

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034253**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.22

(21) Номер заявки
201692327

(22) Дата подачи заявки
2015.05.19

(51) Int. Cl. **C12N 9/50** (2006.01)
A23L 2/84 (2006.01)
A23J 3/34 (2006.01)
C12N 9/62 (2006.01)

(54) **ПРОЛИН-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭНДОПРОТЕАЗА**

(31) **14168866.3**

(32) **2014.05.19**

(33) **EP**

(43) **2017.02.28**

(86) **PCT/EP2015/061026**

(87) **WO 2015/177171 2015.11.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДСМ АйПи АССТЕС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
**Лан Ван Дер Ян Метске, Вондерворт
Ван Де Петер Йозеф Ида, Кристис
Шанталь, Спанс Мартине, Брёйне-
Паулус Де Ангела, Мутсаэрс Йоханна
Хенрика Гердина Мария (NL)**

(74) Представитель:
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

(56) **WO-A1-2012174127
WO-A1-03104382
WO-A2-2014202622
WO-A1-2013135732**

(57) Настоящее изобретение относится к полипептиду, обладающему активностью пролин-специфической эндопротеазы, выбранному из группы, состоящей из: i) полипептида, содержащего последовательность зрелого полипептида, представленную в SEQ ID NO: 2; ii) полипептида, который имеет последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательности зрелого полипептида, представленной в SEQ ID NO: 2; iii) полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, которая гибридизуется в условиях средней жесткости, предпочтительно в условиях высокой жесткости с цепью, последовательность которой комплементарна последовательности, кодирующей зрелый полипептид, представленной в SEQ ID NO: 1; iv) полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, которая имеет последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную последовательности, кодирующей зрелый полипептид, представленной в SEQ ID NO: 1. Кроме того, изобретение относится к способу получения полипептида и процессу производства пищевого или кормового продукта, в котором применяют полипептид.

B1

034253

034253

B1

Настоящее изобретение относится к полипептиду, обладающему активностью пролин-специфической эндопротеазы, композиции, содержащей указанный полипептид, нуклеиновой кислоте, кодирующей пролин-специфическую эндопротеазу, экспрессионному вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую пролин-специфическую эндопротеазу, рекомбинантной клетке-хозяину, способу получения пролин-специфической эндопротеазы и процессу получения пищевого или кормового продукта, в котором применяют пролин-специфическую эндопротеазу.

Сведения о предшествующем уровне техники

Пролин-специфические эндопротеазы представляют собой ферменты, которые гидролизуют белок или пептид в положении, в котором находится пролин в белке или пептиде.

Пролин-специфическая эндопротеаза может быть получена, например, из *Aspergillus niger* или *Penicillium chrysogenum*, как это описано в WO 2002046381 и WO 2009144269 соответственно.

Другие пролин-специфические эндопротеазы известны из WO 2012174127. В WO 2012174127 раскрыта пролин-специфическая протеаза, полученная из *Botryotinia fuckeliana*, *Aspergillus clavatus*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella graminicola*, *Neurospora crassa*, *Talaromyces stipitatus* и *Gibberella zeae*.

Пролин-специфическую эндопротеазу можно применять в различных областях, например для расщепления глютена (см., например, WO 2005027953 или WO 2003068170). Глютен представляет собой нерастворимую белковую фракцию зерновых, таких как пшеница, рожь, овес и ячмень. Глютен представляет собой сложную смесь молекул глиутенина и проламина, которые, как предполагается, вызывают токсические эффекты, например у пациентов, страдающих глютеновой болезнью. Целиакия спру или глютеновая болезнь считается аутоиммунным заболеванием. Пациенты, страдающие целиакией спру, должны соблюдать жесткую безглютеновую диету, которой очень сложно следовать из-за широкого применения глютена. Использование пролин-специфической эндопротеазы в качестве лекарственного средства или диетической добавки может уменьшить необходимость в жесткой безглютеновой диете (WO 2003068170).

Пролин-специфические эндопротеазы также применяют для уменьшения помутнения в пиве, при этом пролин-специфическую протеазу можно добавлять во время нескольких стадий процесса производства пива, что описано, например, в WO 2002046381 или WO 2007101888 A2.

Целью настоящего изобретения является альтернативная пролин-специфическая эндопротеаза с улучшенными характеристиками.

Краткое описание изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к изолированному полипептиду, обладающему активностью пролин-специфической эндопротеазы, выбранному из группы, состоящей из:

- i. полипептида, содержащего последовательность зрелого полипептида, представленную в SEQ ID NO: 2;
- ii. полипептида, который имеет последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательности зрелого полипептида, представленной в SEQ ID NO: 2;
- iii. полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, которая гибридизуется в условиях средней жесткости, предпочтительно в условиях высокой жесткости с цепью, последовательность которой комплементарна последовательности, кодирующей зрелый полипептид, представленной в SEQ ID NO: 1;
- iv. полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, которая имеет последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную последовательности, кодирующей зрелый полипептид, представленной в SEQ ID NO: 1.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей описанный здесь полипептид.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, которая имеет последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную последовательности, кодирующей зрелый полипептид, представленной в SEQ ID NO: 1.

Настоящее изобретение также относится к экспрессионному вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий полипептид согласно настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей полинуклеотидную последовательность или экспрессионный вектор, как описано в настоящем документе.

В еще другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения полипептида, включающему культивирование клетки-хозяина, как описано в настоящем документе, в условиях, которые обеспечивают экспрессию полипептида и получение полипептида.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к процессу получения пищевого или кормового продукта, включающему инкубацию промежуточной формы пищевого или кормового продукта с описанным здесь полипептидом и получение пищевого продукта.

Настоящее изобретение также относится к пищевому и кормовому продукту, который может быть получен согласно описанному в настоящем документе процессу.

Определения

Термин "выпечка" в настоящем документе определен как любой продукт, приготовленный из теста,

например из жидкого теста. Продукт может иметь мягкую или хрустящую текстуру и может быть белого, светлого или темного типа. Выпечка включает, но без ограничения, хлеб, такой как, например, белый хлеб, цельнозерновой хлеб или хлеб из ржаной муки, хлеб типа французского багета; выпечку из слоеного теста, например из дрожжевого слоеного теста, такую как круассаны, или выпечку из пресного слоеного теста; питу, тортилью, горячую маисовую лепешку с начинкой, кексы, панкейки, бисквиты, печенье, пончики, бублики, песочное тесто, маффины, паровой хлеб и хрустящий хлеб. Типы выпечки, способы их характеристики и получения известны специалистам в данной области, см., например, "Baking Science and Technology" by E.J. Pyler, L.A. Gorton, 2008, (2 volumes) Sosland Publishing Company, Kansas, USA, или "Baked Products: Science, Technology and Practice" by S.P. Cauvain, L.S. Young, 2006, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.

Термин "комплементарная цепь" может быть использован взаимозаменяемо с термином "комплемент". Комплемент нуклеотидной цепи может представлять собой комплемент кодирующей цепи или комплемент некодирующей цепи. При упоминании двухцепочечных нуклеиновых кислот комплемент нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, относится к комплементарной цепи кодирующей аминокислотную последовательность цепи или к любой содержащей ее молекуле нуклеиновой кислоты.

Термин "контрольная последовательность" может быть использован взаимозаменяемо с термином "регулирующая экспрессию последовательность нуклеиновой кислоты". Используемый здесь термин относится к последовательностям нуклеиновых кислот, необходимым для экспрессии и/или влияющим на экспрессию функционально связанной кодирующей последовательности в организме конкретного хозяина или *in vitro*. Когда две нуклеотидные последовательности функционально связаны, они, как правило, будут находиться в одинаковой ориентации, а также в одинаковой рамке считывания. Как правило, они будут, по существу, смежными, хотя это может не требоваться. Регулирующие экспрессию нуклеотидные последовательности, такие как *inter alia*, подходящие последовательности инициации, терминации транскрипции, промоторные, лидерные последовательности, последовательности сигнального пептида, пропептидные последовательности, препропептидные последовательности или энхансерные последовательности; последовательность Шайна Дальгарно, последовательности репрессоров или активаторов; сигналы эффективного процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые усиливают эффективность трансляции (то есть сайты связывания рибосом); последовательности, которые увеличивают стабильность белка; и, если желательно, последовательности, которые усиливают секрецию белка, могут представлять собой нуклеотидную последовательность, проявляющую активность в выбранном организме-хозяине, и могут быть получены из генов, кодирующих белки, которые являются эндогенными или гетерологичными для клетки-хозяина. Каждая контрольная последовательность может быть нативной или чужеродной по отношению к нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид. По желанию контрольная последовательность может быть обеспечена линкерами с целью введения специфических сайтов рестрикции, облегчающих лигирование контрольных последовательностей с кодирующим участком нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид. Контрольные последовательности могут быть оптимизированы в соответствии с их конкретным назначением.

"Молочный продукт" относится к любому виду продукта на основе молока, предназначенному для использования в качестве пищевого, кормового продукта или напитка, включая, но без ограничения, сыр, молоко, обезжиренное молоко, сквашенное молоко, кефир, сгущенное молоко, пастообразные продукты, маргарины, йогурт, мороженое, сухое молоко, масло, ЕМС (модифицированный ферментированный сыр), вареное сгущенное молоко, забеливатель для кофе; сливки для кофе, сливки, топленое масло, аналог молочного продукта и т.д. Сыр может представлять собой сыр любого вида, например молодой сыр, твердый сыр, творожный сыр, сливочный сыр, сыр с белой плесенью, сыр с голубой плесенью и плавленый сыр. Примерами молодого сыра являются сыр рикотта, сливочный сыр, сыр невшатель или деревенский сыр. Примерами твердых сыров являются чеддер, данбо, манчего, сен полен, чеддер, монтерей, колби, эдам, гауда, мюнстерский, сыр типа швейцарского, грюйер, эмментальский, пармиджано реджано, грана падано, пармезан, пекорино, проволоне и романо. Примерами творожного сыра являются сыр фета, сыр котиха, сыр паста филата, такой как моцарелла, и сыр кесо фреско. Примерами сыра с белой плесенью являются сыр бри и камамбер. Примерами сыра с голубой плесенью являются сыр горгонзола и дэниш блю.

Используемый здесь термин "эндогенный" относится к нуклеотидной или аминокислотной последовательности, которая в природе присутствует в данном хозяине.

Эндопептидазы, эндопротеиназы или эндопротеазы представляют собой ферменты, которые способны расщеплять пептидные связи нетерминальных аминокислот (то есть в пределах белка), в отличие от экзопептидаз, которые расщепляют пептидные связи с амино- или карбоксильного конца. Эндопептидазы не имеют тенденции к расщеплению пептидов на мономеры, но приводят к образованию относительно крупных пептидных фрагментов. Специфическое образование относительно крупных фрагментов является весьма предпочтительным во многих применениях, связанных с пищевыми и кормовыми продуктами. Конкретным примером эндопептидазы является олигопептидаза, субстратами которой являются олигопептиды вместо белков.

