

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035178**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.12

(51) Int. Cl. **C12N 9/62 (2006.01)**

(21) Номер заявки
201692439

(22) Дата подачи заявки
2015.06.03

(54) ПРОЛИН-СПЕЦИФИЧНАЯ ЭНДОПРОТЕАЗА И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **14170879.2; 14172644.8; 14172645.5**

(32) **2014.06.03; 2014.06.17; 2014.06.17**

(33) **EP**

(43) **2017.04.28**

(86) **PCT/EP2015/062328**

(87) **WO 2015/185593 2015.12.10**

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

(72) Изобретатель:
**Лан ван дер Ян Метске, Брёйне-
Паулус де Ангела, Кристис Шанталь,
Спанс Мартине, Вондерворт ван де
Петер Йозеф Ида (NL)**

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

(56) **WO-A1-2012174127
WO-A1-03104382**

KANG CHAO ET AL.: "Gene cloning and enzymatic characterization of an endoprotease Endo-Pro-Aspergillus niger", JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, BASINGSTOKE, GB, vol. 40, no. 8, 18 May 2013 (2013-05-18), pages 855-864, XP035330717, ISSN: 1367-5435, DOI: 10.1007/S10295-013-1284-4 [retrieved on 2013-05-18], page 859, left-hand column, paragraph 1, page 861, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1, pages 1, 4b

(57) Изобретение относится к полипептиду, имеющему активность пролин-специфичной эндопротеазы, где указанный полипептид имеет менее 70% остаточной активности после выдержки полипептида при температуре 65°C в течение 15 мин. Кроме того, изобретение относится к полипептиду, имеющему активность пролин-специфичной эндопротеазы, включающему аминокислотную последовательность по SEQ ID NO: 1, где последовательность SEQ ID NO: 1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W, P469Y, к нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид, обладающий активностью пролин-специфичной эндопротеазы, к способу изготовления вариантного полипептида, имеющего активность пролин-специфичной эндопротеазы, рекомбинантной клетке-хозяину, к способу получения полипептида и к способу приготовления пищевого или кормового продукта, в котором используется указанный полипептид.

035178 B1

035178 B1

Настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему активность пролин-специфичной эндопротеазы, к композиции, включающей данный полипептид, к нуклеиновой кислоте, кодирующей пролин-специфичную эндопротеазу, к экспрессирующему вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, кодирующую пролин-специфичную эндопротеазу, к рекомбинантной клетке-хозяину, к способу получения пролин-специфичной эндопротеазы и к способу приготовления пищевого или кормового продукта, в котором используется пролин-специфичная эндопротеаза.

Предшествующий уровень техники

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

Пролин-специфичная эндопротеаза, например, может быть получена из *Aspergillus niger* или *Penicillium chrysogenum*, например, как описано в WO 2002/046381 и WO 2009/144269 соответственно.

Другие пролин-специфичные эндопротеазы известны из WO 2012/174127. WO 2012/174127 раскрывает пролин-специфические протеазы из *Botryotinia fuckeliana*, *Aspergillus clavatus*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella graminicola*, *Neurospora crassa*, *Talaromyces stipitatus* и *Gibberella zeae*.

Пролин-специфичная эндопротеаза может быть использована в различных приложениях, например при деградации глютена (см., например, WO 2005/027953 или WO 2003/068170). Глютен является нерастворимой белковой фракцией зерновых, таких как пшеница, рожь, овес и ячмень. Глютен представляет собой сложную смесь молекул глютеина и проламина, которые, как полагают, вызывают токсические эффекты, например у пациентов, страдающих от целиакии. Целиакия-спру или целиакия считается аутоиммунным заболеванием. Пациенты, страдающие от целиакии-спру должны следовать строгой безглютеновой диете, которую очень трудно соблюдать, поскольку глютен широко используется. Применение пролин-специфичной эндопротеазы в качестве лекарственного средства или диетической добавки может облегчить необходимость в строгой безглютеновой диете (WO 2003/068170).

Пролин-специфичные эндопротеазы также используются для уменьшения мутности в пиве, в которое пролин-специфические протеазы могут быть добавлены в ходе нескольких стадий производства (WO 2002/046381).

Желательно, чтобы ферменты в пищевых и кормовых применениях имели соответствующий оптимум pH и предпочтительно не являлись активными в конечном пищевом продукте или напитке.

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

Сущность изобретения

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему активность пролин-специфичной эндопротеазы, где указанный полипептид содержит менее 70% остаточной активности на ацетил-AlaAlaPro-паранитроанилине (Ac-AAP-PNA), используемом в качестве субстрата после того, как полипептид был выдержан при температуре 65°C в течение 15 мин. Остаточная активность полипептида, обладающего активностью пролин-специфичной эндопротеазы, преимущественно определяется при использовании ацетил-AlaAlaPro-паранитроанилина (Ac-AAP-PNA) в качестве субстрата при температуре 20°C и при pH 4,5, например, в буфере при pH 4,5, например в натрий-ацетатном (NaAc) буфере, который может включать еще одну соль, такую как NaCl. Остаточная активность может быть определена путем инкубации полипептида, как описано в данном документе, при температуре 20°C и при pH 4,5 в течение 60 мин.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему активность пролин-специфичной эндопротеазы, где указанный полипептид выбран из группы, состоящей из полипептида, имеющего активность пролин-специфичной эндопротеазы, необязательно имеющего менее 70% остаточной активности после того, как полипептид был выдержан при температуре 65°C в течение 15 мин, где полипептид выбран из группы, состоящей из:

i) полипептида, который, когда выровнен относительно аминокислотной последовательности по SEQ ID NO: 1, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем положению 469, где положение определяется относительно SEQ ID NO: 1;

ii) полипептида, который, когда выровнен относительно аминокислотной последовательности по SEQ ID NO: 1, содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Ala (A), Cys (C), Asp (D), Glu (E), Phe (F), Gly (G), His (H), Ile (I), Lys (K), Leu (L), Met (M), Asn (N), Gln (Q), Arg (R), Ser (S), Thr (T), Val (V), Trp (W) и Tyr (Y), в положении, соответствующем положению 469, где положение определяется относительно SEQ ID NO: 1;

iii) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность по SEQ ID NO: 1, где последовательность SEQ ID NO: 1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W и P469Y, где аминокислотные замены определяются относительно SEQ ID NO: 1;

iv) полипептида по (i)-(iii), но утратившего сигнальную последовательность и/или последовательность пробелка;

v) полипептида по (i)-(iv), где полипептид идентичен по меньшей мере на 60, 70, 75, 80, 85, 90, 91,

92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% аминокислотной последовательности по SEQ ID NO: 1;

vi) полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, которая идентична по меньшей мере на 60, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, или 99, или 100% SEQ ID NO: 2 или зрелой кодирующей последовательности SEQ ID NO: 2, где последовательность SEQ ID NO: 2 включает по меньшей мере одну мутацию, кодирующую по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W и P469Y, где аминокислотные замены определяются относительно SEQ ID NO: 1.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей полипептид, имеющий пролин-специфичную эндопротеазу, как описано в данном документе.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения вариантного полипептида, имеющего активность пролин-специфичной эндопротеазы, как описано в данном документе.

Изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей пролин-специфичную эндопротеазу, последовательность которой идентична по меньшей мере на 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, или 100% SEQ ID NO: 2 или зрелой кодирующей последовательности SEQ ID NO: 2, где последовательность SEQ ID NO: 2 содержит по меньшей мере одну мутацию, кодирующую по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W и P469Y, где аминокислотные замены определяются относительно SEQ ID NO: 1.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к экспрессирующему вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий полипептид, описанный в данном документе.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантной клетке-хозяину, содержащей полинуклеотидную последовательность или экспрессирующий вектор, как описано в данном документе.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения полипептида, включающему культивирование клетки-хозяина, как описано в данном документе, в условиях, обеспечивающих экспрессию полипептида, и получение полипептида.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу приготовления пищевого или кормового продукта, включающему инкубирование промежуточной формы пищевого или кормового продукта с полипептидом или композицией, содержащей полипептид, описанный в данном документе, и приготовление пищевого продукта.

Настоящее изобретение также относится к пищевому или кормовому продукту, получаемому способом, как описано в настоящем документе.

Определения

Термин "хлебобулочные изделия" в данном документе определен как любой продукт, изготовленный из теста или жидкого теста. Продукт может иметь мягкий или хрустящий характер и может быть белого, светлого или темного типа. Хлебобулочные изделия включают, без ограничения перечисленным, хлеб, например белый хлеб, хлеб из непросеянной муки или ржаной хлеб, хлеб типа французский багет, продукты слоеного теста, такие как (датская) сдоба, круассаны или слоеное тесто, лаваш, лепешки, тако, пирожные, торты, печенье, бисквиты, пончики, рогалики, пироги, кексы, хлеб, приготовленный на пару, и хрустящий хлеб. Типы хлебобулочных изделий, способы их описания и производства 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 "комплементарность". Комплементарность цепи нуклеиновой кислоты может быть комплементарностью к кодирующей цепи или комплементарностью к не кодирующей цепи. Когда речь идет о двухцепочечных нуклеиновых кислотах, комплементарность к нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид, относится к нити, которая комплементарна нити, кодирующей аминокислотную последовательность, или к любой молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей то же самое.

Термин "регуляторная последовательность" может быть использован взаимозаменяемо с термином "нуклеотидная последовательность, регулирующая экспрессию". Термин при использовании в данном описании относится к нуклеотидной последовательности, необходимой для и/или влияющей на экспрессию функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине или *in vitro*. Когда две нуклеотидные последовательности функционально связаны, они, как правило, будут находиться в одной и той же ориентации, а также в одной и той же рамке считывания. Они, как правило, будут, по существу, непрерывными, хотя это может не потребоваться. Нуклеотидные последовательности, регулирующие экспрессию, такие как, в числе прочего, соответствующие последовательности инициации транскрипции, терминации, промотора, лидера, сигнального пептида, пропептида, препропептида или энхансера; последовательность Шайна-Дельгарно, репрессорные или активаторные последовательности; сигналы эффективного процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и сигналы полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последователь-

ности, которые повышают эффективность трансляции (например, сайты связывания рибосом); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, при необходимости, последовательности, которые усиливают секрецию белка, могут быть любой последовательностью нуклеиновой кислоты, обнаруживающей активность в выбранном организме-хозяине и могут быть получены из генов, кодирующих белки, которые являются либо эндогенными, либо гетерологичными клетке-хозяину. Каждая регуляторная последовательность может быть нативной или чужеродной для нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид. При необходимости, регуляторная последовательность может быть снабжена линкерами с целью введения специфических сайтов рестрикции, облегчающих лигирование регуляторных последовательностей с кодирующей областью нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид. Регуляторные последовательности могут быть оптимизированы для конкретных целей.

Термин "молочный продукт" относится к любому виду продукта на основе молока, предназначенному для применения в качестве продукта питания, корма или напитка, включая, без ограничения перечисленным, сыр, молоко, обезжиренное молоко, подкисленное молоко, пахту, сгущенное молоко, спреды, маргарины, йогурт, мороженое, молоко, сливочное масло, ЕМС (фермент-модифицированный сыр), дульче де лече, кофейные сливки, сливки, топленое масло, молочный аналог, и так далее. Сыр может быть любым видом сыра, например, свежим сыром, твердым сыром, творогом, сливочным сыром, сыром с белой плесенью, сыром с голубой плесенью и плавленым сыром. Примерами свежего сыра являются рикотта, сливочный сыр, сыр нешатель или сыр "коттедж". Примерами твердых сыров являются чеддер, данбо, манчего, сент-паулин, чеддер, монтерей, колби, эдам, гауда, мюнстера, швейцарский сыр, грюйер, эмментальский сыр, пармиджано реджано, грана падано, пармезан, пекорино, проволоне и романо. Примеры творожного сыра, представляют собой сыр фета, сыр котиха, сыр паста филата, такой как моцарелла, сыр квесо фреско. Примером сливочного сыра является сыр филадельфия. Примерами сыра с белой плесенью являются бри и камамбер. Примерами сыра с голубой плесенью являются горгонзола и данаблю.

