp	Gly	Lys	His	Asp	Tyr
	290					295				300					
Met	Asp	Gly	Glu	Leu	Ile	Gln	Asp	Arg	Tyr	Ser	Leu	Arg	Cys	Leu	Pro
305					310					315					320
Gln	Tyr	Leu	Gly	Pro	Ile	Val	Asp	Gly	Ile	Ser	Gln	Ile	Ala	Lys	Gln
			325						330					335	
Ile	Glu	Ile	Glu	Ile	Asn	Ser	Val	Thr	Asp	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Val
			340					345					350		
Asp	Asn	Gln	Ala	Ser	Tyr	His	Gly	Gly	Asn	Phe	His	Gly	Gln	Tyr	Val
		355					360					365			
Gly	Met	Gly	Met	Asp	His	Leu	Arg	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys
	370				375					380					
His	Leu	Asp	Val	Gln	Ile	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Pro	Glu	Phe	Ser	Asn
385					390					395					400
Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Leu	Val	Gly	Asn	Arg	Glu	Arg	Lys	Val	Asn	Met
			405						410					415	
Gly	Leu	Lys	Gly	Leu	Gln	Ile	Cys	Gly	Asn	Ser	Ile	Met	Pro	Leu	Leu
		420						425					430		
Thr	Phe	Tyr	Gly	Asn	Ser	Ile	Ala	Asp	Arg	Phe	Pro	Thr	His	Ala	Glu
		435					440					445			
Gln	Ala	Asn	Gln	Asn	Ile	Asn	Ser	Gln	Gly	Tyr	Thr	Ser	Ala	Thr	Leu
	450					455					460				
Ala	Arg	Arg	Ser	Val	Glu	Ile	Phe	Gln	Asn	Tyr	Val	Ala	Ile	Ala	Leu
465					470					475					480
Met	Phe	Gly	Val	Gln	Ala	Val	Asp	Leu	Arg	Thr	Tyr	Lys	Lys	Thr	Gly
			485					490						495	
His	Tyr	Asp	Ala	Arg	Ala	Gln	Leu	Ser	Pro	Ala	Thr	Glu	Arg	Leu	Tyr
		500						505					510		
Ser	Ala	Val	Arg	His	Val	Val	Gly	Lys	Lys	Pro	Ser	Ser	Asp	Arg	Pro
		515					520					525			
Tyr	Ile	Trp	Asn	Asp	Asn	Glu	Gln	Gly	Leu	Asp	Glu	His	Ile	Ala	Arg
	530				535					540					
Ile	Ser	Ala	Asp	Ile	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ile	Val	Gln	Ala	Val	Gln
545					550					555					560
Asp	Ile	Leu	Pro	Pro	Leu	His									
			565												

<210> 11

<211> 1701

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант PAL *Anabaena variabilis*

<400> 11

```
atgaaaaccc tgagtcaggc tcagagcaaa accagcagcc agcagtcctag ccataccggc 60
aatagcagcg caaatgtgat tattggtaat cagaaactga ccatcaatga tgttgtacgt 120
gttgcccgtg atggcaccgc ggtagcctg accaataata aagatattct gcagcgtatt 180
caggccagct gtgattatat caataatgca gttgaaaaag gtgaaccgat ttatggtggt 240
accagcgggt ttggtggtat ggcaaatggt gtaattagcc gtgaacaggc aagcgaactg 300
cagaccaatc tggtttggtt tctgaaaacc ggtgcaggta ataaactgcc gctggcagat 360
gttcgtgcag caatgctgct gcgtgcaa atgacacatgc gtggtgcaag cgggtattcgt 420
ctggaactga ttaaacgcat ggaaatcttt ctgaatgccg gtgttaccct gtatgtttat 480
gaatttggtg gcattgggtg cagcgggtgat ctggttccgc tgagctatat taccggtagc 540
ctgattggcc tggaccgcag ctttaaagtt gattttaatg gcaaagaaat ggacgcaccg 600
accgactga gacagctgaa tctgccgccg ctgaccctgc agccgaaaga aggtctggca 660
atgatgaatg gcaccagcgt tatgaccggg attgcagcaa attgtgttta tgataccag 720
attctgaccg caattgcaat ggggtgttcat gactggata ttcaggcact gaatggtaca 780
aatcagagct ttcacccgtt tatccataac agcaaaccgc atccgggtca gctgtgggca 840
gcagatcaga tgctaagcct gctggccggg agccagctgg ttcgtgatga actggatggt 900
aaacatgatt atatggatgg tgaactgata caggatcgtt atagcctgcg ttgtctgccg 960
cagtatctgg gtccgattgt tgatggtatt agccagattg ccaaacaaat cgaaattgag 1020
attaacagcg ttaccgataa cccgctgatt gatgttgata atcaggcaag ctatcatggt 1080
ggtaattttc atggtcagta tgttggtatg ggtatggatc atctgcgcta ttatcctggt 1140
ctgctggcaa aacatctgga tgttcagatt gcaatgctgg catcaccgga atttagcaat 1200
ggctctgcctc cgagtctggt gggtaatcgt gaacgtaaag ttaatatggg tctgaaagg 1260
ctgcagattt gcggtaatag cattatgccg ctgctgacct tttatggtaa tagtattgca 1320
gatcgttttc cgacccatgc cgaacaggca aaccagaata ttaacagcca gggttatacc 1380
agcgcaaccc tggcacgtcg tagcgttgaa atttttcaga attatgttgc cattgccctg 1440
atgtttggtg ttcaggcagt tgatctgcgt acctacaaaa aaaccgggtca ttatgatgca 1500
cgtgcccagc tgtcaccggc aaccgaacgt ctgtatagcg cagttcgtca tgttggtggt 1560
aaaaaaccca gctcagatcg tccgtatatt tggaatgata atgaacaggg tctggatgaa 1620
catattgcac gtattagtgc agatattgca gccggtggtg ttattgttca ggccggtcag 1680
gacattctgc cgccgctgca t 1701
```

<210> 12

<211> 567

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Вариант PAL *Anabaena variabilis*

<400> 12

```
Met Lys Thr Leu Ser Gln Ala Gln Ser Lys Thr Ser Ser Gln Gln Ser
1          5          10          15
Ser His Thr Gly Asn Ser Ser Ala Asn Val Ile Ile Gly Asn Gln Lys
20          25          30
Leu Thr Ile Asn Asp Val Val Arg Val Ala Arg Asn Gly Thr Ala Val
35          40          45
Ser Leu Thr Asn Asn Lys Asp Ile Leu Gln Arg Ile Gln Ala Ser Cys
50          55          60
Asp Tyr Ile Asn Asn Ala Val Glu Lys Gly Glu Pro Ile Tyr Gly Val
65          70          75          80
Thr Ser Gly Phe Gly Gly Met Ala Asn Val Val Ile Ser Arg Glu Gln
85          90          95
Ala Ser Glu Leu Gln Thr Asn Leu Val Trp Phe Leu Lys Thr Gly Ala
100         105         110
Gly Asn Lys Leu Pro Leu Ala Asp Val Arg Ala Ala Met Leu Leu Arg
115         120         125
Ala Asn Ser His Met Arg Gly Ala Ser Gly Ile Arg Leu Glu Leu Ile
130         135         140
Lys Arg Met Glu Ile Phe Leu Asn Ala Gly Val Thr Pro Tyr Val Tyr
```