Термин "экспрессия" включает любую стадию, вовлеченную в продукцию полипептида, включая, но без ограничения, транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционную модификацию и секрецию.

Экспрессионный вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид, функционально связанный с подходящими контрольными последовательностями (такими как промотор и сигналы остановки транскрипции и трансляции) для экспрессии и/или трансляции полинуклеотида *in vitro* или в клетке-хозяине.

Экспрессионным вектором может являться любой вектор (например, плазмидный или вирусный), который легко может быть подвергнут процедурам рекомбинации ДНК и может осуществлять экспрессию полинуклеотида. Выбор вектора обычно будет зависеть от совместимости вектора с клеткой, в которую вектор следует ввести. Векторы могут быть линейными или циклически замкнутыми плазмидами. Вектор может быть автономно реплицирующимся, то есть вектором, который существует как внехромосомный организм, репликация которого не зависит от хромосомной репликации, как, например, у плазмиды, внехромосомного элемента, мини-хромосомы или искусственной хромосомы. В качестве альтернативы вектор может быть таким, что при введении в клетку-хозяина он интегрируется в геном и реплицируется вместе с хромосомой(ми), в которую был интегрирован. Интегративный клонирующий вектор можно интегрировать в случайный или предварительно определенный локус мишени в хромосомах клетки-хозяина. Векторная система может представлять собой единичный вектор или плазмиду, либо два или более вектора или плазмид, которые вместе содержат тотальную ДНК для того, чтобы их можно было ввести в геном клетки-хозяина или в транспозон.

Клетка-хозяин, как определено здесь, представляет собой организм, подходящий для генетической манипуляции, и который может быть культивирован при значениях клеточной плотности, применяемой в промышленном производстве целевого продукта, такого как полипептид согласно настоящему изобретению. Клетка-хозяин может представлять собой клетку-хозяина, обнаруживаемую в природе, или клетку-хозяина, полученную из родительской клетки-хозяина в результате генетической манипуляции или классического мутагенеза. Предпочтительно клетка-хозяин представляет собой рекомбинантную клетку-хозяина.

Клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую, архебактериальную или эукариотическую клетку-хозяина. Прокариотическая клетка-хозяин может представлять собой, но без ограничения, бактериальную клетку-хозяина. Эукариотическая клетка-хозяин может представлять собой, но без ограничения, клетку-хозяина дрожжей, грибов, амёб, водорослей, растения, животного или насекомого.

Используемый здесь термин "гетерологичные" относится к нуклеотидным или аминокислотным последовательностям, которые в природе не встречаются в данной клетке-хозяине. Другими словами, указанные нуклеотидные или аминокислотные последовательности не идентичны нуклеотидным или аминокислотным последовательностям, в природе встречающимся в данной клетке-хозяине.

Термин "гибридизация" означает спаривание в основном комплементарных цепей олигомерных соединений, таких как нуклеиновые кислоты.

Гибридизация может быть выполнена в условиях низкой, средней или высокой жесткости. Гибридизация в условиях низкой жесткости включает гибридизацию в 6X хлориде натрия/цитрате натрия (SSC) при температуре примерно 45°C с последующими двумя промывками в 0,2X SSC, 0,1% SDS при температуре не менее 50°C (температура промывок может быть повышена до 55°C для условий низкой жесткости). Гибридизация в условиях средней жесткости включает гибридизацию в 6X SSC при температуре примерно 45°C с последующей одной или несколькими промывками в 0,2X SSC, 0,1% SDS при 60°C, и гибридизация в условиях высокой жесткости включает гибридизацию в 6X SSC при температуре около 45°C с последующей одной или несколькими промывками в 0,2X SSC, 0,1% SDS при 65°C.

Нуклеотидная или полинуклеотидная последовательность определена в настоящем документе как нуклеотидный полимер, содержащий по меньшей мере 5 нуклеотидов или нуклеотидных звеньев. Нуклеотид или нуклеиновая кислота относится к РНК и ДНК.

Термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотидная последовательность" используются здесь взаимозаменяемо.

"Пептид" относится к короткой цепи аминокислотных остатков, связанных пептидными (амидными) связями. Самый короткий пептид, дипептид, состоит из 2 аминокислот, соединенных простой пептидной связью.

Термин "полипептид" относится к молекуле, содержащей аминокислотные остатки, связанные пептидными связями и содержащие более пяти аминокислотных остатков. Используемый здесь термин "белок" является синонимом термину "полипептид" и может также относиться к двум или более полипептидам. Таким образом, термины "белок" и "полипептид" могут быть использованы взаимозаменяемо. Полипептиды могут быть необязательно модифицированы (например, гликозилированы, фосфорилированы, ацилированы, фарнезилированы, пренилированы, сульфонируются и т.д.) для добавления функциональности. Полипептиды, проявляющие активность в присутствии специфического субстрата в определенных условиях, могут называться ферментами. Следует понимать, что вследствие вырожденности генетического кода может быть получено множество нуклеотидных последовательностей, кодирующих

один полипептид.

"Изолированный фрагмент нуклеиновой кислоты" представляет собой фрагмент нуклеиновой кислоты, который не существует в природе в виде фрагмента и не обнаруживается в природном состоянии.

Используемый здесь термин "изолированный полипептид" означает полипептид, который отделен по меньшей мере от одного компонента, например другого полипептидного материала, с которым он ассоциирован в природе. Изолированный полипептид может не содержать какие-либо другие примеси. Изолированный полипептид может иметь чистоту по меньшей мере 50%, например по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9% по результатам анализов методом SDS-PAGE или любого другого аналитического метода, подходящего для этой цели и известного специалисту в данной области. Изолированный полипептид может продуцироваться рекомбинантной клеткой-хозяином.

"Зрелый полипептид" определяется в настоящем документе как полипептид в его конечной форме и получен в результате трансляции мРНК в полипептид и посттрансляционных модификаций указанного полипептида. Посттрансляционные модификации включают N-концевой процессинг, C-концевое усечение, гликозилирование, фосфорилирование и удаление лидерных последовательностей, таких как сигнальные пептиды, пропептиды и/или препропептиды, путем расщепления.

"Последовательность, кодирующая зрелый полипептид" означает полинуклеотид, который кодирует зрелый полипептид.

Используемый в настоящем документе термин "конструкция нуклеиновой кислоты" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, одноцепочечной или двухцепочечной, которая выделена из существующего в природе гена или которая модифицирована таким образом, что содержит сегменты нуклеиновых кислот, которые объединены и наложены друг на друга таким образом, который не встречается в природе. Термин "конструкция нуклеиновой кислоты" является синонимом термину "кассета экспрессии", если конструкция нуклеиновой кислоты содержит все контрольные последовательности, необходимые для экспрессии кодирующей последовательности, при этом указанные контрольные последовательности функционально связаны с указанной кодирующей последовательностью.

"Пролин-специфическая эндопротеаза" представляет собой протеазу, которая гидролизует белок или пептид в положении, в котором белок или пептид содержит остаток пролина. Пролин-специфическая эндопротеаза может обладать активностью пролин-специфической эндопротеазы и/или пролин-специфической олигопептидазы (ЕС3.4.21.26). Пролин-специфическая эндопротеаза предпочтительно представляет собой фермент, который гидролизует пептидную связь на карбокси-конце остатков пролина, что приводит к образованию пептидного и/или полипептидного фрагмента с C-концевым пролином.

Термин "промотор" определен в настоящем документе как последовательность ДНК, которая связывается с РНК-полимеразой и направляет полимеразу в правильный нижележащий сайт начала транскрипции нуклеотидной последовательности для инициации транскрипции.

Термин "рекомбинантная" ("рекомбинантный") при использовании в отношении клетки, нуклеиновой кислоты, белка или вектора означает, что клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были модифицированы путем введения гетерологичной нуклеиновой кислоты или белка, или путем изменения нативной нуклеиновой кислоты или белка, или что клетка получена из модифицированной таким образом клетки. Таким образом, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, которые не найдены в нативной (не рекомбинантной) форме клетки, или экспрессируют нативные гены, которые в ином случае аномально экспрессируются, экспрессия которых снижена или отсутствует совсем. Термин "рекомбинантный" является синонимом "генетически модифицированный" и "трансгенный".

Термины "идентичность последовательностей" или "гомология последовательностей" используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Для целей данного изобретения в настоящем документе принимается, что для выявления процента гомологии или идентичности двух аминокислотных последовательностей или двух последовательностей нуклеиновой кислоты указанные последовательности выравниваются с целью оптимального сравнения. Для оптимизации выравнивания между двумя последовательностями могут быть введены разрывы (гэпы) в любую из двух сравниваемых последовательностей. Такое выравнивание может быть проведено по всей длине сравниваемых последовательностей. Альтернативно выравнивание может быть проведено по более короткой длине, например около 20, около 50, около 100 или более нуклеиновых кислот/оснований или аминокислот. Идентичность последовательностей представляет собой процент идентичных совпадений между двумя последовательностями по указанной выровненной области. Процент идентичности последовательностей между двумя аминокислотными последовательностями или между двумя нуклеотидными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Нидлмана-Вунша для выравнивания двух последовательностей. (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453). Аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности могут быть выровнены с помощью указанного алгоритма. Алгоритм Нидлмана-Вунша внедрен в компьютерную программу NEEDLE. Для целей настоящего изобретения использовались программа NEEDLE пакета программ EMBOSS (версии 2.8.0 или более поздней, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. *Trends in Genet-*

ics 16, (6) p. 276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Для белковых последовательностей использовали матрицу замен EBLOSUM62. Для нуклеотидной последовательности использовали EDNAFULL. Оптимальными используемыми параметрами являются штраф за открытие гэпа, равный 10, и штраф за продолжение гэпа, равный 0,5. Специалист в данной области поймет, что все эти различные параметры будут давать несколько отличающиеся результаты, но что общая процентная идентичность двух последовательностей значительно не изменяется при использовании разных алгоритмов.

После выравнивания с помощью описанной выше программы NEEDLE процент идентичности последовательностей между последовательностью запроса и последовательностью согласно изобретению рассчитывают следующим образом: число соответствующих положений в выравнивании, показывающее идентичную аминокислоту или идентичный нуклеотид в обеих последовательностях, деленное на общую длину выравнивания после вычитания общего числа гэпов в выравнивании. Идентичность, определенная здесь, может быть получена из NEEDLE путем использования опции NOBRIEF и обозначена на выходе программы как "идентичность наибольшей длины".