При использовании в данном описании термин "эндогенный" относится к нуклеотидной или аминокислотной последовательности, встречающейся в хозяине в природе.

Эндопептидазы или эндопротеиназы способны разрушать пептидные связи нетерминальных аминокислот (т.е. в белке), в отличие от экзопептидаз, которые разрушают пептидные связи либо с аминокислоты, либо с карбоксильного конца. Эндопептидазы не склонны к разрушению пептидов на мономеры, но приводят к появлению относительно больших пептидных фрагментов. Специфическая генерация относительно больших фрагментов весьма предпочтительна во многих приложениях, связанных с пищевыми продуктами и кормами. Частным случаем эндопептидазы является олигопептидаза, чьими субстратами являются олигопептиды, а не белки.

Термин "экспрессия" включает любую стадию, приводящую к получению полипептида, включая, без ограничения перечисленным, транскрипцию, процессинг РНК, трансляцию, посттрансляционную модификацию и секрецию.

Полинуклеотиды по настоящему изобретению, как описано в настоящем документе, могут быть сверхэкспрессированы в клетке-хозяине по изобретению по сравнению с родительскими клетками, в котором указанный ген не сверхэкспрессирован. Сверхэкспрессия полинуклеотидной последовательности определяется в данном документе как экспрессия последовательности указанного гена, которая приводит к активности полипептида, кодируемого указанной последовательностью в клетке-хозяине по меньшей мере в 1,1, по меньшей мере в 1,25 или по меньшей мере в 1,5 больше активности полипептида в клетке-хозяине; предпочтительно, если активность указанного полипептида является по меньшей мере 2-кратной, более предпочтительно по меньшей мере 3-кратной, более предпочтительно по меньшей мере 4-кратной, более предпочтительно по меньшей мере 5-кратной, еще более предпочтительно по меньшей мере 10-кратной и наиболее предпочтительно по меньшей мере 20-кратной по отношению к активности полипептида в родительской клетке.

Экспрессирующий вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид, такой как полипептид в соответствии с настоящим изобретением, функционально связанный с соответствующими регуляторными последовательностями (например, промотором и стоп-сигналами транскрипции и трансляции) для экспрессии и/или трансляции полинуклеотида *in vitro* или в клетке-хозяине.

Экспрессирующий вектор может быть любым вектором (например, плазмидой или вирусом), который может быть легко подвергнут процедурам рекомбинантных ДНК и который может осуществлять экспрессию полинуклеотида. Выбор вектора, как правило, зависит от совместимости вектора с клеткой, в которую вектор должен быть введен. Векторы могут быть линейными или замкнутыми кольцевыми плазмидами. Вектор может быть автономно реплицирующимся вектором, т.е. вектором, который существует как экстра-хромосомная сущность, репликация которого не зависит от хромосомной репликации, например может быть плазмидой, экстра-хромосомным элементом, мини-хромосомой или искусственной хромосомой. В ином случае вектор может быть таким, который при введении в клетку-хозяина интегрируется в геном и реплицируется вместе с хромосомой (хромосомами), в которую он был интегрирован. Интегративный клонирующий вектор может интегрироваться в случайном порядке или в заданный целевой локус в хромосомах клетки-хозяина. Векторная система может быть одним вектором или плаз-

мидой или двумя или несколькими векторами или плазмидами, которые вместе содержат полную ДНК для введения в геном клетки-хозяина или транспозон. Вектор по изобретению может содержать один, два или более, например три, четыре или пять, полинуклеотида по изобретению, например, для избыточной экспрессии.

Термин "ген" при использовании в данном описании относится к сегменту молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидную цепь, которая может включать или не включать регуляторные последовательности генов, предшествующие и последующие кодирующей последовательности, например промоторы, энхансеры и т.д., а также интроны (интроны) между отдельными кодирующими сегментами (экзонами). Следует также иметь в виду, что определение гена может включать нуклеиновые кислоты, которые не кодируют полипептид, а скорее обеспечивают шаблоны для транскрипции функциональных молекул РНК, таких как тРНК, рРНК и т.д.

Клетка-хозяин, как определено в данном описании, представляет собой организм, подходящий для генетических манипуляций, и организм, который можно культивировать при плотности клеток, пригодной для промышленного производства целевого продукта, такого как полипептид в соответствии с настоящим изобретением. Клетка-хозяин может быть клеткой-хозяином, обнаруживаемой в природе или клеткой-хозяином, полученной из родительской клетки-хозяина после генетической манипуляции или классического мутагенеза. Предпочтительно, если клетка-хозяин представляет собой рекомбинантную клетку-хозяин. Клетка-хозяин может быть прокариотической, архебактериальной или эукариотической клеткой-хозяином. Прокариотическая клетка-хозяин может быть, без ограничения указанным, бактериальной клеткой-хозяином. Эукариотическая клетка-хозяин может быть, без ограничения указанным, клеткой-хозяином из дрожжей, грибов, амёб, водорослей, растений, животных или насекомых.

Термин "гетерологичный" при использовании в данном описании относится к последовательностям нуклеиновых кислот или аминокислот, не встречающихся в природе в клетке-хозяине. Другими словами, нуклеотидная или аминокислотная последовательности не идентичны обнаруживаемым в естественных условиях в клетке-хозяине.

Термин "гибридизация" означает спаривание, по существу, комплементарных цепей олигомерных соединений, таких как соединения нуклеиновых кислот. Гибридизация может выполняться в условиях низкой, средней и высокой жесткости. Условия низкой степени жесткости, включают гибридизацию в 6X хлориде натрия/цитрате натрия (SSC) при температуре около 45°C, с последующими двумя промывками в 0,2× SSC, 0,1% SDS по меньшей мере при 50°C (температура промывок может быть увеличена до 55°C при низкой степени жесткости). Средние условия жесткости включают гибридизацию в 6× SSC при температуре около 45°C, после чего следует одна или несколько промывок в 0,2× SSC, 0,1% SDS при 60°C, а условия высокой жесткости гибридизации включают гибридизацию в 6× SSC при температуре около 45°C, после чего следует одна или несколько промывок в 0,2× SSC, 0,1% SDS при 65°C.

Нуклеотидная или полинуклеотидная последовательность определяется в данном документе как нуклеотидный полимер, содержащий по меньшей мере 5 нуклеотидов или единиц нуклеиновой кислоты. Нуклеотид или нуклеиновая кислота относятся к РНК и ДНК. Термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотидная последовательность" используются в данном документе взаимозаменяемо.

"Пептид" относится к короткой цепи аминокислотных остатков, соединенных пептидной (амидной) связью. Самый короткий пептид, дипептид, состоит из двух аминокислот, соединенных одной пептидной связью.

Термин "полипептид" относится к молекуле, включающей аминокислотные остатки, соединенные пептидными связями, и содержащей более пяти аминокислотных остатков.

Термин "белок", используемый в данном документе, является синонимом термина "полипептид" и, возможно, также относится к двум или более полипептидам.

Таким образом, термины "протеин" и "полипептид" могут быть использованы взаимозаменяемо. Полипептиды могут быть необязательно модифицированы (например, гликозилированы, фосфорилированы, ацилированы, фарнезилированы, пренилированы, сульфированы и т.п.) для добавления функциональности. Полипептиды, проявляющие активность в присутствии специфического субстрата при определенных условиях, могут быть отнесены к ферментам. Следует понимать, что в результате вырожденности генетического кода может быть получено множество нуклеотидных последовательностей, кодирующих один полипептид.

"Выделенный нуклеотидный фрагмент" представляет собой фрагмент нуклеиновой кислоты, который не встречается в природе в виде фрагмента и не может быть найден в естественном состоянии.

Термин "выделенный полипептид", используемый в данном документе, означает полипептид, который отделен по меньшей мере от одного компонента, например другого полипептидного материала, с которым он связан в природе. Выделенный полипептид может быть свободным от каких-либо других примесей. Выделенный полипептид может быть по меньшей мере на 50% чистым, например по меньшей мере 60% чистым, по меньшей мере 70% чистым, по меньшей мере 75% чистым, по меньшей мере 80% чистым, по меньшей мере 85% чистым, по меньшей мере 80% чистым, не менее 90% или по меньшей мере 95% чистым, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9%, что определяется с помощью SDS-PAGE или любого друго-

го аналитического метода, пригодного для этой цели и известного специалисту в данной области. Выделенный полипептид может быть получен рекомбинантной клеткой-хозяином.

"Зрелый полипептид" определяется в данном документе как полипептид в его окончательном виде, и его получают после трансляции мРНК в полипептид и посттрансляционных модификаций указанного полипептида. Посттрансляционные модификации включают N-концевую обработку, C-концевое укорочение, гликозилирование, фосфорилирование и удаление расщеплением лидерных последовательностей, таких как сигнальные пептиды, пропептиды и/или препропептиды.

"Кодирующая последовательность зрелого полипептида" означает полинуклеотид, который кодирует зрелый полипептид.

Термин "нуклеотидная конструкция" в данном описании упоминается как молекула нуклеиновой кислоты, либо одно- или двухцепочечная, которая выделена из природного гена или которая была модифицирована для включения нуклеотидных сегментов, которые объединены и расположены рядом друг с другом таким образом, который не существует в природе. Термин "нуклеотидная конструкция" является синонимом термина "экспрессирующая кассета" или "экспрессирующий вектор", если нуклеотидная конструкция содержит все регуляторные последовательности, необходимые для экспрессии кодирующей последовательности, где указанные регуляторные последовательности функционально связаны с указанной кодирующей последовательностью.

"Пролин-специфичная эндопротеаза" представляет собой протеазу, которая гидролизует белок или пептид в положении, в котором белок или пептид содержит остаток пролина. Пролин-специфичная эндопротеаза может иметь пролин-специфичную эндопротеазную и/или олигопептидазную пролин-специфичную активность (EC3.4.21.26). Пролин-специфичная эндопротеаза предпочтительно представляет собой фермент, который гидролизует пептидную связь на карбоксильном конце остатков пролина, что дает пептид и/или полипептидный фрагмент с C-концевым пролином.

Термин "промотор" определяется в данном документе как ДНК-последовательность, которая связывается РНК-полимеразой и направляет полимеразу к нижележащей нуклеотидной последовательности правильного сайта начала транскрипции для инициации транскрипции.

Термин "рекомбинантный" при использовании в отношении клетки нуклеиновой кислоты, белка или вектора указывает на то, что клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были модифицированы путем введения гетерологичной нуклеотидной последовательности или белка или изменения нативной нуклеиновой кислоты или белка или что клетка происходит из клетки, модифицированной таким образом. Так, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, которые не обнаруживаются в нативной (нерекомбинантной) форме клетки, или экспрессируют нативные гены, которые в ином случае аномально экспрессируются, недостаточно экспрессируются или не экспрессируются вообще. Термин "рекомбинантный" является синонимом "генетически модифицированный" и "трансгенный".