145					150					155					160
Glu	Phe	Gly	Ser	Ile	Gly	Ala	Ser	Gly	Asp	Leu	Val	Pro	Leu	Ser	Tyr
				165					170					175	
Ile	Thr	Gly	Ser	Leu	Ile	Gly	Leu	Asp	Pro	Ser	Phe	Lys	Val	Asp	Phe
			180					185					190		
Asn	Gly	Lys	Glu	Met	Asp	Ala	Pro	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Leu	Asn	Leu
		195					200					205			
Pro	Pro	Leu	Thr	Leu	Gln	Pro	Lys	Glu	Gly	Leu	Ala	Met	Met	Asn	Gly
		210					215				220				
Thr	Ser	Val	Met	Thr	Gly	Ile	Ala	Ala	Asn	Cys	Val	Tyr	Asp	Thr	Gln
225					230					235					240
Ile	Leu	Thr	Ala	Ile	Ala	Met	Gly	Val	His	Ala	Leu	Asp	Ile	Gln	Ala
				245					250					255	
Leu	Asn	Gly	Thr	Asn	Gln	Ser	Phe	His	Pro	Phe	Ile	His	Asn	Ser	Lys
			260					265					270		
Pro	His	Pro	Gly	Gln	Leu	Trp	Ala	Ala	Asp	Gln	Met	Leu	Ser	Leu	Leu
		275					280					285			
Ala	Gly	Ser	Gln	Leu	Val	Arg	Asp	Glu	Leu	Asp	Gly	Lys	His	Asp	Tyr
		290				295					300				
Met	Asp	Gly	Glu	Leu	Ile	Gln	Asp	Arg	Tyr	Ser	Leu	Arg	Cys	Leu	Pro
305					310					315					320
Gln	Tyr	Leu	Gly	Pro	Ile	Val	Asp	Gly	Ile	Ser	Gln	Ile	Ala	Lys	Gln
				325					330					335	
Ile	Glu	Ile	Glu	Ile	Asn	Ser	Val	Thr	Asp	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Val
			340					345					350		
Asp	Asn	Gln	Ala	Ser	Tyr	His	Gly	Gly	Asn	Phe	His	Gly	Gln	Tyr	Val
		355					360					365			
Gly	Met	Gly	Met	Asp	His	Leu	Arg	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Leu	Leu	Ala	Lys
		370				375					380				
His	Leu	Asp	Val	Gln	Ile	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Pro	Glu	Phe	Ser	Asn
385					390					395					400
Gly	Leu	Pro	Pro	Ser	Leu	Val	Gly	Asn	Arg	Glu	Arg	Lys	Val	Asn	Met
				405					410					415	
Gly	Leu	Lys	Gly	Leu	Gln	Ile	Cys	Gly	Asn	Ser	Ile	Met	Pro	Leu	Leu
			420					425					430		
Thr	Phe	Tyr	Gly	Asn	Ser	Ile	Ala	Asp	Arg	Phe	Pro	Thr	His	Ala	Glu
		435					440					445			
Gln	Ala	Asn	Gln	Asn	Ile	Asn	Ser	Gln	Gly	Tyr	Thr	Ser	Ala	Thr	Leu
		450				455					460				
Ala	Arg	Arg	Ser	Val	Glu	Ile	Phe	Gln	Asn	Tyr	Val	Ala	Ile	Ala	Leu
465					470					475					480
Met	Phe	Gly	Val	Gln	Ala	Val	Asp	Leu	Arg	Thr	Tyr	Lys	Lys	Thr	Gly
				485					490					495	
His	Tyr	Asp	Ala	Arg	Ala	Gln	Leu	Ser	Pro	Ala	Thr	Glu	Arg	Leu	Tyr
			500												

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сконструированный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична по последовательности по меньшей мере одной из SEQ ID NO:4, 6, 8, 10 и/или 12, где положения аминокислот в указанных аминокислотных последовательностях пронумерованы относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2.

2. Сконструированный полипептид по п.1, где сконструированный полипептид содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 16, 16/150, 44/56, 44/56/102/239/285/469/470/495, 44/239, 44/239/285/469/495, 44/239/285/470, 44/239/469/470, 44/239/470/546, 44/239/495, 44/239/495/546, 44/469/470, 102, 102/470, 162, 165, 188, 239/285, 239/285/469, 239/469/470/495, 264, 267, 285/469/470/495, 285/470, 285/470/495, 364, 455, 469/470, 472 и 482, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:6.

3. Сконструированный полипептид по п.1, где сконструированный полипептид содержит по меньшей мере одну замену в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 16, 264, 364, 472, 482 и/или любых их комбинаций, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:6.

4. Сконструированный полипептид по п.1, где сконструированный полипептид содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 44/47/204/209/285, 44/47/364/470/495, 44/54/56/204/239/285/364/495, 44/54/56/204/239/470/495, 44/54/285/470, 44/102/285/364, 44/204/209/285, 44/204/285/364/470/495, 44/209/285/460/495, 44/285/364, 47/54/209, 47/204/209/239/285/495, 47/204/285/364/495, 47/209/239/364, 47/239/285/364, 47/470, 54, 54/56, 54/56/204/209/470, 54/56/204/209/495, 54/56/204/495, 54/56/209/562, 54/56/285/364/470, 54/56/285/470, 54/165/204/209/239/285/470/495, 54/239/495, 54/285/470, 54/470, 56, 165, 204, 204/209/239/285/470/495, 204/209/364, 204/209/364/495, 204/239, 204/239/285, 204/364, 204/470,

209/285/364/470, 209/285/364/470/495, 209/364, 209/364/495, 209/470, 239/364, 285/364, 285/364/495, 364, 364/470, 470 и 495 и/или любых их комбинаций, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:8.

5. Сконструированный полипептид по п.1, где сконструированный полипептид содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 16, 16/150, 162, 188, 264, 267, 398, 434, 472 и 482 и/или любых их комбинаций, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:6.

6. Сконструированный полипептид по п.1, где сконструированный полипептид содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 54/56/162/204/285, 54/56/162/204/398, 54/56/204/285, 54/56/204/398, 54/56/204/398/472, 54/56/285, 54/56/398, 54/56/398/472, 54/162/204/398, 54/162/398, 54/204/285/398/472, 54/204/398, 54/285/398, 54/285/398/472, 56/162/398, 56/204/285, 56/204/398, 56/204/398/460, 56/204/398/472, 56/285, 56/285/398/472, 56/398, 56/398/472 и 201/204/398 и/или любых их комбинаций, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:12.

7. Сконструированный полипептид по п.1, где сконструированный полипептид содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 16, 18, 39, 47, 54, 59, 73, 91, 209, 214, 285, 290, 305, 307, 364, 407, 450, 470, 503, 521, 524 и 565 и/или любых их комбинаций, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:12.

8. Сконструированный полипептид по п.1, где сконструированный полипептид содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 15/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/307/364/407/450/470/503/521/524/565, 16/18/19/214/407, 16/18/23/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565, 16/18/39/43/44/59/209/503/565,

16/18/39/45/47/54/59/73/98/209/214/285/290/305/364/407/450/470/503/521/524/565,
16/18/39/47/49/54/59/73/209/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524/565,
16/18/39/47/54/59/73/91/98/285/290/305/307/364/450/470/503/524/565,
16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/313/364/450/503/521/524/565,
16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524,
16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/521/524/565,
16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/503/521/524,
16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/450/470/521/524/565,
16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/364/407/450/503/521/524/565,
16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/364/407/470/503/521/524,
16/18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/307/364/407/450/470/503/524/565,
16/18/39/47/54/59/73/91/209/285/290/305/307/407/450/503/521/524/565,
16/18/39/47/54/59/73/91/209/285/290/307/364/407/470/503/521/524/565,
16/18/39/47/54/59/73/91/214/285/290/305/307/364/407/503,
16/18/39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521,
16/18/39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
16/18/39/47/54/59/73/91/285/290/305/364/407/470/503/521/524,
16/18/39/47/54/59/73/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
16/18/39/47/54/59/91/98/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524,

16/18/39/47/54/59/91/209/214/285/290/305/307/364/450/470/503/521
 /524/565,
 16/18/39/47/54/59/91/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521
 /524/565,
 16/18/39/47/54/59/91/214/285/290/305/307/364/450/503/521/524,
 16/18/39/47/54/59/91/285/290/305/307/364/407/450/503/521/524,
 16/18/39/47/54/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/470/503/521
 /565,
 16/18/39/47/54/73/91/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521
 /524,
 16/18/39/47/54/73/209/214/285/290/305/307/364/450/470/503/521/52
 4/565, 16/18/39/47/54/91/214/285/290/364/407/450/470/503/521,
 16/18/39/47/54/209/214/407/503/524/565,
 16/18/39/47/59/73/91/214/290/305/307/364/407/450/470/503/521,
 16/18/39/47/59/214/503/565, 16/18/39/47/91/290/407,
 16/18/39/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503
 /521/524,
 16/18/39/54/59/73/209/214/285/290/364/407/450/470/503/521/524/56
 5, 16/18/39/54/59/73/214/285/290/305/364/407/450/521/524/565,
 16/18/39/54/73/91/209/210/285/290/307/364/407/450/470/503/521/52
 4/565,
 16/18/39/54/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/52
 1/524,
 16/18/39/54/73/98/214/285/290/305/307/364/407/470/503/521/524/56
 5,
 16/18/39/54/73/209/285/290/305/307/364/407/470/503/521/524/565,
 16/18/39/54/91/214/285/290/364/450/470/503/521/524,
 16/18/39/91/503/521,
 16/18/47/54/59/73/91/98/285/290/364/407/450/470/503/521/524/565,
 16/18/47/54/59/73/98/209/290/305/307/364/450/470/503/521/524/565
 ,
 16/18/47/54/59/73/209/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524/56
 5,
 16/18/47/54/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/52
 1/524/565, 16/18/47/59/285/407/450/565,
 16/18/47/73/91/209/285/290/450/470/503/521/524,