Последовательности нуклеиновой кислоты и белковые последовательности согласно настоящему изобретению, кроме того, могут быть использованы в качестве "последовательности запроса" для проведения поиска в общедоступных базах данных, например для идентификации других представителей семейства или родственных последовательностей. Такие поиски могут проводиться с использованием программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиски нуклеотидов в режиме BLAST могут проводиться с использованием программы NBLAST, где шкала =100, длина слова =12, с получением нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Поиски белковых последовательностей по BLAST могут проводиться с использованием программы XBLAST, где шкала =50, длина слова =3, с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам по настоящему изобретению. В варианте выравнивания с включением гэпов для целей сравнения может быть использована гэпированная версия программы Gapped BLAST, описанная Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. В случае программ BLAST и Gapped BLAST может быть использовано введение по умолчанию параметров соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. веб-страницу National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Термин "в основном чистый", используемый в отношении полипептидов, относится к полипептидному препарату, который содержит не более 50 мас.% другого полипептидного материала. Раскрытые в настоящем документе полипептиды предпочтительно находятся в основном в чистой форме. В частности, предпочтительно, чтобы раскрытые здесь полипептиды находились "по существу, в чистой форме", то есть чтобы полипептидный препарат, по существу, не содержал другого полипептидного материала. При необходимости полипептид может также, по существу, не содержать неполипептидного материала, такого как нуклеиновые кислоты, липиды, компоненты среды и т.п. В настоящем документе термин "в основном чистый полипептид" является синонимом терминам "изолированный полипептид" и "полипептид в изолированной форме". Термин "в основном чистый" в отношении полинуклеотида относится к полинуклеотидному препарату, который содержит не более 50 мас.% другого полинуклеотидного материала. Раскрытые здесь полинуклеотиды предпочтительно находятся в основном в чистой форме. В частности, предпочтительно, чтобы раскрытый здесь полинуклеотид находился "по существу, в чистой форме", то есть чтобы полинуклеотидный препарат, по существу, не содержал другого полинуклеотидного материала. При необходимости полинуклеотид может также, по существу, не содержать неполинуклеотидного материала, такого как полипептиды, липиды, компоненты среды и т.п. В настоящем документе термин "в основном чистый полинуклеотид" является синонимом терминам "изолированный полинуклеотид" и "полинуклеотид в изолированной форме".

"Синтетическую молекулу", такую как синтетическая нуклеиновая кислота или синтетический полипептид, получают путем *in vitro* химического или ферментативного синтеза. Она включает, но без ограничения, варианты последовательностей нуклеиновых кислот, полученные с использованием оптимизированных кодонов для предпочтительных организмов-хозяев.

Синтетическая нуклеиновая кислота может быть оптимизирована по кодонам, предпочтительно в соответствии со способами, описанными в WO 2006077258 и/или WO 2008000632, которые включены здесь посредством ссылки. В WO 2008000632 описана оптимизация пар кодонов. Оптимизация пар кодонов представляет собой способ, в котором нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептид, были модифицированы с точки зрения используемых в них кодонов, в частности используемых пар кодонов, для обеспечения улучшенной экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, и/или улучшенного продуцирования кодированного полипептида. Пары кодонов определены как набор из двух последовательных триплетов (кодонов) в кодирующей последовательности. Специалистам в данной области известно, что использование кодонов необходимо адаптировать в зависимости от вида хозяина, что, возможно, приведет к получению вариантов со значительным отклонением по гомологии от SEQ ID NO: 1, но все еще кодирующих полипептид в соответствии с изобретением.

Используемые здесь термины "вариант", "производное", "мутант" или "гомолог" могут быть использованы взаимозаменяемо. Они могут относиться к полипептидам или нуклеиновым кислотам. Вари-

анты включают замены, вставки, делеции, усечения, трансверсии и/или инверсии в одной или нескольких локализаций относительно референсной последовательности. Варианты могут быть сделаны, например, с помощью сайт-насыщающего мутагенеза, сканирующего мутагенеза, инсерционного мутагенеза, неспецифического мутагенеза, сайт-направленного мутагенеза и направленной эволюции, а также различных других рекомбинантных подходов, известных специалисту в данной области. Различные гены нуклеиновых кислот могут быть синтезированы искусственно с помощью известных технологий в данной области.

Описание чертежа

Вектор pGBTOP-16, используемый для клонирования гена GLA. Вектор pGBTOP-16 получен из вектора pGBTOP-12, описанного в WO 2011009700. В дополнение к pGBTOP-12 он содержит ген *ccdB* из *E. coli* для положительной селекции в отношении присутствия вставки между сайтами клонирования EcoRI и PacI. Сайт рестрикции PacI заменяет сайт рестрикции SnaBI, присутствующий в pGBTOP-12. Этот вектор линеаризован путем расщепления с помощью NotI перед трансформацией.

Подробное описание изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, обладающему активностью пролин-специфической эндопротеазы, выбранному из группы, состоящей из

- i. полипептида, содержащего последовательность зрелого полипептида, представленную в SEQ ID NO: 2;
- ii. полипептида, который имеет последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательности зрелого полипептида, представленной в SEQ ID NO: 2;
- iii. полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, которая гибридизуется в условиях средней жесткости, предпочтительно в условиях высокой жесткости с цепью, комплементарной последовательности, кодирующей зрелый полипептид, представленной в SEQ ID NO: 1;
- iv. полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, которая имеет последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную последовательности, кодирующей зрелый полипептид, представленной в SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к полипептиду, который представляет собой изолированный, в основном чистый, чистый, рекомбинантный, синтетический или вариантный полипептид описанного здесь полипептида.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к изолированному полипептиду, обладающему активностью пролин-специфической эндопротеазы, содержащему аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2. Описанная здесь пролин-специфическая эндопротеаза может быть получена из *Rasamsonia emersonii*. Выражение "полученный из" или "может быть получен из" в отношении происхождения раскрытого здесь полипептида означает, что при проведении поиска BLAST с полипептидом в соответствии с настоящим изобретением указанный полипептид согласно настоящему изобретению может быть получен из природного источника, такого как микробная клетка, при этом эндогенный полипептид показывает самый высокий процент гомологии или идентичности с описанным здесь полипептидом.

Предпочтительно полипептид, содержащий пролин-специфическую эндопротеазу, обеспеченную настоящим изобретением, является относительно термически устойчивым. Удивительным образом было обнаружено, что полипептид согласно настоящему изобретению является более термически устойчивым, чем пролин-специфическая эндопротеаза из *Aspergillus niger*. Было обнаружено, что полипептид согласно настоящему изобретению обладает по меньшей мере 50%, или по меньшей мере 55%, или по меньшей мере 60% остаточной активностью после пребывания полипептида при температуре по меньшей мере 70°C в течение 15 мин, например при 70°C в течение 15 мин или при 71°C в течение 15 мин, при этом активность измеряли с помощью Ацетил AlaAlaPro-пара-нитроанилина (Ac-AAP-pNA) в качестве субстрата. Таким образом, описанную здесь пролин-специфическую эндопротеазу можно легко использовать для производства пищевых продуктов, при этом в пищевой промышленности желательно использовать фермент при более высоких температурах, например во время приготовления затора в процессе производства пива.

Предпочтительно предлагаемый в изобретении полипептид может представлять собой полипептид, который имеет последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательности зрелого полипептида, представленной в SEQ ID NO: 2. Полипептид согласно SEQ ID NO: 2 содержит пре-про-последовательность. При секреции полипептида через мембрану клетки хозяина происходит удаление пре-про-последовательности, такой как аминокислоты с 1 по 35, с 1 по 36, с 1 по 37, с 1 по 38, с 1 по 39, с 1 по 40, с 1 по 41, с 1 по 42, с 1 по 43, с 1 по 44, с 1 по 45, с 1 по 46, с 1 по 47, с 1 по 48, с 1 по 49, с 1 по 50 или с 1 по 51 последовательности SEQ ID NO: 2. Последовательность зрелого полипептида, обладающая активностью пролин-специфической эндопротеазы, представленная в SEQ ID NO: 2, может содержать аминокислоты с 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или 51 по аминокислоты 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520 или 526 последовательности SEQ ID NO: 2, при этом аминокислота метионин в положении 1 в SEQ ID NO: 2 обозначена

номером 1. Последовательность зрелого полипептида, представленная в SEQ ID NO: 2, может включать или содержать аминокислоты с 36 по 526 последовательности SEQ ID NO: 2, при этом аминокислоте метионину в положении 1 в SEQ ID NO: 2 присвоен номер 1.

Полипептид в соответствии с настоящим изобретением может быть кодирован любой подходящей полинуклеотидной последовательностью. Обычно полинуклеотидная последовательность представляет собой последовательность, оптимизированную по кодонам или парам кодонов для экспрессии полипептида, описанного здесь, в конкретной клетке-хозяине.

Полипептид, описанный здесь, может быть кодирован полинуклеотидом, который гибридизуется в условиях средней жесткости, предпочтительно в условиях высокой жесткости с цепью, последовательность которой комплементарна последовательности, кодирующей зрелый полипептид, представленной в SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 1 представляет собой кодон-оптимизированную полинуклеотидную последовательность для экспрессии полипептида, описанного здесь, в клетке-хозяине *Aspergillus niger*.

Полипептид, описанный здесь, может быть также кодирован нуклеиновой кислотой, которая имеет последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную последовательности, кодирующей зрелый полипептид, представленной в SEQ ID NO: 1.

Полипептид, обладающий активностью пролин-специфической эндопротеазы, как описано здесь, может также представлять собой вариант зрелого полипептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 2, содержащую замену, делецию и/или вставку в одном или нескольких положениях зрелого полипептида SEQ ID NO: 2. Вариант зрелого полипептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 2, может представлять собой аминокислотную последовательность, которая отличается на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислот от аминокислот зрелого полипептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение характеризует биологически активный фрагмент описанного здесь полипептида.

Биологически активные фрагменты полипептида согласно изобретению включают полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности, в достаточной мере идентичные аминокислотной последовательности белка, пролин-специфической эндопротеазы, или полученные из нее (например, зрелая аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 2), которые включают меньшее число аминокислот, чем белок полной длины, но проявляют по меньшей мере одну биологическую активность соответствующего белка полной длины. В типичном случае биологически активные фрагменты включают домен или мотив по меньшей мере с одной активностью, свойственной белку, пролин-специфической эндопротеазе. Биологически активный фрагмент может, например, содержать каталитический домен. Биологически активный фрагмент белка по настоящему изобретению может представлять собой полипептид, который включает, например, 10, 25, 50, 100 или более аминокислот в длину. Кроме того, рекомбинантными методиками могут быть получены другие биологически активные части, в которых делетированы другие области белка, и оценены на наличие одной или более биологических активностей, свойственных нативной форме полипептида по настоящему изобретению.

В изобретении также предлагаются фрагменты нуклеиновых кислот, которые кодируют указанные выше биологически активные фрагменты белка, пролин-специфической эндопротеазы.