"Идентичность последовательности" или гомология последовательности используются взаимозаменяемо в настоящем документе. Для целей настоящего изобретения этот термин определен в данном документе для того, чтобы определить процент гомологии последовательности или идентичности последовательности из двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеотидных последовательностей, которые выравнивают с целью оптимального сравнения. Для того чтобы оптимизировать выравнивание между двумя последовательностями, могут быть введены разрывы в любую из этих двух сравниваемых последовательностей. Такое выравнивание может быть осуществлено по всей длине сравниваемых последовательностей. В качестве альтернативы выравнивание может быть осуществлено на более коротком участке, например, длиной около 20, около 50, около 100 или более нуклеотидов или аминокислот. Идентичность последовательности представляет собой процент идентичных совпадений между двумя последовательностями на указанном выровненном участке. Процент идентичности последовательности 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). Как аминокислотные последовательности, так и нуклеотидные последовательности могут быть выровнены с помощью данного алгоритма. Алгоритм Нидлмана-Вунша был реализован в компьютерной программе NEEDLE. Для целей настоящего изобретения была использована программа NEEDLE из пакета EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000), Rice, P. Longden, I.) and Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6), p. 276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Для белковых последовательностей используется матрица замещения EBLOSUM62. Для нуклеотидных последовательностей используется EDNAFULL. Были использованы следующие опциональные параметры: штраф за открытие разрыва 10 и за расширение разрыва 0,5. Специалисту будет понятно, что все эти различные параметры будут давать несколько различные результаты, но что общий процент идентичности двух последовательностей существенно не изменится при использовании различных алгоритмов.

После выравнивания программой NEEDLE, как описано выше, процент идентичности последовательностей между последовательностью запроса и последовательностью по изобретению вычисляется следующим образом: количество соответствующих положений в выравнивании, демонстрирующих идентичную аминокислоту или идентичный нуклеотид в обеих последовательностях, разделенное на

общую длину выравнивания после вычитания общего числа разрывов в выравнивании. Идентичность, как определено в данном документе, может быть получена в NEEDLE с помощью опции NOBRIEF и маркирована на выходе программы как "самая длинная идентичность".

Нуклеотидные и белковые последовательности по настоящему изобретению дополнительно могут быть использованы в качестве "последовательности запроса" для того, чтобы выполнить поиск в общедоступных базах данных, например идентифицировать других членов семейства или родственные последовательности. Такие поиски могут быть выполнены с помощью программы NBLAST и XBLAST (версия 2.0) из Altschul, et al. (1990), J. Mol. Biol. 215:403-10. Нуклеотидные поиски BLAST могут быть выполнены с помощью программы NBLAST, балл = 100, длина "слова" = 12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеотидным молекулам по изобретению. Поиск BLAST, белок может быть выполнен с помощью программы XBLAST, балл = 50, длина "слова" = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам по изобретению. Для получения выравниваний с разрывами для целей сравнения может быть использован Gapped BLAST, как описано в Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. При использовании BLAST и Gapped BLAST могут быть использованы параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). См. домашнюю страницу Национального центра биотехнологической информации на <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Термин "по существу чистый" в отношении полипептидов относится к препарату полипептида, который содержит самое большее 50% по массе другого полипептидного вещества. Полипептиды, описанные в данном документе, предпочтительно находятся по существу в чистой форме. В частности, предпочтительно, чтобы полипептиды, описанные в данном документе, находились "по существу в чистой форме", т.е., чтобы препарат полипептида по существу не содержал другого полипептидного вещества. Необязательно, полипептид может также быть по существу свободным от неполипептидного вещества, такого как нуклеиновые кислоты, липиды, компоненты среды и т.п. В данном описании термин "по существу чистый полипептид" является синонимом терминов "выделенный полипептид" и "полипептид в выделенном виде". Термин "по существу чистый" в отношении полинуклеотида относится к препарату полинуклеотида, который содержит не более 50% по массе другого полинуклеотидного материала. Полинуклеотиды, описанные в данном документе, предпочтительно находятся по существу в чистой форме. В частности, предпочтительно, чтобы полинуклеотид, раскрытый в данном документе, был "по существу в чистой форме", т.е., чтобы препарат полинуклеотида, по существу, не содержал другого полинуклеотидного материала. Необязательно, полинуклеотид может также быть по существу свободным от не полинуклеотидных материалов, таких как полипептиды, липиды, компоненты среды и т.п. В данном описании термин "по существу чистый полинуклеотид" является синонимом терминов "выделенный полинуклеотид" и "полинуклеотид в выделенном виде".

"Замена", используемая в данном документе по отношению к полипептидам или нуклеиновым кислотам, означает замену одной или нескольких аминокислот в полипептидной последовательности или из одного или нескольких нуклеотидов в полинуклеотидной последовательности соответственно на другие аминокислоты или нуклеотиды соответственно. Например, замена указывает на то, что положение в полипептиде, раскрытое в данном описании, например, в варианте полипептиде, которое соответствует по меньшей мере одному положению, изложенному выше в SEQ ID NO: 1, содержит аминокислотный остаток, который отсутствует в этом же положении в исходном полипептиде (например, исходной последовательности SEQ ID NO: 1).

"Синтетическую молекулу", например синтетическую нуклеиновую кислоту или синтетический полипептид, получают *in vitro* химическим или ферментативным синтезом. Она включает, без ограничения указанным, варианты нуклеиновых кислот, полученные с использованием кодонов, которые оптимальны для выбранных организмов-хозяев.

Синтетическая нуклеиновая кислота может быть оптимизирована по использованию кодонов предпочтительно в соответствии со способами, описанными в WO 2006/077258 и/или WO 2008/000632, которые включены в данное описание в виде ссылки. Документ WO 2008/000632 посвящен кодоновой оптимизации. Оптимизация кодоновых пар представляет собой способ, в котором нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептид, модифицируют по использованию кодонов, в частности оптимизируют в отношении используемых кодоновых пар для получения улучшенной экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид, и/или улучшение выработки кодируемого полипептида. Кодоновые пары определяются как совокупность двух последующих триплетов (кодонов) в кодирующей последовательности. Специалистам в данной области известно, что использование кодонов должно быть адаптировано в зависимости от вида хозяина, что возможно даст варианты со значительными отклонениями в гомологии от SEQ ID NO: 2, но при этом кодирующих полипептид согласно изобретению.

При использовании в данном описании термины "вариант", "производное", "мутант" или "гомолог" могут быть использованы взаимозаменяемо. Они могут относиться либо к полипептидам, либо к нуклеиновым кислотам. Варианты включают замены, вставки, делеции, усечения, трансверсии и/или инверсии в одном или нескольких местах по отношению к эталонной последовательности. Варианты могут быть изготовлены, например, с помощью сайт-насыщающего мутагенеза, сканирующего мутагенеза, инсерции-

онного мутагенеза, случайного мутагенеза, сайт-направленного мутагенеза и направленной эволюции, а также различных других подходов рекомбинации, известных специалисту в данной области. Вариантные гены нуклеиновых кислот могут быть синтезированы искусственно известными способами в данной области.

Чертежи

Фиг. 1. Вектор pGBTOP-16, используемый для клонирования гена гамма-линоленовой кислоты. Вектор PGBTOP-16 получили из вектора pGBTOP-12, описанного в публикации WO 2011/009700. В дополнение к pGBTOP-12, он содержит ген *ccdB* из *E.coli* для положительного отбора на присутствие вставки между сайтами клонирования *EcoRI* и *PacI*. Сайт рестрикции *PacI* заменяет сайт рестрикции *SnaBI*, присутствующий в pGBTOP-12. Этот вектор перед трансформацией линейаризовали гидролизом *NotI*).

Фиг. 2. Выравнивание эталонной пролин-специфичной эндопротеазы из *Aspergillus niger* с гомологичными пролин-специфичными эндопротеазами, полученными из *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. aculeatus* и *Rasamsonia emersonii*. Выравнивание осуществляли с помощью программы ClustalW, реализованной в программе BioEdit mbio Государственного университета Северной Каролины (NCSSU). (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

Последовательности

SEQ ID NO: 1: аминокислотная последовательность пролин-специфичной эндопротеазы *Aspergillus niger*, содержащая сигнальную последовательность пектинметилэстеразы.

SEQ ID NO: 2: нуклеотидная последовательность пролин-специфичной эндопротеазы *Aspergillus niger*, содержащая сигнальную последовательность пектинметилэстеразы.

SEQ ID NO: 3: аминокислотная последовательность цитохрома C сердца лошади.

SEQ ID NO: 4: фрагмент цитохрома C, гидролизованного с помощью PEP в соответствии с настоящим изобретением.

SEQ ID NO: 5: фрагмент цитохрома C, гидролизованного с помощью PEP в соответствии с настоящим изобретением.

SEQ ID NO: 6: фрагмент цитохрома C, гидролизованного с помощью PEP в соответствии с настоящим изобретением.

SEQ ID NO: 7: фрагмент цитохрома C, гидролизованного с помощью PEP в соответствии с настоящим изобретением.

SEQ ID NO: 8: фрагмент цитохрома C, гидролизованного с помощью PEP в соответствии с настоящим изобретением.

SEQ ID NO: 9: аминокислотная последовательность пролин-специфичной эндопротеазы (PEP) из *Aspergillus carbonarius* BC2G075 с сигнальной последовательностью пектинметилэстеразы из *A. niger* и пропоследовательностью PEP из *A. niger*.

SEQ ID NO: 10: аминокислотная последовательность пролин-специфичной эндопротеазы (PEP) из *Aspergillus flavus* BC2G077 с сигнальной последовательностью пектинметилэстеразы из *A. niger* и пропоследовательностью PEP из *A. niger*.

SEQ ID NO: 11: Аминокислотная последовательность пролин-специфичной эндопротеазы (PEP) из *Aspergillus Aculeatus* BC2G076 с сигнальной последовательностью пектинметилэстеразы из *A. niger* и пропоследовательностью PEP из *A. niger*.

SEQ ID NO: 12: аминокислотная последовательность пролин-специфичной эндопротеазы из *Rasamsonia emersonii*.

SEQ ID NO: 13: Нуклеотидная последовательность пролин-специфичной эндопротеазы (PEP) из *Aspergillus carbonarius* BC2G075 с сигнальной последовательностью пектинметилэстеразы из *A. niger* и пропоследовательностью PEP из *A. niger*.

SEQ ID NO: 14: нуклеотидная последовательность пролин-специфичной эндопротеазы (PEP) из *Aspergillus. flavus* BC2G077 с сигнальной последовательностью пектинметилэстеразы *A. niger* и пропоследовательностью PEP из *A. niger*.

SEQ ID NO: 15: нуклеотидная последовательность пролин-специфичной эндопротеазы (PEP) из *Aspergillus aculeatus* BC2G076 с сигнальной последовательностью пектинметилэстеразы *A. niger* и пропоследовательностью PEP *A. niger*.

SEQ ID NO: 16: нуклеотидная последовательность пролин-специфичной эндопротеазы из *Rasamsonia emersonii*.