16/18/47/73/214/307/503, 16/18/47/73/290/407/450, 16/18/47/209,
16/18/47/285/364/503/521, 16/18/47/364/407,
16/18/54/59/73/91/209/285/290/305/307/364/407/450/503/521,
16/18/54/59/290/407/450/503/524,
16/18/54/73/91/214/285/290/407/561,
16/18/54/91/209/214/285/290/307/364/407/450/503/521/524/565,
16/18/54/407, 16/18/55/209/285/305, 16/18/59/209/450/503/524,
16/18/73/209/214/450, 16/18/91/209/407/503,
16/18/91/214/407/521/524/565, 16/18/209/450/503,
16/18/214/407/450/503, 16/18/285/290/470, 16/18/503,
16/22/214/503/524/565,
16/39/47/54/59/73/91/98/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/
503/521/524/565,
16/39/47/54/59/73/91/98/209/214/285/290/307/364/407/450/470/521/
524/565,
16/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503
/521/524,
16/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503
/521/524/565,
16/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/503/521
/524/565,
16/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/470/503/521
/524/565,
16/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/364/407/450/470/503/521
/524,
16/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/364/407/450/503/521,
16/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/364/407/503/521/524/565
,
16/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/307/450/470/503/521/524/565
,
16/39/47/54/59/73/91/209/214/290/305/307/364/407/450/470/503/521
/524/565,
16/39/47/54/59/73/91/209/214/290/305/407/450/470/503/521/524/565
,
16/39/47/54/59/73/91/209/285/290/305/307/364/407/470/503/521/524
,

16/39/47/54/59/73/91/214/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524
 ,
 16/39/47/54/59/73/91/214/285/290/305/307/450/470/503/521/524/565
 , 16/39/47/54/59/73/91/214/285/290/305/364/407/450/503/524/565,
 16/39/47/54/59/73/91/214/285/290/307/364/407/450/503/521/524/565
 , 16/39/47/54/59/73/91/214/290/364/407/450/470/524/565,
 16/39/47/54/59/73/98/209/285/305/307/407/450/470/503/524,
 16/39/47/54/59/73/285/290/305/307/364/407/524,
 16/39/47/54/59/73/307/364/407/503/521/524,
 16/39/47/54/59/214/364/450/470/503/521/524,
 16/39/47/54/73/91/209/214/285/290/407/450/470/521/524/565,
 16/39/47/54/73/91/209/307/364/407/470/503/521/524/565,
 16/39/47/54/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/5
 24, 16/39/47/54/209/214/285/290/305/307/364/470/503/521/524/565,
 16/39/47/54/209/307/503,
 16/39/47/59/73/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/524/5
 65, 16/39/47/73/91/285/290/307/364/450/470/503/521/524/565,
 16/39/47/73/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524,
 16/39/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/470/503/521/524/56
 5,
 16/39/54/59/73/91/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/52
 4/565,
 16/39/54/59/73/91/214/285/290/305/307/364/407/470/503/521,
 16/39/54/59/73/91/214/290/305/307/407/470/503/521/524/565,
 16/39/54/59/91/285/290/305/364/407/450/470/503/521/524/565,
 16/39/55/59/503/565, 16/39/73/364, 16/39/214/255/407/565,
 16/39/214/407/503/565, 16/39/214/524, 16/39/407/450/470/475,
 16/39/521/565,
 16/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/364/450/470/503/521/524/56
 5, 16/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/450/470/503/524/565,
 16/47/54/59/73/91/209/285/290/307/450/470/503/521/524/565,
 16/47/54/59/91/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 16/47/54/73/91/209/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524/565,
 16/47/54/91/209/470/524/565,
 16/47/54/91/285/290/305/307/407/450/503/521/524/565,
 16/47/54/214/290/364/407/503/521/524, 16/47/59/364/407/523,

16/47/59/524,
 16/47/73/91/209/214/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524/565,
 16/47/73/91/214/285/407/565, 16/47/73/214/305/407/565,
 16/47/91/214/307/407/470/503/565,
 16/47/209/214/364/407/470/503/521/565, 16/47/209/407,
 16/47/407/450/524, 16/47/450/470/565, 16/47/450/521,
 16/54/59/73/91/209/214/285/290/307/450/470/503/524,
 16/54/59/73/91/290/307/364/450/470/503/521/524/565,
 16/54/59/91/209/364/407/450/521, 16/54/59/209/214/285/450,
 16/54/59/214/565, 16/54/73/91/285/290/305/307/407/450/470/524,
 16/54/73/407/450/470/503, 16/59/73/91/370/503/524,
 16/59/73/407/450/503/565, 16/59/73/503/565,
 16/59/364/407/450/524, 16/73/91/209/470, 16/73/214/524,
 16/91/209/214, 16/91/209/214/364/450, 16/91/214/407/503,
 16/91/285/290/364/407, 16/209/214/407/503/524, 16/214/364/470,
 16/214/407/565, 16/214/470, 16/290/305/364/407/470/479,
 16/364/503/565, 16/407/470, 16/407/524/565, 16/450/470/524,
 16/565, 18, 18/22/39/91/214/285/450/470/503,
 18/39/47/54/59/73/91/98/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/
 503/521/524/565,
 18/39/47/54/59/73/91/98/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/
 503/524,
 18/39/47/54/59/73/91/98/214/285/290/305/307/364/450/470/503/524,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/
 /521/524,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/
 /524/565,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/521/
 /524/565,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/503/521/
 /524/565,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/470/503/521/
 /524,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/503/521/524
 ,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/364/407/450/470/503/521

/524,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/307/364/407/450/470/503/521
 /524/565,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/290/305/307/407/503/524/565,
 18/39/47/54/59/73/91/209/214/290/307/364/407/450/470/503/521/524
 /565,
 18/39/47/54/59/73/91/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503,
 18/39/47/54/59/73/91/209/290/307/364/407/470/503/521/565,
 18/39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524
 /565,
 18/39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/450/470/503/524/565
 , 18/39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/450/503/521/524,
 18/39/47/54/59/73/91/285/290/307/364/450/470/503/524,
 18/39/47/54/59/73/209/214/285/290/305/307/364/407/450/503/521/56
 5, 18/39/47/54/59/73/214/285/290/305/364/407/450/470/503/524,
 18/39/47/54/59/91/98/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521
 /524,
 18/39/47/54/59/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/52
 1/524/565,
 18/39/47/54/59/91/209/214/290/305/307/364/407/470/503/521/524/56
 5,
 18/39/47/54/59/91/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/52
 4,
 18/39/47/54/59/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/5
 65, 18/39/47/54/59/209/285/290/305/307/407/450/503/521/524,
 18/39/47/54/59/214/470/503/521/524,
 18/39/47/54/73/91/98/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521
 /524/565, 18/39/47/54/73/91/98/285/290/305/450/503/521/524/565,
 18/39/47/54/73/91/98/290/305/307/364/450/470/503/521/524,
 18/39/47/54/73/91/154/209/290/305/307/364/407/450/470/503/521/52
 4/565,
 18/39/47/54/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/52
 1/524,
 18/39/47/54/73/91/209/214/285/290/305/307/450/503/521/524/565,
 18/39/47/54/73/91/209/214/285/290/307/364/407/450/470/503/521/52
 4/565,

18/39/47/54/73/91/209/214/285/290/307/364/407/450/470/503/565,
 18/39/47/54/73/91/209/285/290/305/307/364/407/470/521/524/565,
 18/39/47/54/73/91/209/305/364/407/450/470/503/521,
 18/39/47/54/73/91/285/290/305/307/364/407/450/503/521/524,
 18/39/47/54/91/214/285/290/305/307/407/450/503/521/524,
 18/39/47/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/450/470/503/521/52
 4/565,
 18/39/47/59/73/91/214/285/307/364/450/470/503/521/524/565,
 18/39/47/59/73/98/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/52
 4,
 18/39/47/73/91/209/214/290/305/307/364/450/470/503,
 18/39/47/209/214/290/565,
 18/39/54/59/73/91/98/209/214/285/290/305/307/364/407/521/524,
 18/39/54/59/73/91/98/209/214/285/290/305/307/364/470/503/521/524
 /565,
 18/39/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/52
 1,
 18/39/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/52
 1/524,
 18/39/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/503/521/52
 4,
 18/39/54/59/73/91/209/214/285/290/307/364/407/450/470/503/521/52
 4/565,
 18/39/54/59/73/91/209/214/285/290/307/364/407/470/503/521,
 18/39/54/59/73/91/209/214/285/305/307/364/407/450/470/503/521/52
 4/565,
 18/39/54/59/73/91/214/285/290/307/407/450/470/503/521/524/565,
 18/39/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/56
 5,
 18/39/54/59/73/91/285/290/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 18/39/54/59/73/285/290/307/364/470/503/521/524/565,
 18/39/54/59/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/5
 24/565,
 18/39/54/59/285/290/305/307/364/407/450/470/503/524,
 18/39/54/73/91/98/285/290/305/407/450/470/503/521/524/565,
 18/39/54/73/91/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503,
 18/39/54/73/209/214/285/290/305/307/364/407/503/521/524,
 18/39/55/407/470/503,