Полипептид согласно настоящему изобретению может представлять собой слитый белок. Методы для получения слитых полипептидов известны из уровня техники и включают лигирование кодирующих последовательностей, кодирующих полипептиды так, чтобы они находились в рамке. Экспрессия слитого полипептида находится под контролем одного и того же промотора(ов) и терминатора. Гибридные полипептиды могут содержать комбинацию частичных или полных полипептидных последовательностей, полученных по меньшей мере из двух различных полипептидов, где один или более могут являться гетерологичными для клетки-хозяина. Такие слитые полипептиды по меньшей мере из двух различных полипептидов могут содержать связывающий домен из одного полипептида, функционально связанный с каталитическим доменом из второго полипептида. Примеры слитых полипептидов и слитых сигнальных последовательностей описаны, например, в WO 2010121933, WO 2013007820 и WO 2013007821.

Полипептид в соответствии с настоящим изобретением может быть получен из любого подходящего эукариота. Эукариотическая клетка может представлять собой клетку млекопитающего, насекомого, растения, гриба или водорослей.

Полипептид в соответствии с настоящим изобретением может быть также получен из клетки мицелиального гриба или клетки термофильного мицелиального гриба. Предпочтительные клетки мицелиальных грибов принадлежат к видам рода *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Rasamsonia*, *Thielavia*, *Fusarium* или *Trichoderma*, *Amorphotheca*, *Pseudocercospora*, *Trametes*, *Rhizomucor*, *Calcarisporiella*, *Thermomyces*, *Thermoascus*, *Cornyascus*, *Myricocum*, *Scytalidium*, *Chaetomium*, *Paecilomyces*, *Corynascus*, *Malbranchea*, *Stilbella*, *Thermomyces*, *Dactylomyces*, *Humicola*, *Chaetomium*, *Melanocarpus*, *Rhizomucor*, *Lentinula*, *Anaeromyces*, и наиболее предпочтительно принадлежат видам *Aspergillus niger*, *Acremonium alabamense*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus fumigatus*, *Talaromyces emersonii*, *Rasamsonia emersonii*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium oxysporum*, *Myceliophthora thermophila*, *Trichoderma reesei*, *Thielavia terrestris*,

Penicillium chrysogenum, *Amorphotheca resinae*, *Aureobasidium pullulans*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Trametes versicolor* 52J, *Rhizomucor pusillus*, *Calcarisporiella thermophila*, *Talaromyces thermophilus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoascus auratiacus*, *Cornyascus thermophilus*, *Myricoccum thermophilum*, *Scytalidium thermophilum*, *Myceliophthora hinnulea*, *Chaetomium thermophilum*, *Paecilomyces bryosochlamydoideus*, *Corynascus sepedonium*, *Malbranchea cinnamomea*, *Thielavia australiensis*, *Stilbella thermophila*, *Thermomyces stellatus*, *Talaromyces emersonii*, *Dactylomyces thermophilus*, *Humicola hyalothermophila*, *Acremonium thermophilum*, *Chaetomium olivicolor*, *Melanocarpus albomyces*, *Rhizomucor miehei*, *Lentinula edodes* или *Anaeromyces mucronatus*. Предпочтительно полипептид получен из *Rasamsonia emersonii*.

Полипептид в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой полипептид природного происхождения, или генетически модифицированный, или рекомбинантный полипептид.

Полипептид, описанный здесь, может быть очищенным. Очистка белка известна специалистам в данной области.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей описанный здесь полипептид.

Описанная здесь композиция может содержать носитель, вспомогательное вещество, дополнительный фермент или другие соединения. Как правило, композиция или состав содержит соединение, с которым может быть составлена пролин-специфическая эндопротеаза. Используемое здесь вспомогательное вещество представляет собой неактивное вещество, составленное вместе с полипептидом, описанным здесь, например сахарозу или лактозу, глицерин, сорбитол или хлорид натрия. Композиция, содержащая описанный здесь полипептид, может представлять собой жидкую композицию или твердую композицию. Жидкая композиция обычно содержит воду. При составлении в виде жидкой композиции указанная композиция, как правило, содержит компоненты, которые понижают активность воды, такие как глицерин, сорбитол или хлорид натрия (NaCl). Твердая композиция, содержащая описанный здесь полипептид, может содержать гранулы, содержащий фермент, или композиция содержит инкапсулированный полипептид в жидких матрицах, таких как липосомы, или гели, таких как альгинат или каррагинаны. Существует много технологий, известных в данной области, для инкапсулирования или гранулирования полипептида или фермента (см., например, G.M.H. Meesters, "Encapsulation of Enzymes and Peptides", Chapter 9, in N.J. Zuidam and V.A. Nedović (eds.) "Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and food processing" 2010). Описанная здесь композиция может также включать носитель, содержащий описанный здесь полипептид. Описанный здесь полипептид может быть связан или иммобилизован на носитель с помощью известных в данной области технологий.

Настоящее изобретение также относится к процессу приготовления композиции, содержащей описанный здесь полипептид, при этом указанный процесс может включать сушку распылением ферментационной среды, содержащей полипептид, или гранулирование, или инкапсулирование описанного здесь полипептида и приготовление композиции.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотидной последовательности, кодирующей описанный здесь полипептид, которая имеет последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, или последовательности, кодирующей зрелый полипептид, представленной в SEQ ID NO: 1. Описанная здесь полинуклеотидная последовательность может содержать SEQ ID NO: 1 или может содержать последовательность, кодирующую зрелый полипептид, представленную в SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения описана нуклеиновая кислота, которая представляет собой изолированную, в основном чистую, чистую, рекомбинантную, синтетическую или вариантную нуклеиновую кислоту нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 1. Например, вариантная нуклеотидная последовательность может быть по меньшей мере на 70% идентична SEQ ID NO: 1.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору, содержащему описанный здесь полинуклеотид, функционально связанный с одной или более чем одной контрольной последовательностью(ми), которая направляет экспрессию полипептида на экспрессию в клетке-хозяине.

Существует несколько способов вставки нуклеиновой кислоты в конструкцию нуклеиновой кислоты или экспрессионный вектор, которые известны специалистам в данной области, см., например, Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001. Также может быть желательно манипулировать нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид согласно настоящему изобретению, с помощью контрольных последовательностей, таких как промоторные и терминаторные последовательности.

Промотор может представлять собой любую соответствующую промоторную последовательность, подходящую для эукариотической или прокариотической клетки-хозяина, которая демонстрирует транскрипционную активность, включая мутантные, усеченные и гибридные промоторы, и может быть получен из полинуклеотидов, кодирующих внеклеточные или внутриклеточные полипептиды, эндогенные (нативные) или гетерологичные (чужеродные) для клетки. Промотор может представлять собой конститутивный или индуцируемый промотор. Предпочтительно промотор представляет собой индуцируемый промотор, например индуцируемый крахмалом промотор. Промоторы, подходящие для использования в

мицелиальных грибах, представляют собой промоторы, которые могут быть выбраны из группы, включающей, но без ограничения, промоторы, полученные из полинуклеотидов, кодирующих ТАКА амилазу *A. oryzae*; аспарагиновую протеиназу *Rhizomucor miehei*; промотор *Aspergillus gpdA*; нейтральную альфа-амилазу *A. niger*; устойчивую к действию кислоты альфа-амилазу *A. niger*; глюкоамилазу (*glaA*) *A. niger* или *A. awamori*; эндоксилазу (*xlnA*) или бета-ксилозидазу (*xlnD*) *A. niger* или *A. awamori*., целлобиогидролазу I (СВН) *T. reesei*; липазу *R. miehei*; щелочную протеазу *A. oryzae*; триозофосфат изомеразу *A. oryzae*; ацетамидазу *A. nidulans*; амилоглюкозидазу *Fusarium venenatum* (WO 0056900); *Dania Fusarium venenatum* (WO 0056900); *Quinn Fusarium venenatum* (WO 0056900); трипсинподобную протеазу *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787); бета-глюкозидазу *Trichoderma reesei*; целлобиогидролазу I *Trichoderma reesei*; целлобиогидролазу II *Trichoderma reesei*; эндоглюканазу I *Trichoderma reesei*; эндоглюконазу II *Trichoderma reesei*; эндоглюконазу III *Trichoderma reesei*; эндоглюконазу IV *Trichoderma reesei*; эндоглюконазу V *Trichoderma reesei*; ксиланазу I *Trichoderma reesei*; ксиланазу II *Trichoderma reesei*; бета-ксилозидазу *Trichoderma reesei*; а также промотор NA2-tpi (гибрид промоторов из полинуклеотидов, кодирующих нейтральную альфа-амилазу *A. niger* и триозофосфат изомеразу *A. oryzae*), и их мутантные, усеченные и гибридные промоторы.

Может быть использован любой терминатор, который является функциональным в клетке, описанной здесь, известный специалисту в данной области. Примеры терминаторных последовательностей, подходящих для использования в мицелиальных грибах, включают терминаторные последовательности гена мицелиальных грибов, такие как из генов *Aspergillus*, например, из гена амилазы ТАКА *A. oryzae*, генов, кодирующих глюкоамилазу (*glaA*) *A. niger*, антранилат синтазу *A. nidulans*, альфа-глюкозидазу *A. niger*, *trpC* и/или трипсинподобную протеазу *Fusarium oxysporum*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей описанную здесь конструкцию нуклеиновой кислоты или экспрессионный вектор. Подходящая клетка-хозяин может представлять собой клетку млекопитающего, насекомого, растения, грибов, или водорослей, или клетку бактерий. Подходящая клетка-хозяин может представлять собой клетку грибов, например из рода *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Rasamsonia*, *Talaromyces*, *Thielavia*, *Trichoderma*, *Saccaromyces*, *Kluveromyces*, *Pichia*, например, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *Talaromyces emersonii*, *Rasamsonia emersonii*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium oxysporum*, *Myceliophthora thermophila*, *Thielavia terrestris* или *Trichoderma reesei*, или *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveromyces lactis*, *Pichia pastoris*.

Клетка-хозяин может представлять собой рекомбинантную или трансгенную клетку-хозяина. Клетка-хозяин может быть генетически модифицирована конструкцией нуклеиновой кислоты или экспрессионным вектором, описанным здесь, с помощью стандартных методик, известных в данной области, таких как электропорация, трансформация протопласта или конъюгация, например, описанных в Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к процессу получения полипептида, описанного здесь, включающему культивирование клетки-хозяина в подходящей ферментационной среде в условиях, подходящих для получения и продуцирования полипептида. Специалисту в данной области будет понятно, как выполнить процесс для получения полипептида, описанного здесь, в зависимости от используемой клетки-хозяина, например pH, температуры и состава ферментационной среды. Клетки-хозяева могут быть культивированы во встряхиваемых колбах или в ферментерах объемом от 0,5 до 1 л или более крупных до 10, 100 или более кубических метров. Культивирование может быть выполнено в аэробных или анаэробных условиях в зависимости от требований, предъявляемых клеткой-хозяином.

Предпочтительно описанный здесь полипептид извлекают или изолируют из ферментационной среды.