Подробное описание

В одном аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, имеющему активность пролин-специфичной эндопротеазы, где указанный полипептид содержит менее 70% остаточной активности при использовании ацетил-AlaAlaPro-паранитроанилина (Ac-AAP-PNA) в качестве субстрата после того, как полипептид был выдержан при температуре 65°C в течение 15 мин. Остаточную активность пролин-специфичной эндопротеазы измеряли с помощью ацетил-AlaAlaPro-паранитроанилина (Ac-AAP-PNA) при pH 4,5, например, в натрий-ацетатном буфере при pH 4,5 при 20°C. Удивительно, но полипептид, который содержит менее 55% остаточной активности полипептида после того, как полипептид был выдержан при температуре 65°C в течение 15 мин, предпочтительно может быть использован в таких приложениях, как пищевые и кормовые продукты, где желательна отсутствующая или незначительная остаточная активность. Предпочтительно, если полипептид, предлагаемый изобретением, содержит менее 70, 60, 55, 50, 45, 40, 30, 20, 15, 10, например, менее 5% остаточной активности после того, как полипептид был выдержан при температуре 65°C в течение 15 мин. Как определено в данном документе, менее чем 70, 60, 55, или менее чем 50%, или менее чем 45, 40, 30, 20, 15, 10 или 5% остаточной активности означает, что полипептид обладает менее чем на 55, или менее чем на 50, или менее чем на 45, 40, 30, 20, 15, 10 или 5% соответственно активности по сравнению с активностью полипептида перед выдержкой полипептида при 65°C в течение 15 мин. Предпочтительно полипептид согласно данному изобретению не демонстрирует остаточную активность после того, как полипептид был выдержан при температуре 65°C в течение 15 мин.

В одном воплощении полипептид, описанный в данном документе, представляет собой полипептид, обладающий активностью пролин-специфичной эндопротеазы, где указанный полипептид имеет менее чем 90% остаточной активности при использовании ацетил-AlaAlaPro-паранитроанилина (Ac-AAP-PNA) в качестве субстрата после того, как полипептид был выдержан при температуре 60°C в течение 15 мин. Остаточная активность пролин-специфичной эндопротеазы измеряли при использовании ацетил-AlaAlaPro-паранитроанилина (Ac-AAP-PNA) при pH 4,5, например, в натрий-ацетатном буфере при pH 4,5 при 20°C. Удивительно, но полипептид, который содержит менее 90% остаточной активности после выдержки полипептида при температуре 60°C в течение 15 мин, предпочтительно может быть использован в приложениях, например, пищевых или кормовых, где желательна отсутствующая или незначительная остаточная активность. Предпочтительно, если полипептид, предлагаемый в данном документе, имеет менее 85, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, например, менее 5% остаточной активности после выдержки полипептида при температуре 60°C в течение 15 мин. Как определено в данном описании, менее чем 90, 85, 80, 70 или менее 60, 50, 45, 40, 30, 20, 15, 10 или 5%, остаточной активности означает, что полипептид обладает менее 70, 60, 50 или менее чем 40, 30, 20, 15, 10 или 5% соответственно активности по сравнению с активностью полипептида перед выдержкой полипептида при 60°C в течение 15 мин. В предпочтительном варианте полипептид согласно данному изобретению не проявляет остаточную активность после того, как полипептид был выдержан при температуре 60°C в течение 15 мин.

Изобретение также относится к полипептиду, обладающему активностью пролин-специфичной эндопротеазы, необязательно имеющему менее 70% остаточной активности при использовании ацетил-AlaAlaPro-паранитроанилина (Ac-AAP-PNA) в качестве субстрата после того, как полипептид был выдержан при температуре 65°C в течение 15 мин, или, необязательно, содержащий менее 90% остаточной активности при использовании ацетил-AlaAlaPro-паранитроанилина (Ac-AAP-PNA) в качестве субстрата после того, как полипептид был выдержан при температуре 60°C в течение 15 мин, где указанный полипептид выбранный из группы, включающей:

i) полипептид, который при выравнивании относительно аминокислотной последовательности, соответствующей SEQ ID NO: 1, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем положению 469, и кроме того, необязательно, по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении 204, 304, 377, 466 и/или 477, где положение определяется относительно SEQ ID NO: 1;

ii) полипептид, который при выравнивании относительно аминокислотной последовательности, соответствующей SEQ ID NO: 1, содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Ala (A), Cys (C), Asp (D), Glu (E), Phe (F), Gly (G), His (H), Ile (I), Lys (K), Leu (L), Met (M), Asn (N), Gln (Q), Arg (R), Ser (S), Thr (T), Val (V), Trp (W) и Tyr (Y) в положении, соответствующем положению 469, и, необязательно, аминокислоты фенилаланин (F) в положении 204, Ser (S) в положении 304, аланин (A) в положении 377, Thr (T) в положении 466 и/или аланин (A) в положении 477, где положение определяется относительно SEQ ID NO: 1

iii) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 1, где SEQ ID NO: 1 включает по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W и P469Y, и, возможно, аминокислотную замену I204F, P304S, P377A, P466T и/или P477A, где аминокислотная замена определяется относительно SEQ ID NO: 1;

iv) полипептид по (i)-(iii), но утративший сигнальную последовательность и/или последовательность пробелка;

v) полипептид по (i)-(iv), где полипептид идентичен по меньшей мере на 60, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% аминокислотной последовательности по SEQ ID NO: 1;

vi) полипептид, кодируемый нуклеиновой кислотой, которая идентична по меньшей мере на 60, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, или 99, или 100% SEQ ID NO: 2 или зрелой кодирующей последовательности SEQ ID NO: 2, где последовательность SEQ ID NO: 2 содержит по меньшей мере одну мутацию, кодирующую по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W и P469Y, и, необязательно, аминокислотную замену I204F, P304S, P377A, P466T, и/или P477A, где аминокислотные замены определяются относительно SEQ ID NO: 1.

При использовании в данном документе, когда полипептид выровнен с последовательностью пролин-специфичной эндопротеазы по SEQ ID NO: 1, полипептид по настоящему изобретению будет содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении, соответствующем 469 в SEQ ID NO: 1.

Эти положения в полипептиде по настоящему изобретению, который может быть рекомбинантным, синтетическим или вариантным полипептидом, соответствуют положениям, изложенным выше в SEQ ID NO: 1, и могут быть идентифицированы путем выравнивания последовательности полипептида согласно настоящему изобретению, с последовательностью по SEQ ID NO: 1 с использованием, например, программы выравнивания NEEDLE. Положения в полипептиде по настоящему изобретению, соответствующие положениям в SEQ ID NO: 1, как указано выше, могут быть, таким образом, идентифицированы и упомянуты как те положения, которые определены по последовательности SEQ ID NO: 1.

Настоящее изобретение также относится к полипептиду, который является выделенным, по существу чистым, чистым, рекомбинантным, синтетическим или вариантным полипептидом полипептида, описанного в данном документе.

Предпочтительно полипептид, предлагаемый изобретением, включает выбранную по меньшей мере одну аминокислоту из группы, состоящей из Ala (A), Cys (C), Asp (D), Glu (E), Phe (F), Gly (G), His (H), Ile (I), Lys (K), Leu (L), Met (M), Asn (N), Gln (Q), Arg (R), Ser (S), Thr (T), Val (V), Trp (W) и Tyr (Y) в положении, соответствующем положению 469, где положение определяется относительно SEQ ID NO: 1.

В одном воплощении полипептид, описанный в данном документе, дополнительно включает аминокислоту Phe (F) в положении 204, Ser (S) в положении 304, Ala (A) в положении 377, Thr (T) в положении 466 и/или Ala (A) в положении 477, где положение определяется ссылкой на последовательность SEQ ID NO: 1.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается полипептид, обладающий активностью пролин-специфичной эндопротеазы, включающий аминокислотную последовательность по SEQ ID NO: 1, где последовательность SEQ ID NO: 1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W и P469Y, и где аминокислотные замены определяются относительно SEQ ID NO: 1. В дополнительном воплощении полипептид, обладающий активностью пролин-специфичной эндопротеазы, дополнительно включает аминокислотную замену I204F, P304S, P377A, P466T и/или P477A. Предпочтительно, если настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере одну аминокислотную замену(ы), соответствующую положению 469 и, возможно, положению 204, 304, 377, 466 и/или 477, как определено в данном документе выше, который идентичен по меньшей мере на 60, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% аминокислотной последовательности по SEQ ID NO: 1. Соответственно, настоящее изобретение относится к полипептиду, который идентичен по меньшей мере на 60, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% аминокислотной последовательности по SEQ ID NO: 1 или зрелому полипептиду по SEQ ID NO: 1, где SEQ ID NO: 1, содержит аминокислотную замену в положении 469 и, возможно, в положении 204, 304, 377, 466 и/или 477, как определено в данном документе выше.

В одном воплощении полипептид, обладающий активностью пролин-специфичной эндопротеазы, включает аминокислотные замены, выбранные из группы, состоящей из P469D и I204F; P469D и P377A; P469Q и P477A; P469Y, и P304S, и P377A; P469Q, и I204F, и P466T; и P469Q, и P466T, и P477A

Полипептид, обладающий активностью пролин-специфичной эндопротеазы, которая при выравнивании с аминокислотной последовательностью в соответствии с SEQ ID NO: 1 содержит аминокислотную замену, соответствующую положению 469, как определено выше в настоящем изобретении, может включать дополнительные замены, делеции и/или вставки в одной или нескольких дополнительных аминокислотных положениях. Например, полипептид, описанный в данном документе, может представлять собой вариант полипептида или зрелого полипептида по SEQ ID NO: 1, включающий замену, делецию или вставку в положении 469, как определено в настоящем описании, и дополнительно имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 или более дополнительных аминокислотных замен, делеций и/или вставок, в результате чего полипептид все еще обладает активностью или функцией полипептида согласно изобретению. Специалисту будет понятно, что эти незначительные изменения аминокислот в полипептиде по изобретению, могут присутствовать (например, природные мутации) или могут быть внесены (например, с использованием технологии р-ДНК) без потери функции или активности белка. В случае, если эти му-

тации присутствуют в связывающем домене, активном сайте или другом функциональном домене полипептида, свойство полипептида может измениться, но полипептид может сохранять свою активность. В том случае, если присутствует мутация, которая не находится близко к активному сайту, связывающему домену или другому функционально активному домену, можно ожидать меньший эффект.

Функциональные эквиваленты полипептида согласно изобретению также могут быть идентифицированы, например, путем скрининга комбинаторных библиотек мутантов, например укороченных мутантов полипептида согласно изобретению на предмет биологической активности полипептида по изобретению. В одном воплощении смешанная библиотека образована комбинаторным мутагенезом на уровне нуклеиновой кислоты. Смешанная библиотека вариантов может быть получена, например, ферментативным лигированием смеси синтетических олигонуклеотидов в последовательности генов таким образом, чтобы вырожденный набор потенциальных последовательностей белка был представлен в виде отдельных полипептидов или в ином случае в виде набора более крупных слитых белков (например, для фагового дисплея). Существуют различные способы, которые могут быть использованы для получения библиотек потенциальных вариантов полипептидов по изобретению из вырожденной олигонуклеотидной последовательности. Способы синтеза вырожденных олигонуклеотидов известны в данной области (см., например, Narang (1983), *Tetrahedron*, 39:3; Itakura et al. (1984), *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al. (1984), *Science* 198:1056; Ike et al. (1983), *Nucleic Acid Res.* 11:477). Термин "вырожденная нуклеотидная последовательность" или "вырожденная (олиго)нуклеотидная последовательность" обозначает последовательность нуклеиновых кислот, которая включает один или несколько вырожденных кодонов (по сравнению с молекулой эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид). Вырожденные кодоны содержат различные триплеты нуклеиновых кислот, но кодируют один и тот же аминокислотный остаток (т.е. каждый из триплетов GAU и GAC кодирует Asp). Вырожденность кодонов относится к природе генетического кода, благодаря которой возможны вариации нуклеотидной последовательности, без оказания влияния на аминокислотную последовательность закодированного полипептида. Специалисту хорошо известно о "случайности использования синонимичных кодонов", проявляемой конкретной клеткой-хозяином при использовании кодонов нуклеиновых кислот для определения конкретной аминокислоты.