18/39/73/91/209/214/285/290/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 18/39/73/91/214/285/290/305/364/407/450/470/503/521/524,
 18/39/214/364/407/470/503, 18/39/214/364/450/470/521/524,
 18/43/305/364/416/450,
 18/47/54/59/73/91/209/214/290/305/364/407/450/503/524,
 18/47/54/59/73/91/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524,
 18/47/54/59/73/91/214/285/290/307/364/407/485/503/524/565,
 18/47/54/73/91/209/214/285/290/305/307/407/470/503/521/524,
 18/47/54/73/91/209/285/290/364/407/450/470/503/521/524/565,
 18/47/59/97/98/407/503, 18/47/59/214/285/565,
 18/47/59/214/362/407, 18/47/59/214/450/521,
 18/47/73/91/364/407/503, 18/47/97/98/182/209/364/407/503,
 18/47/209/290/364/470, 18/47/209/407/450/470/503/521,
 18/47/209/407/450/503, 18/47/214/285/287/290/470/503,
 18/47/214/407/524/565, 18/47/364/470, 18/47/364/503,
 18/47/364/503/565, 18/47/450/470, 18/47/521/565,
 18/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/470/503/521/524,
 18/54/73/214/307, 18/59/91/209/214/364, 18/59/91/565, 18/59/209,
 18/59/305/364/470/565, 18/59/407/450, 18/59/503/524,
 18/73/91/182/287/407/450/503, 18/73/285/364/407/470,
 18/73/285/521/524, 18/73/364/450/565, 18/73/407,
 18/91/209/364/407, 18/91/214, 18/91/214/407/524/565,
 18/91/364/407, 18/91/364/407/450, 18/91/364/450/565,
 18/91/407/470/521/524, 18/91/407/503, 18/209,
 18/209/364/407/521/565, 18/214/364/407/470/503/524, 18/214/407,
 18/290/565, 18/364/450/521/524/565, 18/364/503,
 18/407/450/503/565, 18/450/503,
 39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/364/407/503/521/524/565,
 39/47/54/59/73/91/209/214/290/305/307/364/407/450/470/503,
 39/47/54/59/73/91/209/214/290/305/307/364/407/470/503/521/524/565,
 39/47/54/59/73/91/209/285/290/305/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/47/54/59/73/91/209/285/290/307/407/450/470/503/521/565,
 39/47/54/59/73/91/209/285/290/364/450/470/503/521/524,

39/47/54/59/73/91/214/285/290/305/307/407/412/450/470/503/521/524/565,
 39/47/54/59/73/91/214/285/290/305/307/407/450/470/503/521/524/565,
 39/47/54/59/73/91/214/285/290/364/450/470/503/521/524/565,
 39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/364/407/470/503/521/524/565,
 39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/364/450/470/503/521/565,
 39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/407/450/470/503/521/524/565,
 39/47/54/59/73/91/285/290/305/307/450/470/503/521/524,
 39/47/54/59/73/209/214/285/290/307/407/450/503/521/524,
 39/47/54/59/73/209/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524,
 39/47/54/59/91/98/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/524,
 39/47/54/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/47/54/73/91/209/214/285/290/305/307/407/470/503/521/524/565,
 39/47/54/73/91/209/285/290/305/307/364/407/470/503/521/524,
 39/47/54/73/91/209/285/290/305/364/450/470/503/521/524,
 39/47/54/73/91/214/285/290/305/364/407/450/503/524,
 39/47/54/73/91/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/47/54/91/209/214/285/305/307/407/503/521/565,
 39/47/54/91/209/285/290/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/47/54/91/214/285/290/307/364/470/503/521/524,
 39/47/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524,
 39/47/59/91/98/209/214/285/290/305/307/364/403/407/450/470/503/524/565,
 39/47/59/91/209/214/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524,
 39/47/73/91/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/47/73/91/214/285/290/305/364/407/450/503/521/524,
 39/47/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 , 39/47/91/214, 39/47/285/503,
 39/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/470/503,
 39/54/59/73/91/209/214/285/290/364/407/470/503/524/565,

39/54/59/73/91/209/214/290/305/307/407/503/521/524/565,
 39/54/59/73/91/209/214/290/305/407/450/503/524/565,
 39/54/59/73/91/209/285/290/305/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/54/59/73/91/285/290/307/364/407/450/503/524,
 39/54/59/73/98/209/214/285/290/305/307/364/450/470/503,
 39/54/59/73/209/214/285/290/305/307/364/407/450/503/521/565,
 39/54/59/73/290/305/307/364/407/470/503/521/524/565,
 39/54/59/91/98/209/287/290/291/307/364/407/450/470/521/524,
 39/54/59/91/98/285/290/503/521/524/565,
 39/54/59/91/209/214/285/290/305/307/364/407/470/503/524/565,
 39/54/73/91/209/214/285/290/305/364/503/524/565,
 39/59/73/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/565,
 39/59/202/407/524/565, 39/59/364/450/470/565,
 39/73/290/307/364/407/450/524/565,
 39/209/214/407/450/470/503/521, 39/209/450/470/503,
 39/214/285/290/305/307/364/503/521/524, 39/214/307/503/524, 47,
 47/54/59/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/5
 24/565,
 47/54/59/73/91/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524,
 47/54/59/73/91/209/285/290/305/307/364/407/450/503/524/565,
 47/54/59/73/91/285/290/311/364/407/503/521/524/565,
 47/54/59/73/91/285/305/307/407/470/521/524,
 47/54/59/73/98/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/5
 24, 47/54/59/73/209/285/290/364/407/432/450/470/503/521/524/565,
 47/54/73/91/209/214/285/290/305/307/364/407/450/470/503/521/524/
 565, 47/54/73/91/285/290/307/364/450/470/503/521/524/565,
 47/54/91/97/209/364/503/565, 47/55, 47/59/91/407/470/503/565,
 47/59/91/503/521, 47/59/209, 47/59/450/470/503, 47/73,
 47/73/91/214, 47/73/91/285/290/305/307/364/450/470/503/521/524,
 47/73/91/290/407/416/450/503/521/524, 47/73/209/364/450/521,
 47/73/214/305/307/364/503/565, 47/73/214/305/407/503/565,
 47/73/214/364/407, 47/73/407/470/503,
 47/209/214/305/307/364/503/521/524, 47/209/503/524/565,
 47/214/364/503, 47/214/407, 47/285/290/364/503/565, 47/305,
 47/364/407/470/521/524, 47/364/524/565, 47/407,
 47/407/450/521/524, 47/407/565, 47/524/565, 51/407/470/503/524,

54/59/73/91/214/285/290/364/407/470/503/524/565,
 54/59/91/209/407, 54/73/91/214/450/503/521/524,
 54/73/91/305/364/407/450/470/503/521, 54/73/450,
 54/209/285/290/305/307/364/407/450/470/503/565,
 54/209/407/450/470/565, 54/209/470/503/524/565, 54/450, 54/503,
 55/290/305/364/450/503, 59/73/290/407/503/554,
 59/73/305/307/503, 59/91/407/450, 59/209/364/470/503, 59/214,
 59/214/364/407/452/503, 59/214/450/503, 59/407/503/521/524,
 59/450/503, 59/565, 73/91/214/524/565, 73/91/521, 91/97/209/285,
 91/209/214/255/285/290/307/450, 91/209/214/364/407/450/470/565,
 91/209/214/407/503/565, 91/209/214/450/521/524/565,
 91/209/214/470/565, 91/209/407, 91/214, 209, 209/214/305,
 209/214/307/407/450/503, 209/214/407/450/470/503, 209/470,
 214/285/307/503/565, 214/407/503/565, 214/470/503, 214/470/521,
 290/470, 305/407/521364364/407/419/450/470/521/565, 364/407/565,
 364/470/503/521/524, 407, 407/450/565, 407/503, 450/503,
 450/524, 503 и 524 и/или любых их комбинаций, где положения
 аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO:2.

9. Сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности относительно SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10 и/или 12 или их функционального фрагмента.

10. Сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы, где указанный сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы содержит сконструированный полипептид по любому из пп.1-8.

11. Сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы по п.9 и/или 10, где указанный сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере приблизительно 95% идентичности последовательности относительно SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10 и/или 12 или их функционального фрагмента.

12. Сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы по любому из пп.9-11, где указанный сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы является вариантом полипептида фенилаланин-аммиаклиазы, представленным в любой из таблицы 6.1,

таблицы 7.1, таблицы 8.1, таблицы 9.1, таблицы 10.1, таблицы 14.1 и/или таблицы 15.1.

13. Сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы по любому из пп.9-12, где указанный сконструированный полипептид является вариантом фермента *Anabaena variabilis*.

14. Сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы по любому из пп.9-13, где указанный сконструированный полипептид является более термостабильным, чем фенилаланин-аммиаклиаза *Anabaena variabilis* дикого типа.

15. Сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы по любому из пп.9-14, где указанный сконструированный полипептид более устойчив к протеолизу, чем фенилаланин-аммиаклиаза *Anabaena variabilis* дикого типа.

16. Сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы по п.15, где указанный сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы устойчив к протеолизу под действием по меньшей мере одного фермента пищеварительного тракта, чем фенилаланин-аммиаклиаза *Anabaena variabilis* дикого типа.

17. Сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы по п.15, где указанный сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы более устойчив к протеолизу под действием химотрипсина, трипсина, карбоксипептидаз и/или эластаз, чем фенилаланин-аммиаклиаза *Anabaena variabilis* дикого типа.

18. Сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы по любому из пп.9-17, где указанный сконструированный полипептид более устойчив к действию кислот, чем фенилаланин-аммиаклиаза *Anabaena variabilis* дикого типа.

19. Сконструированный полипептид по любому из пп.1-8 или сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы по любому из пп.9-18, где указанный полипептид является очищенным.

20. Сконструированная полинуклеотидная последовательность, кодирующая по меньшей мере один сконструированный полипептид по пп.1-8 или 19 и/или полипептид фенилаланин-аммиаклиазы по любому из пп.9-19.

21. Сконструированная полинуклеотидная последовательность по п.20, где указанная последовательность функционально связана с

контрольной последовательностью.

22. Сконструированная полинуклеотидная последовательность по п.20 и/или 21, где указанный полинуклеотид является кодон-оптимизированным.

23. Вектор экспрессии, содержащий по меньшей мере одну сконструированную полинуклеотидную последовательность по любому из пп.20-22 и по меньшей мере одну контрольную последовательность.

24. Вектор экспрессии по п.23, где указанная контрольная последовательность содержит промотор.

25. Вектор экспрессии по п.24, где указанный промотор является гетерологичным промотором.

26. Клетка-хозяин, трансформированная с использованием по меньшей мере одной полинуклеотидной последовательности по любому из пп. 20-22 и/или экспрессирующего вектора по любому из пп.23-25.

27. Клетка-хозяин по п.26, где указанная клетка-хозяин является *E. coli*.

28. Способ получения сконструированного полипептида фенилаланин-аммиаклиазы в клетке-хозяине, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один сконструированный полипептид и/или полипептид фенилаланин-аммиаклиазы по любому из пп.1-19, и/или по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность по п.20-22, и/или по меньшей мере один вектор экспрессии по любому из пп.23-25, в подходящих условиях культивирования, таким образом, что получают по меньшей мере один сконструированный полипептид фенилаланин-аммиаклиазы.

29. Способ по п.28, дополнительно включающий выделение по меньшей мере одного сконструированного полипептида фенилаланин-аммиаклиазы из культуры и/или клеток-хозяев.

30. Способ по п.29, дополнительно включающий стадию очистки указанного по меньшей мере одного сконструированного полипептида фенилаланин-аммиаклиазы.

31. Композиция, содержащая по меньшей мере один сконструированный полипептид и/или сконструированный полипептид

фенилаланин-аммиаклиазы по любому из пп.1-19.

32. Композиция, содержащая по меньшей мере один сконструированный полинуклеотид по любому из пп.20-22.

33. Композиция по п.31 и/или 32, где указанная композиция является фармацевтической композицией.

34. Композиция по п.32 и/или 33, дополнительно содержащая по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент и/или носитель.

35. Композиция по любому из пп.31-34, где указанную композицию можно использовать для лечения фенилкетонурии.

36. Композиция по любому из пп.31-35, где указанную композицию можно использовать для лечения повышенного уровня фенилаланина в крови.

37. Композиция по любому из пп.31-36, где указанную композицию можно использовать для лечения тирозинемии.

38. Композиция по любому из пп.31-37, где указанную композицию можно использовать для лечения повышенного уровня тирозина в крови.

39. Композиция по п.31, где указанную композицию можно использовать в генной терапии.

40. Композиция по п.39, где указанную композицию можно использовать в генной терапии для лечения фенилкетонурии, повышенного уровня фенилаланина в крови, тирозинемии и/или повышенного уровня тирозина в крови.

41. Композиция по п.31, где указанную композицию можно использовать в мРНК-терапии.

42. Композиция по п.41, где указанную композицию можно использовать в мРНК-терапии лечения фенилкетонурии, повышенного уровня фенилаланина в крови, тирозинемии и/или повышенного уровня тирозина в крови.

43. Композиция по любому из пп.31-42, где указанную композицию можно использовать для перорального введения человеку.

44. Композиция по любому из пп.31-38 и/или 43, где указанная композиция находится в форме пилюли, таблетки, капсулы, желатиновой капсулы, жидкости или эмульсии.

45. Композиция по п.44, где указанная пилюля, таблетка, капсула или желатиновая капсула дополнительно содержит растворяющееся в кишечнике покрытие.

46. Композиция по любому из пп.31-43, где указанную композицию можно использовать для парентеральной инъекции человеку.

47. Композиция по любому из пп.31-46, где указанную композицию вводят совместно с по меньшей мере одним дополнительным терапевтически эффективным соединением.

48. Композиция по п.47, где указанная композиция содержит по меньшей мере одно дополнительное терапевтически эффективное соединение.

49. Способ лечения и/или профилактики симптомов фенилкетонурии у индивидуума, включающий наличие индивидуума, имеющего фенилкетонурию, и введение указанному индивидууму композиции по любому из пп.31-48.

50. Способ по п.49, где концентрация фенилаланина в крови указанного индивидуума снижается после введения ему указанной композиции.

51. Способ по п.49 и/или 50, где концентрация коричной кислоты в крови указанного индивидуума повышается после введения ему указанной композиции.

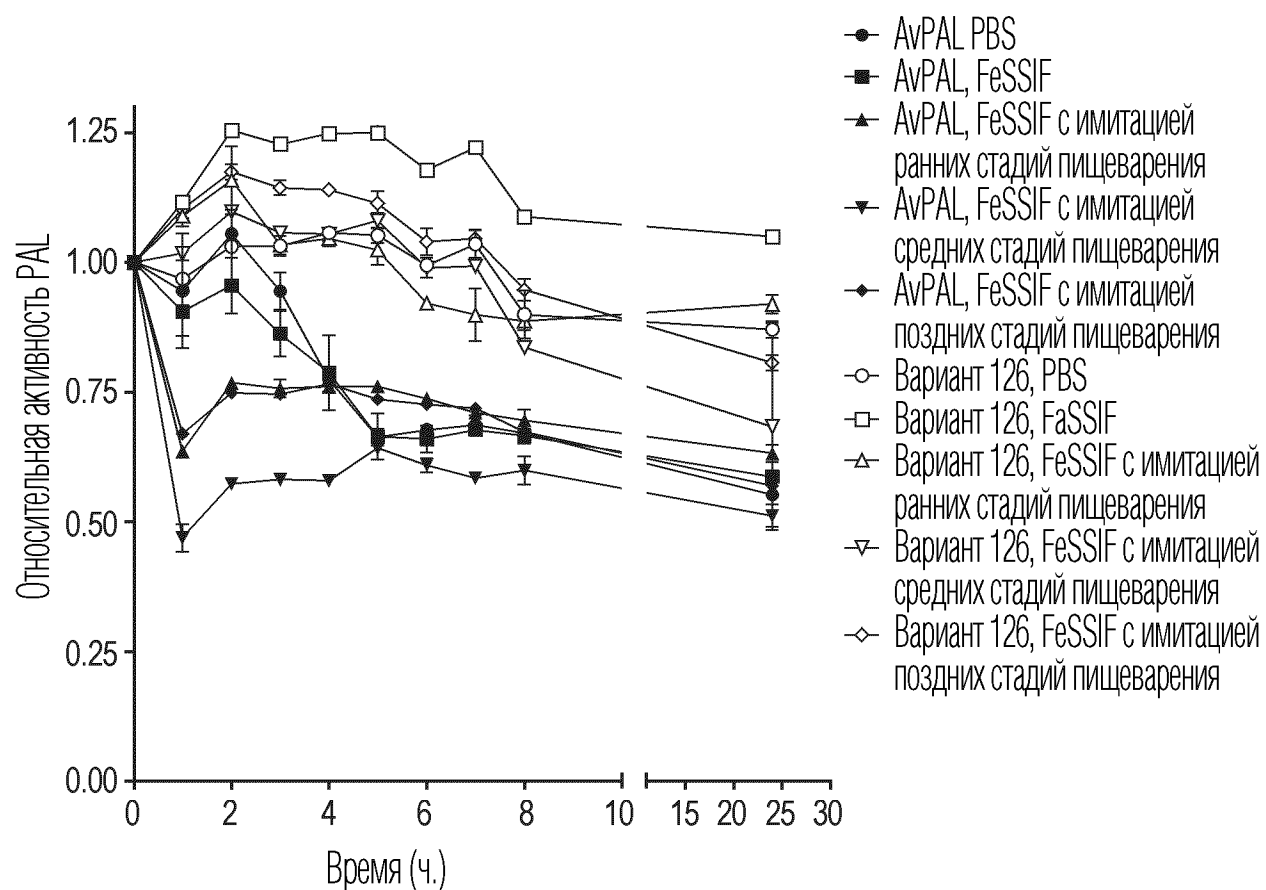
52. Способ по любому из пп.49-51, где улучшают указанные симптомы фенилкетонурии.