Полипептид, обладающий активностью пролин-специфической эндопротеазы, или композицию, содержащую описанный здесь полипептид, можно использовать в разнообразных применениях, например, в производстве пищевого или кормового продукта, таком как производство белкового гидролизата. Некоторые пищевые белки содержат высокоаллергенные субфракции, которые могут быть даже токсичными для определенных индивидуумов, такие как глютен, который содержит проламины с богатыми пролином пептидными последовательностями. Эти белки могут быть подвергнуты воздействию нового фермента для ослабления их антигенности или токсичности.

Группа людей, для которых глютен является токсичным, представляет собой индивидуумов, страдающих целиакией спру, также известной как глютеновая болезнь, которая представляет собой аутоиммунное заболевание тонкого кишечника, вызванное приемом внутрь клейковинных белков зерновых, таких как альфа-глиадин из пшеницы, хордеин из ячменя, секалин из ржи и авенин из овса.

Таким образом, полипептид, обладающий активностью пролин-специфической эндопротеазы, или композиция, содержащая описанный здесь полипептид, может быть использована в производстве диетической добавки или в качестве лекарственного средства для лечения пациента, страдающего целиакией спру, и/или для лечения людей, не переносящих глютен.

Описанный здесь полипептид может быть также использован в качестве обрабатывающей добавки для гидролиза глютена в пищевом продукте.

Таким образом, настоящее изобретение относится к процессу производства пищевого или кормового продукта, включающему инкубацию промежуточной формы пищевого или кормового продукта с полипептидом или композицией, содержащей описанный здесь полипептид, и производство пищевого или кормового продукта. Пищевой продукт в описанном здесь процессе включает напиток, такой как пиво, вино или фруктовый сок, или выпечку, или молочный продукт, но ими не ограничивается.

Инкубация промежуточной формы пищевого или кормового продукта с полипептидом или композицией, содержащей описанный здесь полипептид, может включать добавление полипептида или композиции, содержащей полипептид, в промежуточную форму пищевого или кормового продукта.

Процесс производства пищевого продукта может представлять собой процесс производства пива. Как правило, процесс производства пива включает затирание солода с получением затора и фильтрацию затора с получением суслу, кипячение суслу, например с хмелем, и сбраживание суслу путем инокуляции суслу дрожжами. После сбраживания процесс производства пива обычно включает фазу созревания и стабилизации, а также обычно фазу фильтрации, в зависимости от типа получаемого пива.

Промежуточная форма пищевого продукта может представлять собой любую подходящую форму пищевого продукта во время производства пищевого продукта. Промежуточная форма пива может представлять собой, например, затор, сусло, ферментативный бульон или молодое пиво. Молодое пиво, используемое здесь, представляет собой пиво, которое получено в результате первичного сбраживания, и обычно может содержать некоторое количество неосажденных дрожжей и нежелательные вкусовые компоненты. Промежуточная форма хлеба может представлять собой, например, тесто. Предпочтительно полипептид, обладающий активностью пролин-специфической эндопротеазы, или композиция, содержащая полипептид согласно настоящему изобретению, инкубируют с затором во время приготовления затора в процессе производства пива. Удивительным образом было обнаружено, что значительное количество вызывающих помутнение белков было уменьшено с помощью полипептида согласно настоящему изобретению во время приготовления затора. Таким образом, образование помутнения в конечном пиве может быть предотвращено. Предпочтительно, чтобы полипептид, обладающий активностью пролин-специфической эндопротеазы, согласно настоящему изобретению являлся активным во время приготовления затора, поскольку после приготовления затора отделенное сусло подвергают кипячению и фермент инактивируется. Это является предпочтительным, поскольку нежелательно, чтобы ферменты являлись активными в конечном пищевом продукте, таком как пиво.

Приготовление затора представляет собой процесс, во время которого крахмал распадается на сахара под действием природных ферментов, присутствующих в зерне, известных специалисту в данной области. Как правило, приготовление затора включает постепенное доведение солода, то есть смеси молотых зерен, таких как зерна ячменного солода, и воды до температуры примерно 45-52°C, затем до температуры от 72 до 76°C за определенный интервал времени, известный специалистам в данной области. Как правило, приготовление затора включает доведение солода до температуры 45-52°C, затем до температуры от 60 до 65°C, затем до температуры примерно от 71 до 76°C и необязательно до конечной температуры от 76 до 79°C.

После приготовления затора жидкую фракцию, также называемую "сусло", отделяют от твердой фракции. Затем сусло обычно подвергают кипячению с дополнительными ингредиентами, такими как хмель. Во время кипячения суслу ферменты, присутствующие в сусле, инактивируются.

В одном варианте осуществления процесс производства пива включает инкубацию затора с полипептидом или композицией, содержащей описанный здесь полипептид, и производство пива.

Вызывающие помутнение белки представляют собой богатые пролином белки, которые могут взаимодействовать с полифенолами с образованием агрегатов белок-полифенол. Эти агрегаты белок-полифенол вызывают образование помутнения, также называемого "холодное помутнение" в пиве. Соответственно в одном аспекте настоящее изобретение относится к использованию описанного здесь полипептида или описанной композиции для уменьшения помутнения в напитке. Напиток, используемый здесь, может представлять собой пиво.

Пищевой продукт и/или промежуточная форма пищевого продукта может содержать глютен.

Было обнаружено, что описанный здесь полипептид, обладающий активностью пролин-специфической эндопротеазы, способен гидролизовать токсичные эпитопы в глютене в нетоксичные фрагменты. Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к использованию полипептида или композиции, содержащей описанный здесь полипептид, для уменьшения содержания глютена в пищевом продукте.

Процесс производства пищевого продукта в соответствии с настоящим изобретением может включать стадию пастеризации пищевого продукта. Пастеризация обычно включает нагрев пищевого продукта или промежуточной формы пищевого продукта, например путем доведения пищевого продукта или промежуточной формы пищевого продукта до температуры в диапазоне от 60 до 68°C в течение периода времени от 10 до 20 мин или от 12 до 18 мин или до температуры 70-74°C, такой как примерно 72°C, в течение периода времени по меньшей мере 5, 10 или 15 с.

Пищевой продукт в описанном здесь процессе также может представлять собой белковый гидролизат. Таким образом, настоящее изобретение относится к процессу производства белкового гидролизата,

включающему приведение в контакт белкового субстрата с полипептидом или описанной здесь композицией и получение белкового гидролизата. Белковый гидролизат может быть получен из любого подходящего белкового субстрата, например белкового субстрата, который богат остатками пролина, такими как глютен в зерновых или казеин в коровьем молоке.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к пищевому продукту, который может быть получен с помощью описанного здесь процесса производства пищевого продукта.

Следующие примеры иллюстрируют изобретение.

Примеры

Материалы и методы

Пример 1. Клонирование, экспрессия и извлечение BC2G079 пролин-специфической эндопротеазы (PEP).

Пример 1.1. Клонирование и экспрессия.

Белковая последовательность пролин-специфической эндопротеазы (PEP) *Rasamsonia emersonii* показана в SEQ ID NO: 2 и названа BC2G079 PEP.

Разработана кодон-адаптированная последовательность ДНК для экспрессии этого белка в *Aspergillus niger*, содержащая дополнительные сайты рестрикции для субклонирования в экспрессионный вектор *Aspergillus*. Адаптацию по кодонам выполняли, как описано в WO 2008000632. Кодон-оптимизированная последовательность ДНК для *A. niger* гена, кодирующего белок PEP последовательности SEQ ID: NO: 2, показана в SEQ ID NO: 1.

Последовательность инициации трансляции промотора глюкоамилазы *glaA* модифицировали в 5'-CACCGTCAAA ATG-3' и оптимальную последовательность терминации трансляции 5'-TAAA-3' использовали для создания экспрессионной конструкции (как подробно описано также в WO 2006077258). Фрагмент ДНК, содержащий часть промотора глюкоамилазы и ген, кодирующий PEP, синтезировали полностью, очищали и расщепляли с помощью *EcoRI* и *PacI* Вектор pGBTOP-16 (см. чертеж), линейаризовали путем расщепления с помощью *EcoRI/PacI* и фрагмент линейаризованного вектора затем очищали путем экстракции из геля. Фрагмент ДНК, содержащий PEP-кодирующий участок, клонировали в вектор pGBTOP-16 с получением pGBTOP-PEP. Затем GBA 306 *A. niger* ($\Delta glaA$, $\Delta pepA$, $\Delta dhfA$, адаптированный ампликон *VamHII*, негативный по альфа-амилазе и глюкоамилазе штамм *ДамуВII*, *ДамуVI*, *ДамуА*) трансформировали линейаризованным вектором pGBTOP-PEP путем расщепления с помощью *NotI*, в протоколе совместной трансформации линейаризованным pGBAAS-4, с использованием штамма и способов, описанных в заявке WO 2011009700 и приведенных в ней ссылках, и отбирали на ацетамид-содержащей среде и колонию очищали согласно стандартным процедурам. Трансформацию и отбор выполняли, как описано в WO 9846772 и WO 9932617. Штаммы, содержащие ген PEP, кодирующий BC2G079 PEP, отбирали посредством PCR с праймерами, специфическими для гена PEP, для подтверждения присутствия экспрессионной кассеты pGBTOP-PEP. Отбирали единичный трансформант, названный PEP1, и затем высевали методом реплик с получением одноштаммового инокулята.

Пример 1.2. Продуцирование BC2G079 PEP в штамме PEP1 *A. niger*.

Готовили свежие споры PEP-1 *A. niger*. Каждую из 4 встряхиваемых колб объемом 500 мл, снабженных перегородками и содержащих 100 мл ферментационной среды 1 (10% мас./об. Corn Steep Solids, 1% мас./об. глюкозы·H₂O, 0,1% мас./об. NaH₂PO₄·H₂O, 0,05% мас./об. MgSO₄·7H₂O, 0,025% мас./об. Basil-don, pH 5,8), инокулировали 10⁷ спор. Эти предварительные культуры инкубировали при 34°C и 170 об/мин в течение 16-24 ч. Из предварительных культур 50 мл использовали для инокуляции 1 встряхиваемой колбы объемом 5 л, содержащей 1 л ферментационной среды 2 (15% мас./об. мальтозы, 6% мас./об. Vacto-Soytone, 1,5% мас./об. (NH₄)₂SO₄, 0,1% мас./об. NaH₂PO₄·H₂O, 0,1% мас./об. MgSO₄·7H₂O, 0,1% мас./об. L-аргинина, 8% мас./об. Tween-80, 2% мас./об. Basil-don, 2% мас./об. MES, pH 5,1), и встряхивали при 34°C и 170 об/мин. Через 3, 4, 5 и 6 дней инкубации pH культуры понижали до pH 5,0 с помощью 2N HCl и образцы, взятые в каждый указанный момент времени, анализировали на активность PEP. Отбирали образцы объемом 50 мл, супернатант отделяли от биомассы путем центрифугирования и затем фильтровали. Образцы с самой высокой активностью использовали для характеристики полученной PEP.