Кроме того, библиотеки фрагментов кодирующей последовательности полипептида по изобретению могут быть использованы для создания смешанной популяции полипептидов для скрининга и последующего отбора вариантов. Например, библиотека фрагментов кодирующей последовательности может быть получена путем обработки представляющего интерес двухцепочечного ПЦР-фрагмента кодирующей последовательности нуклеазой в условиях, в которых никирование (nicking) происходит только один раз на молекулу, денатурации двухцепочечной ДНК, ренатурации ДНК с образованием двухцепочечной ДНК, которая может включать смысловые/антисмысловые пары из различных никированных продуктов, удаление одноцепочечных частей из реформированных дуплексов путем обработки нуклеазой S1 и лигирования полученной библиотеки фрагментов в экспрессирующий вектор. С помощью этого способа можно получить экспрессионную библиотеку, которая кодирует N-концевые и внутренние фрагменты различных размеров из представляющего интерес белка.

В данной области известны несколько методов скрининга генных продуктов комбинаторных библиотек, полученных с помощью точечных мутаций укорочения, и для скрининга кДНК-библиотек на предмет генных продуктов, имеющих выбранное свойство. Наиболее широко используемые методы для скрининга больших библиотек генов, которые поддаются высокопроизводительному анализу, обычно включают клонирование библиотеки генов в реплицируемые экспрессирующие векторы, трансформацию подходящих клеток полученной библиотекой векторов и экспрессию комбинаторных генов в условиях, в которых детекция искомой активности облегчает выделение вектора, кодирующего ген, продукт которого был обнаружен. Рекурсивный множественный мутагенез (REM), метод, который повышает частоту функциональных мутантов в библиотеках, может быть использован в комбинации с анализами скринингом для идентификации вариантов белка по изобретению (Arkin and Yourvan (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993), *Protein Engineering*, 6(3):327-331).

Полипептид, предлагаемый изобретением, может утратить сигнальную последовательность и/или последовательность пропротеина. Например, полипептид, предлагаемый в настоящем документе, может представлять собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1, включающий аминокислотную замену в положении, соответствующем положению 469, и лишенный первых 17 аминокислот, кодирующих сигнальную последовательность и/или лишенный следующих 19 аминокислот, кодирующих пропоследовательность. Соответственно полипептид, предлагаемый изобретением, может содержать зрелый полипептид по SEQ ID NO: 1, например, аминокислоты с 37 по 521 SEQ ID NO: 1 и содержать аминокислотную замену в положении, соответствующем положению 469, и, необязательно, в положениях 204, 304, 377, 466, и/или 477, как определено в настоящем описании, в котором аминокислота метионин в положении 1 в SEQ ID NO: 1 считается номером 1.

Полипептид, предлагаемый изобретением, может быть закодирован с помощью любой подходящей нуклеиновой кислоты, такой как нуклеиновая кислота, которая идентична по меньшей мере на 60, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% нуклеиновой кислоте по SEQ ID NO: 2 или зрелой

кодирующей последовательности SEQ ID NO: 2, где последовательность SEQ ID NO: 2 содержит по меньшей мере одну мутацию, кодирующую по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W и P469Y, аминокислотную замену I204F, P304S, P377A, P466T и/или P477A, где аминокислотные замены определяются относительно SEQ ID NO: 1.

В одном воплощении полипептид, описанный в данном документе, может быть кодируемым нуклеиновой кислотой, которая идентична по меньшей мере на 60, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% нуклеиновой кислоте по SEQ ID NO: 2 или зрелой кодирующей последовательности SEQ ID NO: 2, где последовательность SEQ ID NO: 2, содержащая мутации, кодирующие полипептид, обладающий активностью пролин-специфичной эндопротеазы, включает аминокислотные замены, выбранные из группы, состоящей из P469D и I204F; P469D и P377A; P469Q и P477A; P469Y, и P304S, и P377A; P469Q, и I204F, и P466T и P469Q, и P466T, и P477A.

Как правило, полинуклеотидная последовательность, как описано в данном документе, является оптимизированной по кодам или оптимизированной по кодам последовательностью для оптимальной экспрессии полипептида, описанного в данном документе, в конкретной клетке-хозяине.

В одном воплощении настоящее изобретение представляет собой биологически активный фрагмент полипептида, описанный в данном документе.

Биологически активные фрагменты полипептида согласно изобретению включают полипептиды, содержащие аминокислотные последовательности, в достаточной степени идентичные или полученные из аминокислотной последовательности белка пролин-специфичной эндопротеазы (например, зрелой аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1), которые включают меньше аминокислот, чем полноразмерный белок, но который проявляет по меньшей мере одну биологическую активность соответствующего полноразмерного белка. Как правило, биологически активные фрагменты содержат домен или мотив по меньшей мере с одной активностью белка пролин-специфичной эндопротеазы. Биологически активный фрагмент может, например, содержать каталитический домен. Биологически активный фрагмент белка по изобретению может представлять собой полипептид, который имеет, например, 10, 25, 50, 100 или более аминокислот в длину. Кроме того, другие биологически активные части, в которых удалены другие области белка, могут быть получены с помощью рекомбинантных методов и оценены по одной или нескольким биологическим активностям нативной формы полипептида согласно изобретению.

Изобретение также относится к фрагментам нуклеиновых кислот, которые кодируют указанные выше биологически активные фрагменты белка пролин-специфичной эндопротеазы.

Полипептид по настоящему изобретению может представлять собой слитый белок. Методы получения слитых полипептидов известны в данной области и включают лигирование последовательностей, кодирующих полипептиды так, чтобы они находились в одной рамке. Экспрессия слитого полипептида находится под контролем одинакового 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 несколько могут быть гетерологичными по отношению к клетке-хозяину. 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 химер слитых последовательностей, например, описаны в WO 2010/121933, WO 2013/007820 и WO 2013/007821.

Полипептид по настоящему изобретению может быть получен из любой подходящей эукариотической клетки. Эукариотическая клетка может быть клеткой млекопитающего, насекомого, растения, гриба или водоросли. Формулировка "полученный" или "производное" относительно к происхождению полипептида, описанного в настоящем документе, означает, что при проведении поиска BLAST с полипептидом в соответствии с настоящим изобретением полипептид согласно данному изобретению может быть получен из природного источника, такого как микробная клетка, с которой эндогенный полипептид демонстрирует самый высокий процент гомологии или идентичности с полипептидом, описанным в данном документе.

Полипептид по настоящему изобретению, может быть получен из мицелиальных грибных клеток или термофильных мицелиальных грибных клеток. Предпочтительные мицелиальные грибные клетки принадлежат к видам родов

Acremonium, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Rasamsonia*, *Thielavia*, *Fusarium* или *Trichoderma*, *Amorphotheca*, *Pseudocercospora*, *Trametes*, *Rhizomucor*, *Calcarisporiella*, *Thermomyces*, *Thermoascus*, *Cornyascus*, *Myricoccum*, *Scytalidium*, *Chaetomium*, *Paecilomyces*, *Cornyascus*, *Malbranchea*, *Stilbella*, *Thermomyces*, *Dactylomyces*, *Humicola*, *Chaetomium*, *Melanocarpus*, *Rhizomucor*, *Lentinula*, *Anaeromyces*, а наиболее предпочтительно принадлежат к 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 himmulea*, *Chaetomium thermophilum*, *Paecilomyces byssochlamydoides*, *Cornyascus 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*.

Полипептид по настоящему изобретению может быть получен из *Aspergillus niger*, *Aspergillus Aculeatus*, *Aspergillus Flavus*, *Aspergillus carbonarius* или *Rasamsonia emersonii*.

Полипептид по настоящему изобретению, может быть природным или генетически модифицированным или рекомбинантным полипептидом.

Полипептид, описанный в данном документе, может быть очищен. Очистка белка известна специалисту в данной области. Хорошо известным способом очистки белков является высокоэффективная жидкостная хроматография.

Полипептиды по настоящему изобретению преимущественно обладают улучшенным свойством. Улучшенное свойство может быть повышенной специфической активностью и/или повышенной чувствительностью к температуре по сравнению с полипептидом, не включающим аминокислотную замену, определенную в данном описании, или любое другое улучшенное свойство, например, желательное при обработке пищи или кормов. Предпочтительно полипептид, описанный в данном документе, имеет менее 70% остаточной активности на ацетил-AlaAlaPro-паранитроанилине (Ac-AAP-PNA) в качестве субстрата, когда полипептид был выдержан при температуре 65°C в течение 15 мин.

Полипептиды согласно изобретению могут быть получены несколькими способами, известными специалисту в данной области, такими как:

1) ПЦР пониженной точности для введения случайных мутаций с последующим скринингом полученных (вариантных) полипептидов и выделением (вариантного) полипептида(ов) с улучшенными свойствами;

2) смешение семейств родственных вариантов генов, кодирующих полипептид согласно изобретению, с последующим скринингом полученных вариантов и выделением вариантов с улучшенными свойствами.

Варианты генов, кодирующих полипептид согласно настоящему изобретению, приводят к увеличению уровня мРНК и/или белка, что приводит к большей активности, которая может быть получена путем модификации полинуклеотидных последовательностей указанных генов. К таким модификациям относятся:

1) улучшение использования кодонов таким образом, чтобы кодоны были (оптимально) адаптированы к родительскому микробному хозяину;

2) улучшение использования кодоновых пар таким образом, чтобы кодоны были (оптимально) адаптированы к родительскому микробному хозяину;

3) добавление стабилизирующих последовательностей к геномной информации, кодирующей полипептид, в соответствии с изобретением, что дает молекулу мРНК с увеличенным периодом полужизни.

Способы выделения вариантов с улучшенными каталитическими свойствами или повышенными уровнями мРНК или белка описаны в WO 03/010183 и WO 03/01311. Способы оптимизации использования кодонов в родительских микробных штаммах описаны, например, в WO 2008/000632. Способы добавления стабилизирующих элементов в гены, кодирующих полипептид согласно изобретению, описаны в WO 2005/059149.

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу получения варианта полипептида, причем этот способ включает:

i) выбор исходного полипептида, идентичного по меньшей мере на 60, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% аминокислотной последовательности по SEQ ID NO: 1, или зрелого полипептида последовательности по SEQ ID NO: 1; и

ii) замену по меньшей мере одной аминокислоты в положении, соответствующем положению 469, определенному относительно SEQ ID NO: 1, на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Ala (A), Cys (C), Asp (D), Glu (E), Phe (F), Gly (G), His (H), Ile (I), Lys (K), Leu (L), Met (M), Asn (N), Gln (Q), Arg (R), Ser (S), Thr (T), Val (V), Trp (W) и Tyr (Y), и, необязательно, замену аминокислоты в положении 204 на Phe (F), в положении 304 на Ser (S), в положении 377 на Ala (A), в положении 466 на Thr (T) и/или в положении 477 на Ala (A); и

iii) получение вариантного полипептида, в котором, возможно, вариантный полипептид имеет менее чем 70% остаточной активности при использовании Ac-AAP-PNA в качестве субстрата, после того как полипептид был выдержан при температуре 65°C в течение 15 мин.

Получение вариантного полипептида, описанного в данном документе, может включать экспрессию гена, кодирующего вариантный полипептид в подходящей (рекомбинантной) клетке-хозяине, и культивирование клетки-хозяина для получения вариантного полипептида.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, включающей полипептид, описанный в данном документе.