53. Способ по любому из пп.49-52, где указанный индивидуум может потреблять пищу, менее ограниченную по содержанию фенилаланина, чем пища, необходимая для индивидуумов, которым не вводили по меньшей мере одну фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере один сконструированный полипептид и/или фенилаланин-аммиаклиазу по пп.1-19.

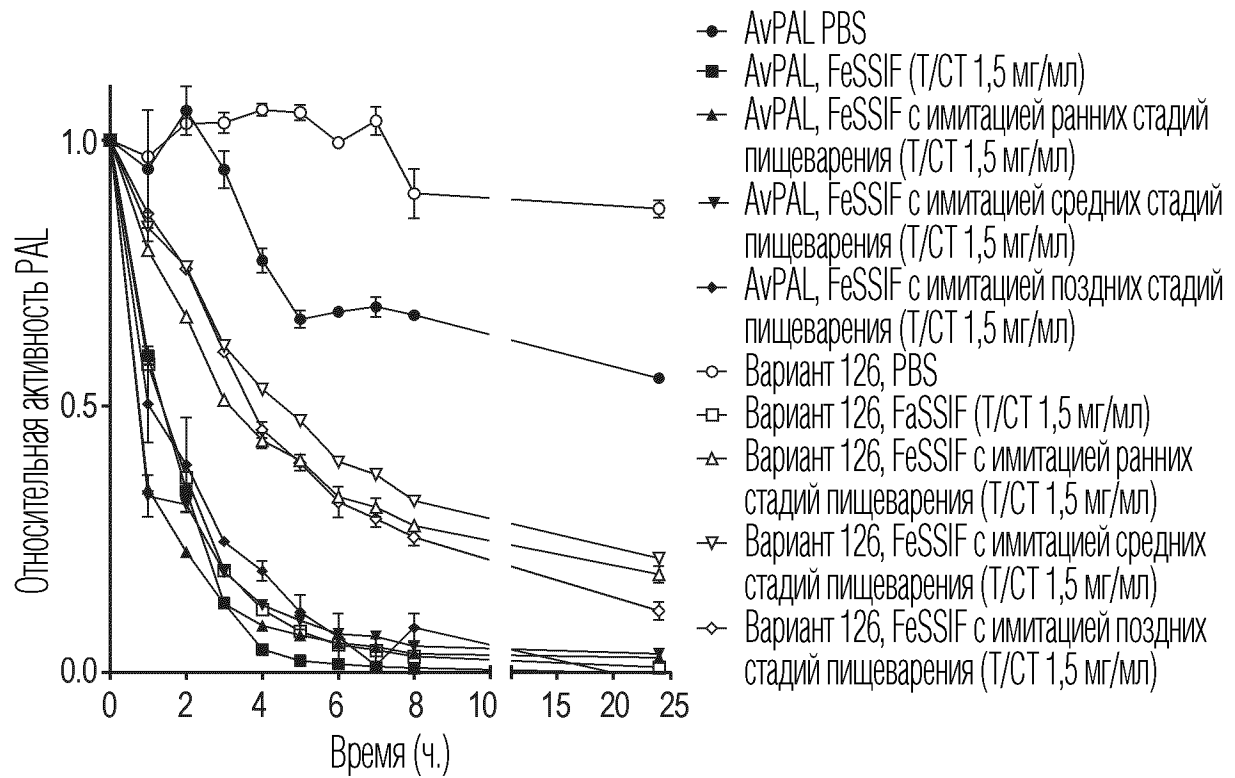
54. Способ по любому из пп.49-53, где указанный индивидуум является младенцем, ребенком, молодым человеком или взрослым.

55. Применение композиций по любому из пп.31-48.