Пример 1.3. Продуцирование референсной пролин-специфической эндопротеазы из *A. niger*.

Пролин-специфическая эндопротеаза из *A. niger* известна из WO 2002046381. Белковая последовательность пролин-специфической эндопротеазы (PEP) из *A. niger* показана в SEQ ID NO: 5, в которой первые 17 аминокислот представляют собой сигнальную последовательность пектинметилэстеразы *A. niger* (PMeA ss; SEQ ID NO: 3) и следующая часть содержит 19 аминокислот пропоследовательности пролин-специфической эндопротеазы *A. niger* (SEQ ID NO: 4).

Экспрессию и получение PEP из *A. niger* выполняли таким же способом, который описан в примере 1.1 и 1.2. PEP *A. niger* использовали в качестве референсного фермента в примере 2.

Пример 2. Измерение активности пролин-специфической эндопротеазы (PEP).

100 мкл полученного в примере 1 супернатанта культуры, разбавленного в 0,1M буферном растворе ацетата натрия при pH 4,5 с помощью 50 mM NaCl, инкубировали с 100 мкл 6 mM Ac-AAP-pNA (ацетил-AlaAlaPro-паранитроанилин от фирмы Selleckchem или CPC Scientific; чистота >95,0% по данным анализа HPLC) в 0,1 M буферном растворе NaAc при pH 4,5 с 50 mM NaCl, в 96-луночной планшете фирмы

Nunc с плоским дном МТР (микротитровальный планшет). Через 60 мин при 20°C реакцию останавливали путем добавления 40 мкл 1М HCl. Высвобождение рНА из РЕР измеряли на спектрофотометре Tecan МТР при длине волны 405 нм (A405) (www.tecan.com). Контрольный образец готовили путем смешивания разбавленного супернатанта культуры с раствором субстрата, который предварительно был смешан с раствором HCl. Активность выражали в единицах рNASU. Единица рNASU представляет собой количество фермента, которое освобождает из Ас-ААР-рНА за 1 ч количество рНА, которое соответствует увеличению поглощения при 405 нм 1 OD с использованием условий, описанных выше. Величина A405 не должна быть ниже контрольной величины в начале реакции, или выше 2,5 в конце реакции, или A405 не может превышать линейный диапазон используемого спектрофотометра.

Таблица 1. Относительная активность BC2G079 РЕР по сравнению с референсной РЕР

Описание	Активность (рNASU/мл)	Специфическая активность (рNASU/мг)
Референсная РЕР	100%	100%
BC2G079 РЕР	171%	150%

Для сравнения специфической активности BC2G079 РЕР с референсной РЕР белковые концентрации соответственно BC2G079 РЕР и референсной РЕР определяли путем измерения поглощения при длине волны 280 нм после гель-фильтрации на колонке PD10 для удаления низкомолекулярных соединений, которые могут препятствовать измерению при 280 нм. Количественный анализ SDS-PAGE, проведенный, как описано в WO 2013160316, показал, что более 80% присутствующего белка представляет собой искомую РЕР. Коэффициент экстинкции рассчитывали с использованием инструмента Prot Param, как описано на сайте <http://web.expasy.org/protparam/>. Зрелую последовательность SEQ ID NO: 2 (аминокислоты 36-526) использовали для расчета коэффициента экстинкции для BC2G079 РЕР ($A_{280}^{1\text{см}, 1\text{мг/мл}}=2,81$). Зрелую последовательность SEQ ID NO: 5 (аминокислоты 37-521) использовали для референсной РЕР ($A_{280}^{1\text{см}, 1\text{мг/мл}}=3,05$).

Пример 3. Термическая устойчивость BC2G079 пролин-специфической эндопротеазы (РЕР).

Для оценки термической устойчивости BC2G079 РЕР перед анализом активности проводили инкубацию аликвот объемом 100 мкл десятикратного разведения полученного в примере 1 супернатанта культуры в буфере (0,1 М NaAc, pH 4,5, с 50 mM NaCl) при 55 и 65°C в течение 15 мин в планшете PCR в PCR-машине. Через 15 мин инкубации образцы быстро охлаждали до 25°C в PCR-машине. Измеряли рNASU/мл каждого образца. Исходную активность, измеренную до инкубации при повышенной температуре (0 мин), использовали в качестве контроля (100%) для определения остаточной активности.

Таблица 2. Активность пролин-специфической эндопротеазы BC2G079 РЕР через 15 мин инкубации при 55 и 65°C.

Описание	Остаточная активность через 15 мин при 55°C (рNASU)	Остаточная активность через 15 мин при 65°C (рNASU)
BC2G079 РЕР	105%	84%

Результаты в табл. 1 показывают, что BCG079 РЕР, полученная из *Rasamsonia emersonii*, является относительно устойчивой при температуре 65°C.

Пример 5. Профиль термической устойчивости BC2G079 РЕР по сравнению с референсной РЕР из *A. niger*.

Для оценки профиля термической устойчивости BC2G079 РЕР в более экстремальных условиях анализу активности предшествовала стадия нагрева. Аликвоты объемом 100 мкл полученного в примере 1 супернатанта культуры десятикратно разводили в буфере (0,1 М NaAc, pH 4,5, с помощью 50 mM NaCl) и нагревали в температурной интервале в планшете PCR в PCR-машине. После инкубации в течение 15 мин образцы быстро охлаждали до 25°C в PCR-машине. Измеряли рNASU/мл каждого образца. Исходную активность, измеренную до инкубации при повышенной температуре (0 мин), использовали в качестве контроля (100%) для определения остаточной активности. Результаты в табл. 3 показывают, что пролин-специфическая эндопротеаза (BCG079) из *Rasamsonia emersonii* является в основном более термически устойчивой по сравнению с референсной пролин-специфической эндопротеазой из *A. niger*.

Таблица 3. Остаточная активность пролин-специфической эндопротеазы BC2G079 PEP и референсной PEP из *A.niger* через 15 мин инкубации при различных температурах.

Температура инкубации (°C)	Остаточная активность референсной PEP (pNASU/мл)	Остаточная активность BC2G079 (pNASU/мл)
51,4	100%	
54,4	97%	
59,0	93%	
63,5		100%
64,5	76%	
66,6		91%
69,3	24%	
71,2		65%
72,4	1%	
74,0	0%	
76,7		11%
81,4		0%

Пример 6. Профиль pH-активности BC2G079 PEP.

Для оценки рабочего pH-диапазона BC2G079 PEP супернатант культуры и субстрат Ас-ААР-pNA разбавляли в буферах в диапазоне от pH 3,5 до pH 7 (0,1 М лимонная кислота/Na₂HPO₄ с 50 мМ NaCl). Затем 100 мкл разбавленного супернатанта смешивали со 100 мкл 6 мМ раствора субстрата Ас-ААР-pNA в 96-луночном плоском планшете МТР. Реакцию останавливали через 60 мин при 20°C путем добавления 40 мкл 1 М NaOH. Активность PEP измеряли по увеличению поглощения при 405 нм. Результаты в табл. 4 показывают, что самая высокая активность для BC2G079 наблюдалась при pH=5,0, которую принимали за 100%, тогда как референсная PEP из *A.niger* показала самую высокую активность (100%) при pH=5,5. Общий профиль pH-активности BC2G079 сместился на 0,5 единиц pH в сторону рабочих условий с более кислым pH. Таким образом, BC2G079 PEP проявляет более высокую относительную активность при pH ниже 5,5 по сравнению с референсной PEP.

Таблица 4. Профиль pH-активности PEP BC2G079

pH	BC2G079 PEP (pNASU/мл)	Референсная PEP (pNASU/мл)
3,5	59%	54%
4,0	81%	68%
4,5	97%	78%
5,0	100%	97%
5,5	86%	100%
6,0	63%	92%
6,5	41%	60%
7,0	24%	34%

Пример 7. Эксперимент по приготовлению затора.

7.1. Способы.

Для определения PNACU аликвоту объемом 100 мкл смешивали в 96-луночном планшете Nunc с плоским дном МТР со 100 мкл 6 мМ Ас-ААР-pNA в 0,1 М буфере NaAc, pH 4,5, содержащем 50 мМ NaCl. Увеличение оптической плотности (OD) при длине волны 405 нм регистрировали в зависимости от времени на спектрофотометре Тесан МТР. PNACU рассчитывали из линейной части кривой, предпочтительно начального наклона. Анализ проводили при 20°C. Для измерения увеличения оптической плотности (OD) в течение достаточно длительного промежутка времени, оставаясь в пределах линейного диапазона детектора, образец фермента разбавляли соответственно 0,1 М буфером NaAc, pH 4,5, содержащим 50 мМ NaCl. Одна единица PNACU представляет собой количество фермента, которое высвобождает за 1 ч из Ас-ААР-pNA количество pNA, которое соответствует увеличению поглощения при длине волны 405 нм одной единицы OD.

Вызывающие помутнение белки измеряли с помощью таннометра с использованием инструкции по эксплуатации от фирмы Pfeuffer для этого метода. В образцы добавляли дубильную кислоту и помутнение, измеренное под углом рассеяния в 90°, выражали в единицах ЕВС и регистрировали при добавлении 2,5, 5 и 10 мг/л дубильной кислоты.

В качестве показателя содержания глютена определяли содержание глиадина в сусле с помощью конкурентного анализа Elisa (RIDASCREEN® Gliadin competitive (R-Biopharm)).

7.2. Деградация вызывающих помутнение белков и глютена во время приготовления затора.

Деградиацию вызывающих помутнение белков и глютена под действием термически устойчивого фермента BC2G079 PEP в процессе приготовления затора определяли и сравнивали с параметрами менее термически устойчивого референсного фермента PEP из *A.niger*. В одном эксперименте по приготовлению затора 5 мл термически устойчивого фермента BC2G079 PEP, содержащего 460 PNACU/мл, добавляли в 200 мл затора. В другом эксперименте по приготовлению затора добавляли 5 мл референсного фермента PEP, содержащего 460 PNACU/мл. Ферменты добавляли в начале процесса приготовления затора. В третьем эксперименте по приготовлению затора вместо ферментного раствора добавляли такой же объем водопроводной воды для контрольного сравнения.

Эксперименты по приготовлению затора в лабораторных условиях выполняли в заторном аппарате (Lochner Labor technik, Germany). Использовали 80 г молотого стандартного солода EBC в 200 мл воды. Затор ступенчато нагревали, как показано в табл. 5. Заторы непрерывно перемешивали при 100 об/мин во время процесса приготовления затора. В конце процесса приготовления затора его фильтровали через бумажный фильтр (Machegey-Nagel, MN614 ¹/₄, диаметр 320 мм). Фильтрат называется суслom. Отбирали образец суслу и анализировали на присутствие вызывающих помутнение белков и глютена, а также для определения активности пролин-специфической эндопротеазы (pNASU).