Композиция, описанная в данном документе, может включать носитель, наполнитель, вспомогательный фермент или другие соединения. Как правило, композиция или состав включают соединение, с помощью которого может быть получена пролин-специфичная эндопротеаза.

Наполнитель, используемый в данном документе, является неактивным веществом, включенным в состав вместе с полипептидом, описанным в данном документе, например, представляет собой сахарозу или лактозу, глицерин, сорбит или хлорид натрия. Композиция, содержащая полипептид, описанный в данном документе, может быть жидкой композицией или твердой композицией. Жидкая композиция, как правило, включает воду. При изготовлении лекарственной формы в виде жидкой композиции композиция, как правило, включает компоненты, которые понижают активность воды, такие как глицерин, сорбит или хлорид натрия (NaCl). Твердая композиция, содержащая полипептид, описанный в данном документе, может содержать гранулят, содержащий фермент, или композиция содержит инкапсулированный полипептид в жидких матрицах, таких как липосомы или гели, такие как альгинат или каррагинаны. Есть много способов, известных в данной области, инкапсуляции 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).

Композиция, описанная в данном документе, может также содержать носитель, содержащий полипептид, описанный в данном документе. Полипептид, раскрытый в настоящем описании, может быть связан или иммобилизован на носителе с помощью известных технологий в данной области.

Настоящее изобретение также относится к способу получения композиции, содержащей полипептид, раскрытый в настоящем описании, который может включать распылительную сушку ферментационной среды, содержащей полипептид, или гранулирование, или инкапсулирование полипептида, описанного в данном документе, и получение композиции.

Настоящее изобретение также относится к упаковке, такой как банка, бочонок или бочка, содержащей полипептид или композицию, содержащую полипептид, описанный в данном документе.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей пролин-специфичную эндопротеазу, которая идентична по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% последовательности SEQ ID NO: 2 или зрелой кодирующей последовательности SEQ ID NO: 2, где SEQ ID NO: 2 содержит по меньшей мере одну мутацию, кодирующую по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W, P469Y, и, необязательно, где SEQ ID NO: 2 включает по меньшей мере одну мутацию, кодирующую аминокислотную замену I204F, P304S, P377A, P466T и/или P477A, где аминокислотные замены определяются относительно SEQ ID NO: 1.

В другом варианте выделенная молекула нуклеиновой кислоты по изобретению содержит молекулу нуклеиновой кислоты, которая является обратным комплементом нуклеотидной последовательности, показанной на SEQ ID NO: 2, или обратной комплементарной зрелой кодирующей последовательности

SEQ ID NO: 2, содержащей по меньшей мере одну мутацию, кодирующую по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W и P469Y, и, необязательно, где последовательность SEQ ID NO: 2 содержит по меньшей мере одну мутацию, кодирующую аминокислотную замену I204F, P304S, P377A, P466T и/или P477A, где аминокислотные замены определяются относительно SEQ ID NO: 1, или варианта любой такой нуклеотидной последовательности.

Также раскрывается нуклеиновая кислота, которая гибридизуется в условиях средней жесткости, предпочтительно в условиях высокой жесткости с комплементарной цепью зрелого полипептида SEQ ID NO: 2, содержащая по меньшей мере одну мутацию, кодирующую по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W и P469Y, и, необязательно, где последовательность SEQ ID NO: 2 содержит по меньшей мере еще одну мутацию, кодирующую аминокислотную замену I204F, P304S, P377A, P466T и/или P477A, где указанные замены определялись ссылкой на SEQ ID NO: 1.

Молекула нуклеиновой кислоты, которая комплементарна другой нуклеотидной последовательности, представляет собой последовательность, которая в достаточной степени комплементарна другой нуклеотидной последовательности таким образом, что может гибридизоваться с другой нуклеотидной последовательностью с образованием устойчивого дуплекса. Термин "кДНК" (комплементарная ДНК) определяется в данном документе как молекула ДНК, которая может быть получена путем обратной транскрипции из молекулы мРНК. В прокариотах молекулы мРНК образуются при транскрипции геномной ДНК гена, присутствующего в клетке. В эукариотических клетках гены содержат как экзоны, т.е. кодирующие последовательности, так и интроны, т.е. промежуточные последовательности, расположенные между экзонами. Поэтому в эукариотических клетках исходная, первичная РНК, полученная транскрипцией геномной ДНК гена подвергается обработке в ряде стадий, прежде чем появляется в виде мРНК. Эти стадии включают удаление интронных последовательностей с помощью процесса, называемого сплайсинг, кДНК, полученной из мРНК, содержат только кодирующие последовательности и могут быть непосредственно переведены в соответствующий полипептидный продукт.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему полинуклеотид, описанный в данном документе, функционально связанный по меньшей мере с одной контрольной последовательностью, которая направляет экспрессию полипептида в экспрессирующей клетке-хозяине.

Есть несколько способов вставки нуклеиновой кислоты в нуклеотидную конструкцию или экспрессирующий вектор, известных специалистам в данной области, см., например, Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001. Желательным может быть проведение манипуляции с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид по настоящему изобретению с регуляторными последовательностями, такими как последовательности промотора и терминатора.

Промотор может быть любой приемлемой последовательностью промотора, подходящей для эукариотической или прокариотической клетки-хозяина, которая проявляет транскрипционную активность, в том числе мутантные, усеченные и гибридные промоторы, и может быть получена из полинуклеотидов, кодирующих внеклеточные или внутриклеточные полипептиды в клетке, либо эндогенно (нативные), либо гетерологично (инородные). Промотор может быть конститутивным или индуцируемым промотором. В предпочтительном воплощении промотор представляет собой индуцируемый промотор, например крахмал-индуцируемый промотор. Промоторами, пригодными в мицелиальных грибах, являются промоторы, которые могут быть выбраны из группы, которая включает, без ограничения указанным, промоторы, полученные из полинуклеотидов, кодирующих ТАКА-амилазу *A. oryzae*, аспарагиновую протеазу *Rhizomucor miehei*, промотор *gpdA Aspergillus*, нейтральную альфа-амилазу *A. niger*, кислотостабильную альфа-амилазу *A. niger*, глюкоамилазу (*glaA*) *A. niger* или *A. awamori*, эндоксилазу (*xlnA*) или бета-ксилозидазу (*xlnD*) *A. niger* или *A. awamori*, целлюлогидролазу I (CBHI) *T. reesei*, липазу *R. miehei*, щелочную протеазу *A. oryzae*, триозфосфатизомеразу *A. oryzae*, ацетомидазу *A. nidulans*, амилогликозидазу (WO 00/56900) *Fusarium venenatum*, *Fusarium venenatum* Dania (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), трипсинподобную протеазу *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), бета-глюкозидазу *Trichoderma reesei*, целлюлогидролазу I *Trichoderma reesei*, целлюлогидролазу II *Trichoderma reesei*, *Trichoderma reesei*, эндоглюконазу 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 триозфосфат изомеразу *A. oryzae*), и их мутантные, укороченные и гибридные промоторы.

Может быть использован любой терминатор, который является функциональным в клетке, описанной в данном документе, который известен специалисту в данной области. Примеры подходящих терми-

наторных последовательностей различных видов мицелиальных грибов включают терминаторные последовательности из гена мицелиального гриба, например из генов *Aspergillus*, например из гена ТАКА-амилазы *A. огугае*, из гена, кодирующего глюкоамилазу (*glaA*) *A. niger*, антранилатсинтазу *A. nidulans*, альфа-глюкозидазу *A. niger*, *trpC* и/или трипсиноподобную протеазу из *Fusarium oxysporum*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты или вектор экспрессии, описанный в данном документе. Подходящая клетка-хозяин может быть клеткой млекопитающего, насекомого, растения, гриба водоросли или бактерии. Подходящая клетка-хозяин может быть грибной клеткой, например, из рода

Acremonium, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Fusarium*,
Myceliophthora, *Penicillium*, *Rasamsonia*, *Talaromyces*, *Thielavia*, *Trichoderma*,
Saccaromyces, *Kluyveromyces*, *Pichia*, например, *Aspergillus niger*, *Aspergillus Awamori*,
Aspergillus foetidus, *A. ozygae*, *A. sojae*, *Talaromyces emersonii*, *Rasamsonia emersonii*
Chrysosporium lucknowense, *Fusarium oxysporum*, *Myceliophthora thermophila*, *Thielavia*
terrestris или *Trichoderma reesei* или *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia*
pastoris.

Клетка-хозяин может быть рекомбинантной или трансгенной клеткой-хозяином.

Клетка-хозяин может быть генетически модифицирована с помощью нуклеотидной конструкции или экспрессирующего вектора, описанных в данном документе с помощью стандартных способов, известных в данной области, таких как электропорация, трансформация протопластов или конъюгация, например, как описано в Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001. Рекомбинантный хозяин может избыточно экспрессировать полипептид в соответствии с настоящим изобретением с помощью известных методов в данной области техники.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к способу получения полипептида, как описано в данном документе, включающему культивирование рекомбинантной клетки-хозяина в подходящей среде для ферментации в условиях, способствующих выработке полипептида, и продуцирования полипептида. Специалистам в данной области известно, как осуществить способ получения полипептида, описанного в данном документе, в зависимости от используемой клетки-хозяина, pH, температуры и состава ферментационной среды. Клетки-хозяева могут культивироваться в колбах или в биореакторах, имеющих объем 0,5 или 1 л или больше, от 10 до 100 м³ или более. Культивирование может быть осуществлено в аэробных или анаэробных условиях в зависимости от потребностей клетки-хозяина.

Предпочтительно, если полипептид, описанный в данном документе, извлекают или выделяют из ферментационной среды. Извлечение или выделение полипептида из ферментационной среды, например, может быть выполнено с помощью центрифугирования, фильтрации и/или ультрафильтрации.

Полипептид, обладающий активностью пролин-специфичной эндопротеазы, или композиция, содержащая полипептид, описанный в данном документе, могут быть использованы в самых различных применениях, например в производстве продуктов питания или кормов, например в производстве белкового гидролизата. Некоторые пищевые белки содержат высокоаллергенные субфракции, которые могут быть даже токсичными для конкретных лиц, такие как глютен, который содержит проламины с богатыми пролином пептидными последовательностями. Эти белки могут быть подвергнуты воздействию нового фермента для того, чтобы уменьшить их антигенность или токсичность.

Группа людей, для которых глютен является токсичным, представляет собой индивидуумов, страдающих от целиакии-спру. Целиакия-спру, также известная как целиакия, является аутоиммунным заболеванием тонкого кишечника, которое вызывается приемом в пищу глютенных белков из хлебных злаков, таких как альфа-глиадин из пшеницы, гордеин из ячменя, секалин из ржи и авенин из овса.

Соответственно, полипептид, обладающий активностью пролин-специфичной эндопротеазы, или композиция, содержащая полипептид, описанный в данном документе, могут быть использованы при приготовлении диетической добавки или в качестве лекарственного средства для лечения пациента, страдающего от целиакии-спру, или при лечении непереносящих глютен людей.

Полипептид, раскрытый в данном описании, также может быть использован в качестве технологической добавки для гидролиза глютена в пищевом продукте.

Соответственно, настоящее изобретение относится к способу приготовления пищевого или кормового продукта, который включает инкубирование промежуточной формы пищевого или кормового продукта с полипептидом или композицией, содержащей полипептид, описанный в данном документе, и приготовление пищевого или кормового продукта. Пищевой продукт в способе, раскрытом в описании, включает напиток, такой как пиво, вино или фруктовый сок, или хлебобулочное изделие, или молочный продукт, без ограничения перечисленным.