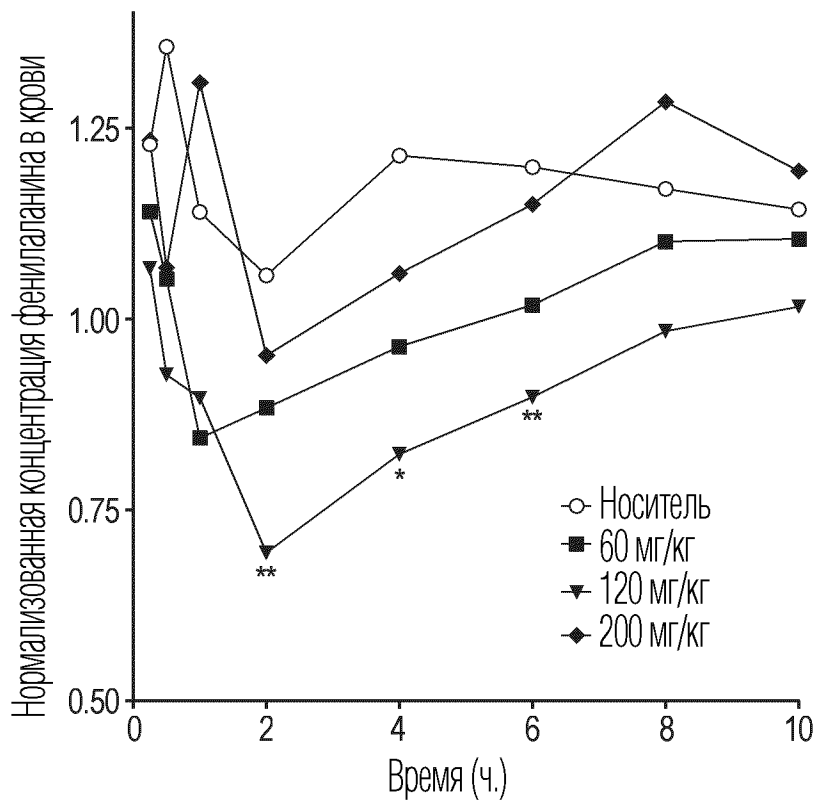
По доверенности



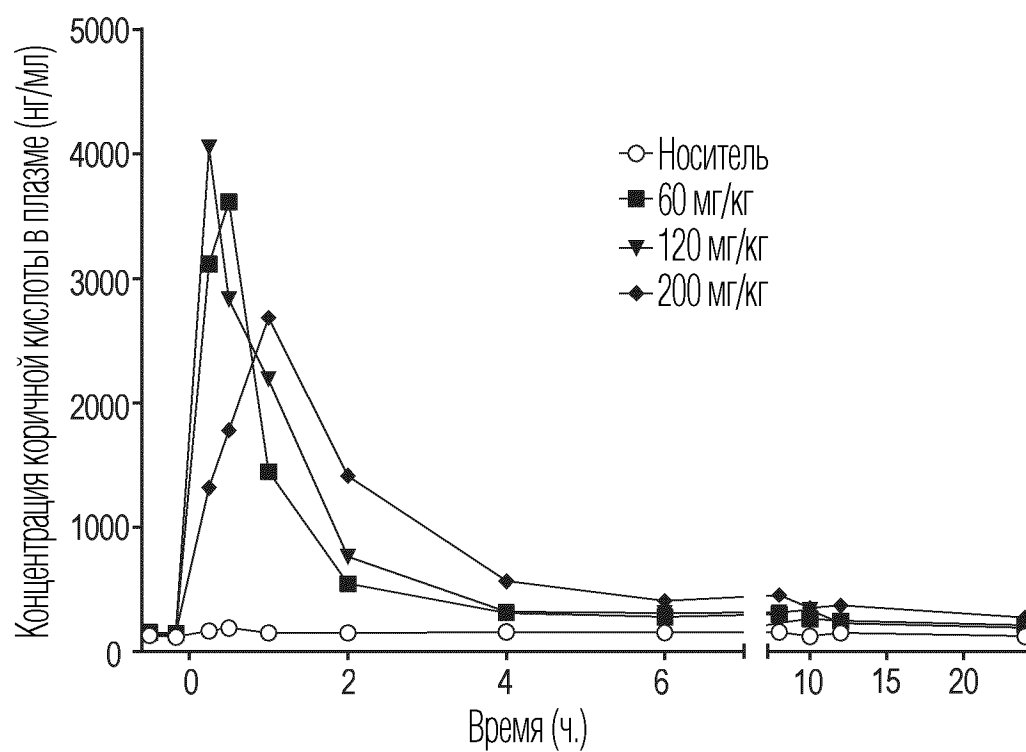
ФИГ. 1



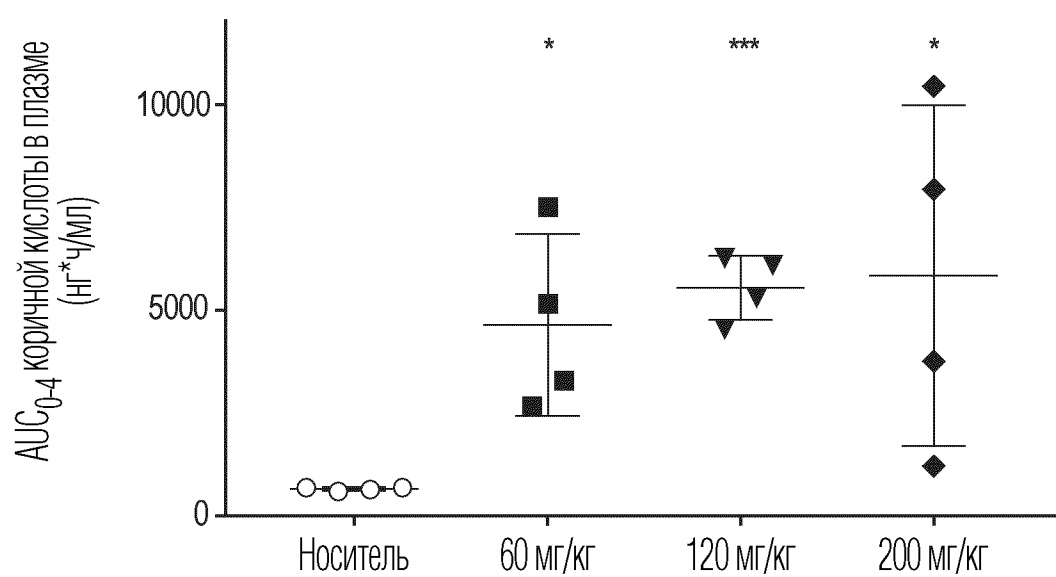
ФИГ. 2



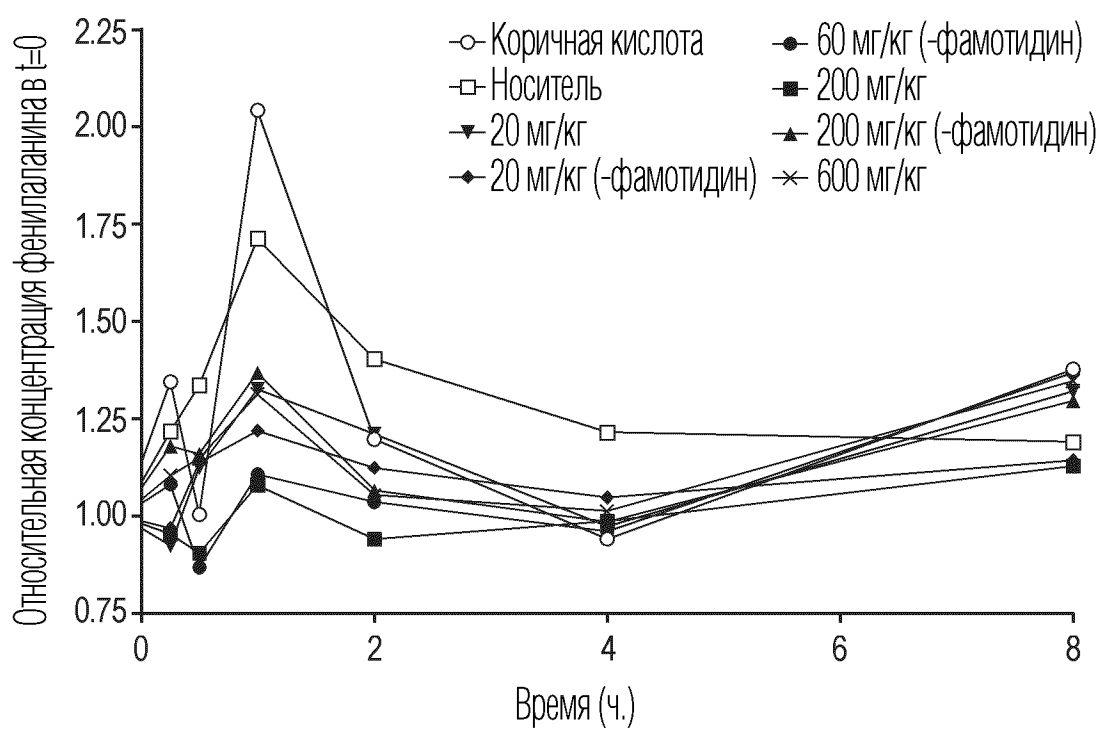
ФИГ. 3



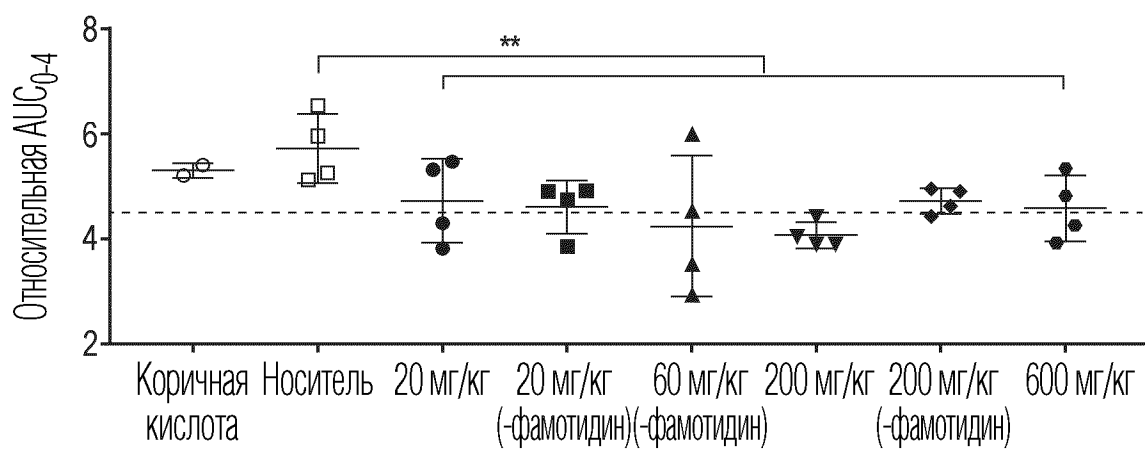
ФИГ. 4