Таблица 5. Схема приготовления затора

Время от начала (мин)	Температура (°C)
0	50
15	50
28	63
43	63
55	75

Результаты по деградационным вызывающим помутнение белков и глиадин показаны в табл. 6 и 7.

Таблица 6. Количество вызывающих помутнение белков (измерено в единицах EBC) в образцах суслу из заторов, в которых не присутствовала PEP, и заторов, обработанных термически устойчивой BC2G079 PEP и референсной PEP

Дубильная кислота	Помутнение EBC после добавления дубильной кислоты		
	Образцы суслу		
	Без PEP	Референсная PEP	Термоустойчивая PEP
2,5 мг/л	1,2	0,7	0,3
5 мг/л	4,0	2,7	0,8
10 мг/л	9,3	6,2	1,5

Таблица 7. Содержание глиадин в сусле из заторов, в которых не присутствовала PEP, и заторов, обработанных термически устойчивой BC2G079 PEP и референсной PEP

Образцы суслу	Глиадин в ppm
Без PEP	362
Референсная PEP	135
Термически устойчивая PEP	82

Результаты в табл. 6 и 7 показывают, что термически устойчивая PEP, такая как BC2G079, является гораздо более эффективной в отношении деградационных вызывающих помутнение белков и глиадин в ходе процесса приготовления затора по сравнению с менее термически устойчивой референсной PEP. Остаточную активность PEP также определяли в конце процесса приготовления затора, описанного выше (табл. 8). Только термически устойчивая BC2G079 PEP остается активной, тогда как референсная PEP полностью инактивируется. Более высокая термическая устойчивость коррелирует с деградацией вызывающих помутнение белков и удалением глиадин. Данные по приготовлению затора показывают, что термически устойчивая PEP является предпочтительной для приготовления затора, поскольку термическая устойчивость значительно продлевает время, в течение которого PEP остается активной в процессе приготовления затора.

Таблица 8. Остаточная активность PEP в конце процесса приготовления затора

	Остаточная активность в конце приготовления затора (pNASU/мл)
Референсная PEP	0%
Термически устойчивая PEP	41%

Пример 8. Определение молекулярной массы зрелой PEP BC2G079 с помощью LC-MS. Для анализа LC-MS зрелой PEP BC2G079 100 мкл образца полученного в примере 1.2. супернатанта

ферментационной среды смешивали со 100 мкл 20% ТСА (Chem Lab NV, Belgium). Этот раствор помещали на лед на 1 ч. После осаждения белков образец центрифугировали при 14000 об/мин и 4°C в течение 15 мин. После центрифугирования супернатант удаляли и осадок промывали один раз 500 мкл ацетона (-20°C, Sigma-Aldrich, Нидерланды) и центрифугировали при 14000 об/мин и 4°C в течение 10 мин. Супернатант удаляли и осадок растворяли в 50 мкл 50 мМ NaOH (Sigma-Aldrich, Нидерланды), а затем добавляли 350 мкл 100 мМ NH₄HCO₃ (Sigma-Aldrich, Нидерланды). Затем 200 мкл образца восстанавливали и алкилировали. Для восстановления в раствор добавляли 5 мкл ТСЕР (Sigma-Aldrich, Нидерланды) и инкубировали при комнатной температуре в термомиксере при 1000 об/мин в течение 30 мин. Для алкилирования добавляли 5 мкл 550 мМ IAA (йодацетамид, Sigma-Aldrich, Нидерланды) и инкубировали в термомиксере при 1000 об/мин в условиях темноты в течение 30 мин. Для дегликозилирования образца добавляли 20 мкл PNGase F (Promega, США). Образец инкубировали в термомиксере при 1000 об/мин при 37°C в течение ночи. На следующий день добавляли 1% муравьиную кислоту (Merk, Германия) для разбавления образца до концентрации 50 мкг/мл. Концентрацию белка измеряли с помощью набора Qubit quantitative protein assay (Life technologies). Образец анализировали на системе Acquity I-class-Synapt G2-S (Waters, Великобритания) с использованием следующих параметров: колонка Waters Acquity UPLC BEH300 C4, 1,7 мкм, размер пор 300 Å, 2,1×50 мм; температура колонки: 75°C; инжектируемый объем 1 мкл; подвижная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в Mili-Q (Biosolve, Нидерланды); подвижная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле (Biosolve, Нидерланды). В течение 15 мин на колонке применяли градиент путем изменения фаз А и В (от 20 до 50% В). Настройки MS-детектора представляли собой следующие: диапазон детектируемых масс 500-3500 m/z, время сканирования 1 с, положительный режим ESI, режим разрешения TOF MS, с коррекцией данных с использованием Leu-Enk (Sigma-Aldrich, Нидерланды) в качестве фиксированной массы в процессе работы в рабочем режиме. Деконволюцию спектральных данных, обдирку (изменения) зарядового состояния выполняли с помощью программного обеспечения Waters MassLynx MaxEnt1: выходное разрешение по массе=1 Да/канал; модель повреждения: Gaussian (FWHM=0,750 Да; минимальные величины интенсивностей=33% слева и справа); сходимость итерации.

После коррекции на алкилирование и дегликозилирование масс-спектр показал главные виды с молекулярной массой, соответствующей аминокислотам 36-526 последовательности SEQ ID NO 2. Кроме того, имелись второстепенные виды с молекулярной массой, соответствующей аминокислотам 41-526 последовательности SEQ ID NO 2. Таким образом, N-конец наиболее представленных видов в образце зрелой PEP BC2G079 соответствует RDPLHGPT и N-конец менее представленных видов начинается с GPTNAS. Оба вида показывают множественные пики на масс-спектре. Каждый пик сдвинут на 57 Да или множество 57 Да, что указывает на различие в алкилировании. Одно алкилирование добавляет 57 Да на цистеин. На спектре наблюдалось добавление 1, 3, 5 и 7 IAA в соответствии с присутствием 7 цистеинов в аминокислотной последовательности. Наблюдаемые массы для полностью алкилированных главных и второстепенных видов составляют соответственно 55218 Да и 54598 Да. Так как дегликозилирование добавляет дополнительно 1 Да на дегликозилированный участок, данные дают основание предположить, что 6-7 из теоретических 8 участков гликозилирования являются фактически гликозилированными.

Перечень последовательностей

<110> ДСМ АЙПИ АССЕТС Б.В.

<120> Пролин-специфическая эндопротеаза

<130> 30254-WO-RСТ

<160> 6

<170> BISSAP 1.2

<210> 1

<211> 1580

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> Источник

<222> 1..1580

<223> /организм="Искусственная последовательность"

/примечание="кодон-оптимизированная нуклеиновая кислота кодирующая

пролин-специфическую эндопротеазу из

Rasamsonia emersonii BC2G079 для экспрессии в

A. niger"

/тип молекулы="не обозначенная ДНК"

<400> 1

atgccctccc tctcctccct cgttgccctg actgcttctc ttgtctctct ggctgctgcc	60
gctgctcctc gtctccctct tctcctcgc cctcccttgc ctccccgtga ccccttgcac	120
ggacctacca acgcctccgc cactttccag cagctcatcg accacaacca ccccagcctt	180
ggcaccttct cccagcgcta ctggtggaat gatgagttct ggaagggtcc cggctctccc	240
gttgtccttt tcacccccgg tgaagaagat gccagcgggt acgtgggcta cctgaagaac	300
accaccatca ccggtctgat cgctcagacc atcggtggtg ccgtcatcgt cctcgaacac	360
cgctactggg gccagtcctc cccctacgac tctctgacca ccaagaacct gcagtacctg	420
accctcaagc agtccattgc cgacctacc tacttcgcca agaccgtaa gctccccttc	480
gaccgcaacg gcagctcaa cgcggacaag gctccctggg ttctcagcgg tgaagctac	540
tctggtgctc tctccgctg gactgccagc acctccccg gtactttctg ggctaccac	600
gccagctctg ctctgttga ggccatctac gattactggc agtacttcgc tcccgtgcag	660
gatggattgc ctgccaactg ctcgaaggac ctctcccgtg tcgtcgacta catcgactcc	720
gttctccagt ccggcaacgc cactgccaa caacagctca aggacctttt cggctctgggt	780
gctctggagc acgacgatga cttcgcctcc gctcttgaga acggcccttg gctctggcag	840
tcgaactcgt tctacgacc ctacctcct gtctacgagt tctgcgacta cgttgagaac	900
gcctacgcca gccctcccgt tgctgctggt cccgatggtg ttggtctgga gaaggctctg	960
tctggctacg ccacctgggt gaacaaggtc ttcttccccg gctactgcgc tacctacggc	1020
tactggtcct ccaacgactc cattgcctgc ttcgacacct acaaccagtc gtcgccatg	1080
ttcaccgacc tttccgtctc caaactatc aaccgccagt ggaactgggt cctctgcaac	1140
gagcccttct tctactggca ggatgggtct cccaagaacg tccccagcat tgtctctcgt	1200
ctggctactg ctgagtactg gcagcgccag tgccccttgt tcttcctga agaggatggc	1260

034253

tacacctacg gaagcgccaa gggcaagact gctgccgatg tcaacgcctg gaccaagggc 1320
 tggttcttga ctaacaccac ccgtctgatc tggaccaacg gcgagcttga cccttggcgc 1380
 tctgctggtg tcagcagcaa gttccgtccc ggtggtcccc tccagtccac tccccaggct 1440
 cctctgcagc tcattcccga ggggtgccac tgctacgatc tgatcctcaa gaacgccgag 1500
 gccaacgccg gtgtgcagcg tgtgtcacc aacgaggttg ctcagatcaa ggcttgggtg 1560
 aacgaatact accgtaagta 1580

<210> 2
 <211> 526
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> *Rasamsonia emersonii*