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

Было установлено, что полипептид, обладающий активностью пролин-специфичной эндопротеазы, описанный в данном документе, был способен к гидролизу токсичного эпитопа глютена на нетоксичные

фрагменты.

Промежуточная форма пищевого продукта может быть любой подходящей формой пищевого продукта во время приготовления пищевого продукта. Например, промежуточная форма пива может быть суслом, а промежуточная форма хлеба может быть тестом или жидким тестом.

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

Пищевой продукт в способе, описанном в настоящем документе, также может быть белковым гидролизатом. Соответственно, настоящее изобретение относится к способу получения белкового гидролизата, включающему приведение в контакт с белковым субстратом полипептида или композиции, описанных в данном документе, и получения белкового гидролизата. Белковый гидролизат может быть получен из любого подходящего белкового субстрата, например белкового субстрата, который богат остатками пролина, например глутена зерновых или казеина коровьего молока.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к пищевому продукту, получаемому с помощью способа приготовления пищевого продукта, раскрытого в данном описании.

Следующие примеры иллюстрируют изобретение.

Примеры

Материалы и методы.

Стандартные процедуры с ДНК проводили, как описано в Sambrook & Russell, 2001, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, если не указано иное. Последовательности ДНК были заказаны в DNA 2.0.

Пример 1. Клонирование, экспрессия и выделение (мутантной) пролин-специфичной эндопротеазы (PER).

Пример 1.1. Клонирование и экспрессия.

Последовательность белка пролин-специфичной эндопротеазы (PER) из *A. niger* представлена в SEQ ID NO: 1, где первые 17 аминокислот представляют собой сигнальную последовательность пектинметилэстеразы *A. niger* (PMEA cc; SEQ ID NO: 2), а следующая часть состоит из 19 аминокислот пропоследовательности пролинэндопротеазы *A. niger* (SEQ ID NO: 4).

Разработали кодон-адаптированную последовательность ДНК для экспрессии этого белка в *Aspergillus niger*, содержащую дополнительные сайты рестрикции для субклонирования в экспрессирующем векторе для *Aspergillus*. Кодоновую адаптацию проводили, как описано в публикации WO 2008/000632. Кодон-оптимизированная последовательность ДНК для гена *A. niger*, кодирующая белок PER с SEQ ID: NO: 1, представлена в SEQ ID NO: 2.

Подобным же образом мутантные пролин-специфические эндопротеазы из SEQ ID NO: 1, которые перечислены в табл. 1-3, были оптимизированы по кодам для экспрессии в *Aspergillus niger*.

Аналогичным образом пролин-специфичной эндопротеазы из *A. Flavus*, *A. aculeatus* и *Rasamsonia emersonii*, показанные в SEQ ID NO: 10-12 и содержащие замену P469L в гомологическом положении относительно SEQ ID NO: 1, были оптимизированы по кодам для экспрессии в *A. niger*, что дает нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 14-16 соответственно.

Последовательность инициации трансляции промотора глюкоамилазы *glaA* модифицировали в 5'-CACCGTCAAA ATG-3', и оптимальную последовательность терминации трансляции 5'-TAAA-3' использовали при получении экспрессирующей конструкции (как также подробно описано в WO 2006/077258). Фрагмент ДНК, содержащий а.о. часть промотора глюкоамилазы и гена, кодирующего PER, синтезировали полностью, очищали и гидролизировали с помощью *EcoRI* и *PacI*. Вектор pGBTOP-16 (фиг. 1) линеаризовали гидролизом *EcoRI/PacI* и линеаризованный векторный фрагмент затем очищали с помощью гель-экстракции. ДНК-фрагмент, содержащий кодирующую область PER, клонировали в вектор pGBTOP-16, в результате чего получали pGBTOP-PER. Затем *A. niger* GBA 306 ($\Delta glaA$, $\Delta perA$, $\Delta hdaA$, адаптированный *Bam* III ампликон, $\Delta amyBII$, $\Delta amyBI$, $\Delta amyA$ альфа-амилаза и отрицательная цепь глюкоамилазы) трансформировали вектором pGBTOP-PER, линеаризованным гидролизом *Not I*, в контрансформационном протоколе с линеаризованным pGBAAS-4, с помощью штамма и способов, описанных в WO 2011/009700 и ссылок в этом документе, отбирали на ацетамид-содержащих средах и очищали колонии в соответствии со стандартными процедурами. Трансформацию и отбор осуществляли, как описано в WO 98/46772 и WO 99/32617. Штаммы, содержащие ген PER, отбирали с помощью праймеров ПНР, специфичных для гена PER, для того, чтобы проверить наличие экспрессирующей кассеты pGBTOP-PER. Трансформанты отбирали и далее пересевали репликой для получения инокулята одиночного штамма.

Пример 1.2. Получение (мутантного) PEP в штамме A Niger PEP.

Для каждой (мутантной) пролин-специфичной эндопротеазы PEP получали свежие споры *A. niger* PEP. Четыре встряхиваемые колбы с 100 мл ферментационной среды 1 (10% мас./об. твердого вещества кукурузного экстракта, 1% мас./об. глюкозы, H_2O , 0,1% мас./об. $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 0,05% мас./об. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,025% мас./об. Basildon, pH 5,8) в 500 мл встряхиваемых колбах с дефлектором инокулировали 10^7 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 колбы с 1 л ферментационной среды 2 (15% мас./об., мальтозы, 6% мас./об. Bacto-soytone, 1,5% мас./об. $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% мас./об. $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 0,1% мас./об. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1% мас./об. L-аргинина, 8% мас./об. Tween-80, 2% мас./об. Basildon, 2% мас./об. об/мин. Через 3, 4, 5, и 6 дней инкубации pH культуры понижали до 5,0 с помощью 2н. HCl и образцы из каждой из этих временных точек анализировали на активность PEP. 50 мл образца отбирали и отделяли надосадочную жидкость от биомассы путем центрифугирования и последующей фильтрации. Образец с наибольшей активностью использовали для описания полученного мутанта PEP.

Пример 2. Измерения активности пролин-специфичной эндопротеазы (PEP).

100 мкл культуральной надосадочной жидкости, полученной в примере 1, разводили в 0,1 М натрий-ацетатного буфера при pH 4,5 с 50 мМ NaCl, инкубировали 100 мкл 6 мМ Ac-AAP-pNA (ацетил-AlaAlaPro-паранитроанилин из Selleckchem или CPC Scientific; чистота >95,0% на основании анализа ВЭЖХ) в 0,1 М NaAc буфере при pH 4,5 с 50 мМ NaCl, в 96-луночных плоскодонных МТР-планшетах (микротитрационных планшетах) Nunc. Через 60 мин при 20°C реакцию останавливали добавлением 40 мкл 1 М HCl. pNA, который был освобожден PEP, измеряли спектрофотометром Tecan МТР при 405 нм (A405) (www.tecan.com). Пустые образцы получали смешиванием разбавленной культуральной надосадочной жидкости с раствором субстрата, который был смешан с раствором HCl заблаговременно. Активность выражается в pNASU.

1 pNASU - это количество фермента, которое высвобождает из Ac-AAP-pNA в течение 1 ч количество pNA, которое соответствует увеличению поглощения при 405 нм на 1 OD, в условиях, описанных выше. A405 не должно быть ниже пустого значения в начале реакции или выше 2,5 в конце реакции, и также A405 не может превышать линейный диапазон используемого спектрофотометра.

Пример 3. Термическая стабильность пролин-специфичной эндопротеазы.

Для оценки термостабильности родительского PEP и мутантов, перечисленных в табл. 1, анализ активности проводили после инкубирования 100 мкл аликвоты десятикратного разведения надосадочной жидкости культуры, полученной в примере 1, в буфере (0,1 М NaAc pH 4,5, с 50 мМ NaCl) при 55°C и 65°C в течение 15 мин в ПЦР-планшете в машине для ПЦР. После 15 мин инкубации образцы быстро охлаждали до 25°C в машине для ПЦР. Измеряли pNASU/мл каждого образца. Начальную активность, измеренную до инкубации при повышенной температуре (0 мин), использовали в качестве эталона (100%) для определения остаточной активности. Все активности измеряли четыре раза.

Табл. 1 показывает, что все пролин-специфические эндопротеазы, обладающие мутацией в положении 469, имеют значительную пониженную остаточную активность по сравнению с родительской пролин-специфичной эндопротеазой после выдерживания ферментов при 65°C в течение 15 мин.

Таблица 1

Остаточная активность мутантов пролин-специфичной эндопротеазы по сравнению с исходной пролин-специфичной эндопротеазой после выдержки при температуре 55 и 65°C в течение 15 мин

PEP Клон	Замены по отношению к родительской SEQ ID NO: 1	Остаточная активность (pNASU) при указанной T после 15'		
		55°C	60°C	65°C
PEP	Родительская	100%	93%	80%
P469A	P469A	97%	67%	51%
P469C	P469C	93%	61%	18%
P469D	P469D	77%	35%	<2%
P469E	P469E	99%	72%	30%
P469F	P469F	72%	37%	<2%
P469G	P469G	89%	80%	21%
P469H	P469H	103%	27%	0%
P469I	P469I	103%	66%	15%
P469K	P469K	127%	70%	15%
P469L	P469L	88%	58%	7%
P469M	P469M	92%	85%	30%
P469N	P469N	90%	41%	<2%
P469Q	P469Q	84%	78%	33%
P469R	P469R	100%	59%	13%
P469S	P469S	104%	63%	25%
P469T	P469T	84%	65%	11%
P469V	P469V	92%	80%	21%
P469W	P469W	72%	47%	<2%
P469Y	P469Y	58%	39%	<2%

Пример 4. Термостойкость пролин-специфичной эндопротеазы, содержащей мутацию в положении P469 и дополнительную мутацию.

Мутации в положении P469 в значительной степени способствуют снижению термостабильности пролин-специфичной эндопротеазы из *Aspergillus niger*. Другие аминокислотные замены, т.е. I204F, P377A, P477A, P304S и P377A, P466T и I204F и P466T и P477A, вводили в последовательность пролин-специфичной эндопротеазы для исследования возможного дополнительного снижения термостабильности пролин-специфичной эндопротеазы из *A. niger*.

Клонирование, экспрессию и извлечение мутантов проводили, как описано в примере 1. Определение остаточной активности проводили, как описано в примере 3. В табл. 2 показана термостабильность родительской пролин-специфичной эндопротеазы и мутантной пролин-специфичной эндопротеазы, содержащей одну замену в положении 204, 377 и 477.

Таблица 2

Остаточная активность родительской пролин-специфичной эндопротеазы (PEP) из *Aspergillus niger* и мутантной PEP, содержащей одну замену

	Замены по отношению к родительской SEQ ID NO 1	Остаточная активность при указанной T после 15'		
		55°C	60°C	65°C
PEP	Родительская	100%	93%	80%
PEP4	I204F	83%	58%	8%
PEP8	P377A	89%	56%	11%
PEP10	P477A	86%	37%	1%

Таблица 3

Остаточная активность мутантной пролин-специфичную эндопротеазы из *Aspergillus niger*, которая несет замену в положении P469 и дополнительные замены

	Замены по отношению к родительской SEQ ID NO: 1	Остаточная активность при указанной T после 15'					
		60,4°C	57,3°C	52,5°C	47,0°C	42,4°C	39,4°C
PEP-5_18	P469D + I204F	0%	0%	4%	64%	99%	100%
PEP-5_57	P477A + P469Q	0%	0%	10%	70%	93%	99%
PEP-5_22	P469D + P377A	0%	5%	39%	79%	99%	100%
PEP-5_15	P377A + P304S + P469Y	0%	5%	37%	82%	100%	99%
PEP-5_73	P466T + P469Q + I204F	1%	1%	12%	66%	91%	98%
PEP-5_74	P466T + P469Q + P477A	0%	0%	3%	46%	80%	96%

Результаты в табл. 3 показывают, что термостабильность пролин-специфичной эндопротеазы, включающей замену в положении 469, может быть дополнительно снижена путем замены в одном или нескольких дополнительных положениях аминокислот, без потери активности фермента при более низких температурах.