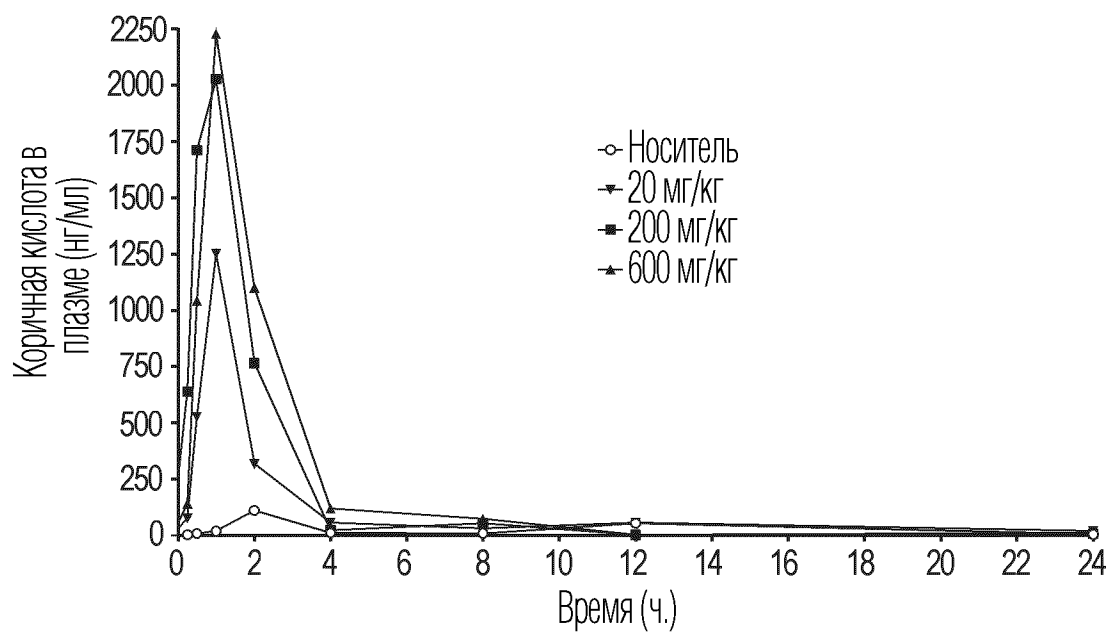
ФИГ. 5



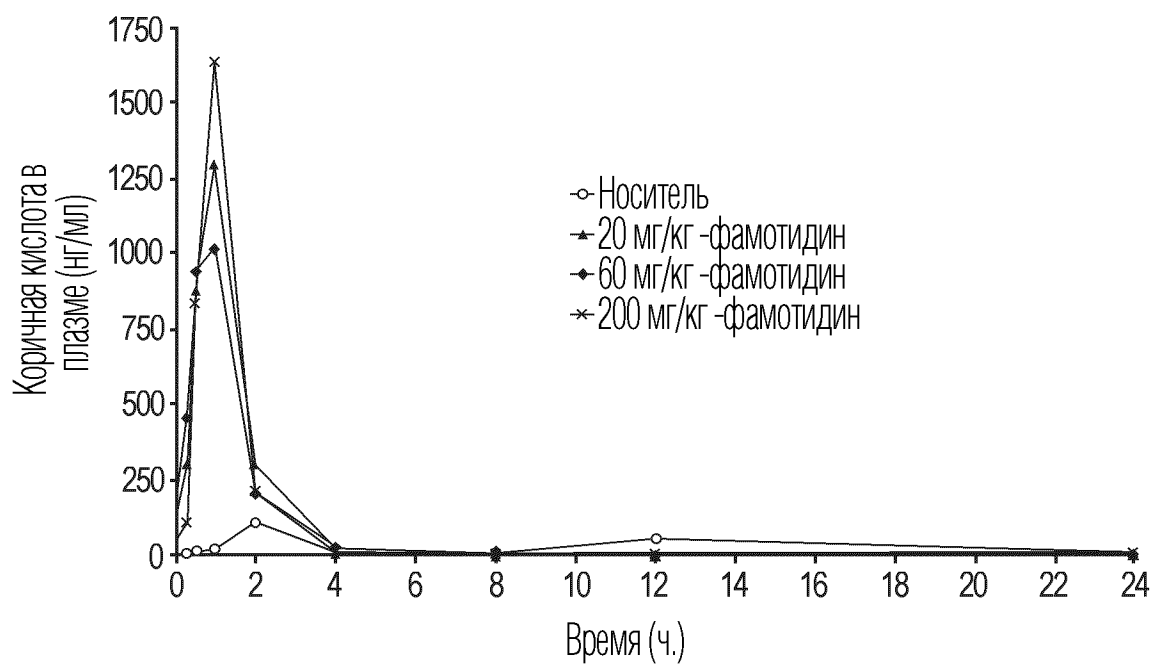
ФИГ. 6



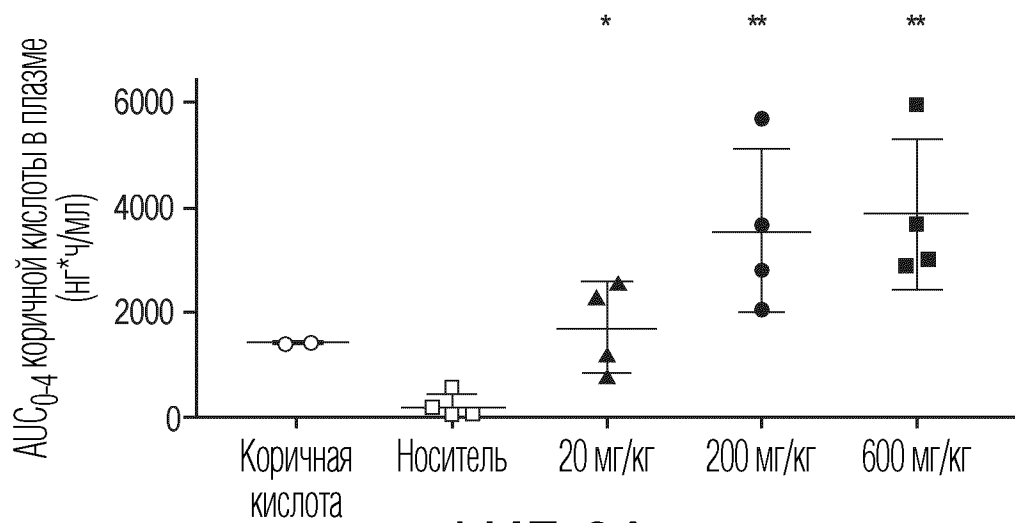
ФИГ. 7



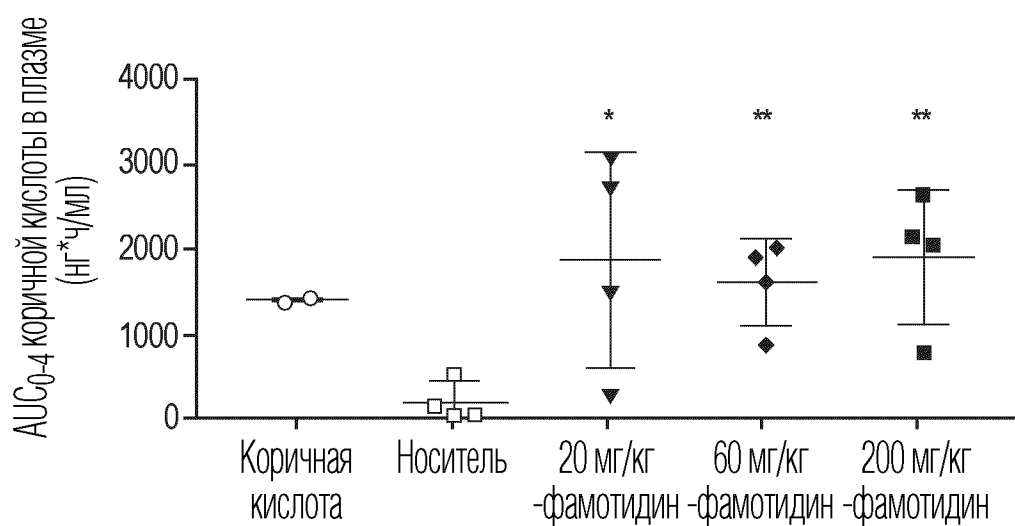
ФИГ. 8А



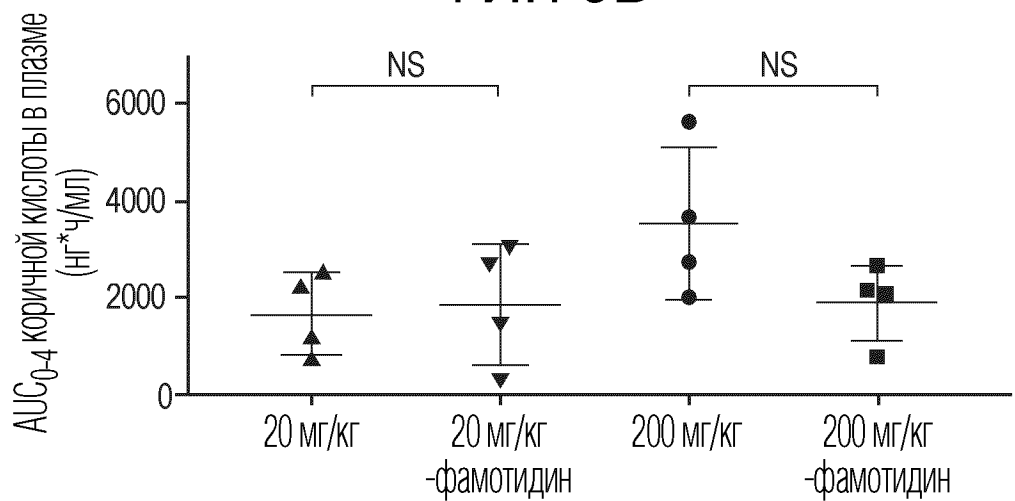
ФИГ. 8В



ФИГ. 9А



ФИГ. 9В



ФИГ. 9С