<400> 2
 Met Pro Ser Leu Ser Ser Leu Val Ala Leu Thr Ala Ser Leu Val Ser
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Ala Ala Pro Arg Leu Pro Leu Pro Pro Arg Pro Pro
 20 25 30
 Leu Pro Pro Arg Asp Pro Leu His Gly Pro Thr Asn Ala Ser Ala Thr
 35 40 45
 Phe Gln Gln Leu Ile Asp His Asn His Pro Glu Leu Gly Thr Phe Ser
 50 55 60
 Gln Arg Tyr Trp Trp Asn Asp Glu Phe Trp Lys Gly Pro Gly Ser Pro
 65 70 75 80
 Val Val Leu Phe Thr Pro Gly Glu Glu Asp Ala Ser Gly Tyr Val Gly
 85 90 95
 Tyr Leu Lys Asn Thr Thr Ile Thr Gly Leu Ile Ala Gln Thr Ile Gly
 100 105 110
 Gly Ala Val Ile Val Leu Glu His Arg Tyr Trp Gly Gln Ser Ser Pro
 115 120 125
 Tyr Asp Ser Leu Thr Thr Lys Asn Leu Gln Tyr Leu Thr Leu Lys Gln
 130 135 140
 Ser Ile Ala Asp Leu Thr Tyr Phe Ala Lys Thr Val Lys Leu Pro Phe
 145 150 155 160
 Asp Arg Asn Gly Ser Ser Asn Ala Asp Lys Ala Pro Trp Val Leu Ser
 165 170 175
 Gly Gly Ser Tyr Ser Gly Ala Leu Ser Ala Trp Thr Ala Ser Thr Ser
 180 185 190
 Pro Gly Thr Phe Trp Ala Tyr His Ala Ser Ser Ala Pro Val Glu Ala
 195 200 205
 Ile Tyr Asp Tyr Trp Gln Tyr Phe Ala Pro Val Gln Asp Gly Leu Pro
 210 215 220
 Ala Asn Cys Ser Lys Asp Leu Ser Arg Val Val Asp Tyr Ile Asp Ser
 225 230 235 240
 Val Leu Gln Ser Gly Asn Ala Thr Ala Lys Gln Gln Leu Lys Asp Leu
 245 250 255
 Phe Gly Leu Gly Ala Leu Glu His Asp Asp Asp Phe Ala Ser Ala Leu
 260 265 270
 Glu Asn Gly Pro Trp Leu Trp Gln Ser Asn Ser Phe Tyr Asp Pro Tyr
 275 280 285
 Pro Pro Val Tyr Glu Phe Cys Asp Tyr Val Glu Asn Ala Tyr Ala Ser
 290 295 300
 Pro Pro Val Ala Ala Gly Pro Asp Gly Val Gly Leu Glu Lys Ala Leu
 305 310 315 320
 Ser Gly Tyr Ala Thr Trp Trp Asn Lys Val Phe Phe Pro Gly Tyr Cys
 325 330 335
 Ala Thr Tyr Gly Tyr Trp Ser Ser Asn Asp Ser Ile Ala Cys Phe Asp
 340 345 350
 Thr Tyr Asn Gln Ser Ser Pro Met Phe Thr Asp Leu Ser Val Ser Asn
 355 360 365
 Thr Ile Asn Arg Gln Trp Asn Trp Phe Leu Cys Asn Glu Pro Phe Phe

370 375 380
 Tyr Trp Gln Asp Gly Ala Pro Lys Asn Val Pro Ser Ile Val Ser Arg
 385 390 395
 Leu Val Thr Ala Glu Tyr Trp Gln Arg Gln Cys Pro Leu Phe Phe Pro
 400 410 415
 Glu Glu Asp Gly Tyr Thr Tyr Gly Ser Ala Lys Gly Lys Thr Ala Ala
 420 425 430
 Asp Val Asn Ala Trp Thr Lys Gly Trp Phe Leu Thr Asn Thr Thr Arg
 435 440 445
 Leu Ile Trp Thr Asn Gly Glu Leu Asp Pro Trp Arg Ser Ala Gly Val
 450 455 460
 Ser Ser Lys Phe Arg Pro Gly Gly Pro Leu Gln Ser Thr Pro Gln Ala
 465 470 475 480
 Pro Leu Gln Leu Ile Pro Glu Gly Val His Cys Tyr Asp Leu Ile Leu
 485 490 495
 Lys Asn Ala Glu Ala Asn Ala Gly Val Gln Arg Val Val Thr Asn Glu
 500 505 510
 Val Ala Gln Ile Lys Ala Trp Val Asn Glu Tyr Tyr Arg Lys
 515 520 525

<210> 3
 <211> 17
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Сигнальная последовательность A. niger пектинметилэстеразы PMeA ss

<400> 3
 Met Val Lys Ser Ile Leu Ala Ser Val Phe Phe Ala Ala Thr Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala

<210> 4
 <211> 19
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Про-последовательность A.niger пролин-специфической эндопротеазы

<400> 4
 Ala Arg Pro Arg Leu Val Pro Lys Pro Val Ser Arg Pro Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Lys Ser Ala

<210> 5
 <211> 521
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Пролин-специфическая эндопротеаза из Aspergillus niger содержащая PMeA сигнальную последовательность из A. niger

<400> 5
 Met Val Lys Ser Ile Leu Ala Ser Val Phe Phe Ala Ala Thr Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Arg Pro Arg Leu Val Pro Lys Pro Val Ser Arg Pro Ala Ser
 20 25 30
 Ser Lys Ser Ala Ala Thr Thr Gly Glu Ala Tyr Phe Glu Gln Leu Leu
 35 40 45
 Asp His Asn Pro Glu Lys Gly Thr Phe Ser Gln Arg Tyr Trp Trp
 50 55 60
 Ser Thr Glu Tyr Trp Gly Gly Pro Gly Ser Pro Val Val Leu Phe Thr
 65 70 75 80
 Pro Gly Glu Val Ser Ala Asp Gly Tyr Glu Gly Tyr Leu Thr Asn Glu
 85 90 95

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

<210> 6

<211> 1566

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> Источник

<222> 1..1566

<223> /организм="Искусственная последовательность"

/примечание="Пролин-специфическая эндопротеаза из *Aspergillus niger*

содержащая РМЕА сигнальную последовательность из *A. niger*"

/тип молекулы="не обозначенная ДНК"

<400> 6

atgggtcaagt ccatcctggc ctccgtcttc ttcgctgcca ctgctcttgc tgcaaggcct	60
cgctctcgttc ccaagcccgt ttctcgtccc gccagctcca agtccgctgc tactactggt	120
gaggcctact ttgaacagct gttggaccac cacaaccctg agaagggtac tttctcgsaa	180
agatactggg ggagcaccga gtactggggg ggtcccggat cccccgttgt cctgttctact	240
cccggtgagg tcagcgtga tggctacgag gggtatctga ccaacgagac tctcaccggt	300
gtctacgccc aggagattca ggggtgctgc atcctgatcg aacaccgata ctgggggtgac	360
tcgtctccct acgaggtgct gaacgccgag actctccagt acttgaccct cgaccaggct	420
atccttgata tgacctactt cgccgaaacc gtcaagctcc agtttgacaa ctccaccgc	480
tccaacgctc agaacgctcc ttgggttatg gtcggcggca gctacagcgg tgctctgact	540
gcttgaccg agtccggttc tcccggcacc ttctgggctt accacgccac ctctgctcct	600
gttgaggcca tctacgacta ctggcaatac ttctacccca ttcagcaggg tatggctcag	660
aactgctcca aagatgtctc tctttagca gaatacgtcg acaagatcgg caagaacggc	720
actgccaagg agcaacaggc tctgaaggag cttttcggcc taggagcagt ggagcattc	780
gacgacttcg ccgctgttct gcccaacggt ccttacctct ggcaagacaa cgactttgcc	840
accggttact cttctttctt ccagttctgt gatgccgtcg aggggtgctga ggctgggtgct	900
gccgtcacc cgggtcctga aggtgttggg ctggaaaagg cccttgctaa ctacgcgaac	960
tggttcaact ctaccatcct ccccgattac tgcgccagct acggctactg gactgacgag	1020
tggtccgctc cctgcttca ctctacaac gcctcctctc ctatatacac cgacaccagc	1080
gttggtaacg ccgctgaccg tcagtgaggg tggttcctct gcaatgagcc cttcttttac	1140
tggcaggacg gtgccccga gggacttca acgatagtac cccgcttagt gtccgcctcc	1200
tactggcagc gtcaatgtcc gttgtacttc cccgagacta acggttacac ctacggctcc	1260
gccaaagggaa agaacgccg caccgtcaac agctggaccg gtggctggga catgaccctg	1320
aacaccacc gtctgatctg gacgaacggc caatacacc cctggcgtga ctccgggtgc	1380
tcttccacct tccgccccg tgggtcccctc gtttcgacc ccaacgagcc cgtccagata	1440
atacccggtg gtttccattg ctccgacctc tacatggcag actactacgc caacgagggc	1500
gtcaagaagg ttgtcgacaa cgaagtcaaa caaatcaagg agtgggttga ggaatactac	1560
gcgtaa	1566

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, обладающий активностью пролин-специфической эндопротеазы, выбранный из группы, состоящей из:

i) полипептида, содержащего последовательность зрелого полипептида, представленную в SEQ ID NO: 2;

ii) полипептида, который имеет последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательности зрелого полипептида, представленной в SEQ ID NO: 2;

iii) полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, которая гибридизуется в условиях средней жесткости, предпочтительно в условиях высокой жесткости с цепью, являющейся комплементарной цепи последовательности SEQ ID NO: 1, представляющей собой последовательность, кодирующую зрелый полипептид;

iv) полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, где нуклеиновая кислота имеет последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1, кодирующей зрелый полипептид.

2. Полипептид по п.1, который представляет собой изолированный, чистый, рекомбинантный, синтетический или вариантный полипептид полипептида по п.1.

3. Полипептид по п.1 или 2, отличающийся тем, что последовательность зрелого полипептида, представленная в SEQ ID NO: 2, содержит аминокислоты с 36 по 526 последовательности SEQ ID NO: 2.

4. Композиция для использования в производстве пищевого продукта или кормового продукта, характеризующаяся тем, что она содержит полипептид по любому из пп.1-3.

5. Композиция по п.4, содержащая носитель, вспомогательное вещество или вспомогательный фермент.

6. Нуклеиновая кислота, кодирующая пролин-специфическую эндопротеазу, которая имеет последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1, кодирующей зрелый полипептид.

7. Нуклеиновая кислота по п.6, которая представляет собой изолированную, чистую, рекомбинантную, синтетическую или вариантную нуклеиновую кислоту по п.6.

8. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.6 или 7, функционально связанную с одной или более чем одной контрольной последовательностью(ми), которая управляет экспрессией полипептида в клетке-хозяине.

9. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая либо нуклеиновую кислоту по п.6 или 7, либо экспрессионный вектор по п.8.

10. Способ получения полипептида по пп.1-3, включающий культивирование клетки-хозяина по п.9 в условиях, обеспечивающих экспрессию полипептида и его получение.

11. Способ по п.10, дополнительно включающий выделение полипептида.

12. Способ получения пищевого или кормового продукта, включающий приведение промежуточной формы пищевого или кормового продукта в контакт с полипептидом по п.1-3 или композицией по п.4 или 5 и получение пищевого или кормового продукта.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что пищевой продукт представляет собой напиток, предпочтительно пиво.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что промежуточная форма пищевого продукта представляет собой затвор.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что способ, кроме того, включает инкубацию полипептида с затвором во время приготовления затвора.

16. Способ по любому из пп.12 или 15, отличающийся тем, что пищевой продукт содержит глютен.

17. Пищевой или кормовой продукт, полученный способом по любому из пп.12-16.

18. Применение полипептида по любому из пп.1-3 или композиции по п.4 или 5 уменьшает помутнение в напитке.

19. Применение по п.18, отличающееся тем, что напиток представляет собой пиво.