Пример 5. Термическая стабильность мутантов гомологичной пролин-специфичной эндопротеазы.

Для того чтобы установить, является ли мутация в положении P469 в пролин-специфичной эндопротеазы *Aspergillus niger* в более общем смысле применимой для снижения термостабильности в гомологичном положении в другой пролин-специфичной эндопротеазе, мутацию в положении, гомологичном 469 в SEQ ID NO: 1, вводили в пролин-специфичные эндопротеазы, полученные из *Aspergillus flavus*, *Aspergillus aculeatus* и *Rasamsonia emersonii*.

Для того чтобы установить положение в пролин-специфичной эндопротеазе, которое соответствует мутированному положению в эталонной пролин-специфичной эндопротеазе из *Aspergillus niger*, последовательности выравнивали. Выравнивание показано на фиг. 2, и проценты идентичности приведены в табл. 4. Идентичность была определена с помощью NEEDLE с использованием настроек NOBRIEF. Самая длинная идентичность (Longestidentity), т.е. включая препоследовательность, была принята в качестве меры идентичности между двумя последовательностями.

Таблица 4

Идентичность последовательности гомологичных пролин-специфичных эндопротеаз, полученных из *A. carbonarius*, *A. Flavus*, *A. aculeatus* и *Rasamsonia emersonii* по отношению к пролин-специфичной эндопротеазе из *A. niger*

Происхождение пролин-специфичной эндопротеазы	Аминокислотная последовательность (в том числе пре-про последовательности)	Longest identity определена с помощью NEEDLE (NOBRIEF)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	SEQ ID NO: 9	91,4%
<i>Aspergillus Flavus</i>	SEQ ID NO: 10	81,0%
<i>Aspergillus aculeatus</i>	SEQ ID NO: 11	81,0%
<i>Rasamsonia emersonii</i>	SEQ ID NO: 12	62,1%

Замену вводили P469L в *Aspergillus Flavus*, *Aspergillus aquleatus* и *Rasamsonia emersonii*. Для оценки термостабильности родительской пролин-специфичной эндопротеазы и P469L мутантов анализу активности предшествовало инкубирование 100 мкл аликвот десятикратного разведения культуральной надосадочной жидкости в буфере (0,1 М NaAc pH 4,5, 50 мМ NaCl) при 60°C в течение 15 мин в ПЦР-планшете в машине для ПЦР. После 15 мин инкубации образцы быстро охлаждали до 25°C в машине для ПЦР. Измеряли рNASU/мл для каждого образца. Начальную активность, измеренную до инкубации при повышенной температуре (0 мин), использовали в качестве эталона (100%) для определения остаточной активности.

Таблица 5

Остаточная активность грибных пролин-специфичных эндопротеаз, имеющих аминокислотную замену, гомологичную P469L в PEP из *A. niger*, после инкубации в течение 15 мин при 60°C

Родительская	Родительская активность	P469L
<i>A. niger</i>	100%	62%
<i>A. flavus</i>	100%	3%
<i>A. aculeatus</i>	100%	18%
<i>R. emersonii</i>	100%	85%

Результаты, представленные в табл. 5, показывают, что замещение аминокислоты в положении 469, т.е. P469L, снижает термостабильность пролин-специфичной эндопротеазы не только из *Aspergillus niger*, но также и в случае гомологичных положений в пролин-специфических эндопротеазах из *Aspergillus Flavus*, *Aspergillus Aculeatus* и *Rasamsonia emersonii*)

Пример 6. Субстратная специфичность пролин-специфичных эндопротеаз.

Для того чтобы подтвердить, что мутанты являются пролин-специфичными эндопротеазами, оценивали субстратную специфичность различных мутантов PEP с помощью цитохрома С из сердца лошади. Разведения культуральной надосадочной жидкости, полученной в примере 1, инкубировали с цитохромом С из сердца лошади (Sigma), который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. Субстрат получали растворением 1 мг/мл цитохрома С в 100 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 4,5 и нагреванием при 95°C в течение 15 мин. Культуральную надосадочную жидкость разбавляли в 100 мМ NaAc буфере, pH 4,5 и инкубировали с раствором субстрата цитохрома С при 50°C в течение 3 ч. Реакцию прекращали путем разведения в воде и добавлением 0,4 М NaOH для повышения pH до 10. Инкубированные реакционные смеси анализировали на Accela UHPLC (Thermo Electron, Бреда, Нидерланды) в сочетании с масс-спектрометром LTQ-Orbitrap Fourier Transform Mass Spectrometer (Thermo Electron, Бремен, Германия). Хроматографическое разделение проводили на колонке C-18 Eclipse XDB Zorbax 2,1×50 мм, с размером частиц в 1,8 мкм и размером пор 80 Å (Agilent, Санта-Клара, Калифорния, США), с использованием градиентного элюирования водой класса LC-MS, (А) содержащей 0,1% муравьиной кислоты и (В) ацетонитрила класса LC-MS, содержащего 0,1% раствор муравьиной кислоты (Biosolve BV, Нидерланды) в качестве подвижной фазы. 25 мин градиент начинали от 0%, выдерживали в течение 1 мин, а затем линейно повышали до 40% (В) в течение 14 мин, после чего промывали 80% (В) в течение 4 мин и повторно уравнивали с 0% (В) в течение 5 мин. Скорость потока поддерживали на уровне 0,4 мл/мин с использованием инжезируемого объема 5 мкл и температуры колонки 50°C. Получение данных масс-спектрометрии осуществляли с Top 3, зависимым от данных получением, с использованием опций "Хроматографии" и "Динамическое исключение", которые были включены только, и состояния заряда 2 и 3 были включены. Разрешение для сканирования FT MS составляло 15000 и сканировали в диапазоне 210-2000 m/z, при этом эксперименты MS/MS проводили в ионной ловушке. Ширина изоляции была установлена на уровне 3,0 m/z, а нормализованная энергия столкновений было установлена на уровне 35. Идентификацию пептида проводили с использованием точной массы и MS/MS De Novo секвенированных данных.

Когда основные пептиды SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 8, в частности SEQ ID NO: 4-SEQ ID NO: 6, были получены, это показало, что мутантные пролин-специфические эндопротеазы имели активность пролин-специфичной эндопротеазы, т.е. имеют предпочтение разрезать в положении, в котором в пептиде находится остаток пролина. Это было подтверждено для P469D, P469F, P469G, P469H, P469N, P469Q, P469S, P469T и P469W (результаты не показаны).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, обладающий активностью пролин-специфичной эндопротеазы, где полипептид выбран из группы, состоящей из:

i) полипептида, который, когда выровнен относительно аминокислотной последовательности по SEQ ID NO: 1, содержит аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Ala (A), Cys (C), Asp (D), Phe (F), Gly (G), His (H), Ile (I), Lys (K), Leu (L), Met (M), Asn (N), Gln (Q), Arg (R), Ser (S), Thr (T), Val (V), Trp (W) и Tyr (Y), в положении, соответствующем положению 469;

ii) полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, в соответствии с SEQ ID NO: 1, где SEQ ID NO: 1 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из P469A, P469C, P469D, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W и P469Y;

iii) полипептида по (i), (ii), но утратившего сигнальную последовательность и/или последовательности пропротеина;

iv) полипептида по (i)-(iv), где полипептид идентичен по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% аминокислотной последовательности по SEQ ID NO: 1;

v) полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, которая идентична по меньшей мере на 80, 85,

90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% SEQ ID NO: 2 или зрелой кодирующей последовательности SEQ ID NO: 2, где последовательность SEQ ID NO: 2 содержит по меньшей мере одну мутацию, кодирующую по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы P469A, P469C, P469D, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W и P469Y;

vi) полипептида по (i)-(iv), где полипептид дополнительно содержит аминокислотную замену I204F, P304S, P377A, P466T и/или P477A; и

vii) полипептида по (v), где SEQ ID NO: 2 дополнительно содержит мутацию, кодирующую аминокислотную замену I204F, P304S, P377A, P466T и/или P477A.

2. Полипептид по п.1, где указанный полипептид имеет менее чем 70% остаточной активности на ацетил-AlaAlaPro-паранитроанилине (Ac-AAP-PNA) в качестве субстрата после выдержки полипептида при температуре 65°C в течение 15 мин.

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

4. Способ получения вариантного полипептида, который включает:

i) отбор исходного полипептида, идентичного по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% аминокислотной последовательности по SEQ ID NO: 1 или зрелому полипептиду по SEQ ID NO: 1; и

ii) замену по меньшей мере одной аминокислоты в положении, соответствующем положению 469, на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из Ala (A), Cys (C), Asp (D), Phe (F), Gly (G), His (H), Ile (I), Lys (K), Leu (L), Met (M), Asn (N), Gln (Q), Arg (R), Ser (S), Thr (T), Val (V), Trp (W) и Tyr (Y); и

iii) получение вариантного полипептида,

где вариантный полипептид имеет менее 70% остаточной активности на ацетил-AlaAlaPro-паранитроанилине (Ac-AAP-PNA) в качестве субстрата после того, как полипептид был выдержан при температуре 65°C в течение 15 мин.

5. Способ по п.4, дополнительно предусматривающий замену аминокислоты в положении 204 на Phe (F), в положении 304 на Ser (S), в положении 377 на Ala (A), в положении 466 на Thr (T) и/или в положении 477 на Ala (A).

6. Композиция, содержащая полипептид по любому из пп.1-3, предназначенная для использования в производстве пищевого продукта или корма.

7. Композиция по п.6, содержащая носитель, наполнитель или вспомогательный фермент.

8. Нуклеиновая кислота, кодирующая пролин-специфичную эндопротеазу, которая идентична по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% SEQ ID NO: 2 или зрелой кодирующей последовательности по SEQ ID NO: 2, где последовательность SEQ ID NO: 2 содержит по меньшей мере одну мутацию, кодирующую по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W, P469Y, где аминокислотные замены определяются относительно SEQ ID NO: 1.

9. Нуклеиновая кислота по п.8, где SEQ ID NO: 2 содержит по меньшей мере одну дополнительную мутацию, кодирующую аминокислотную замену I204F, P304S, P377A, P466T и/или P477A.

10. Нуклеиновая кислота, которая представляет собой выделенную, по существу чистую, чистую, рекомбинантную, синтетическую или вариантную нуклеиновую кислоту нуклеиновой кислоты по п.8 или 9.

11. Экспрессирующий вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.8 или 9, функционально связанную по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью, которая управляет экспрессией полипептида в клетке-хозяине.

12. Рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп.8 или 9 или экспрессирующий вектор по п.11.

13. Способ получения полипептида по п.1 или 3, включающий культивирование клетки-хозяина по п.12 в подходящей среде для ферментации в условиях, обеспечивающих экспрессию полипептида, и получение полипептида.

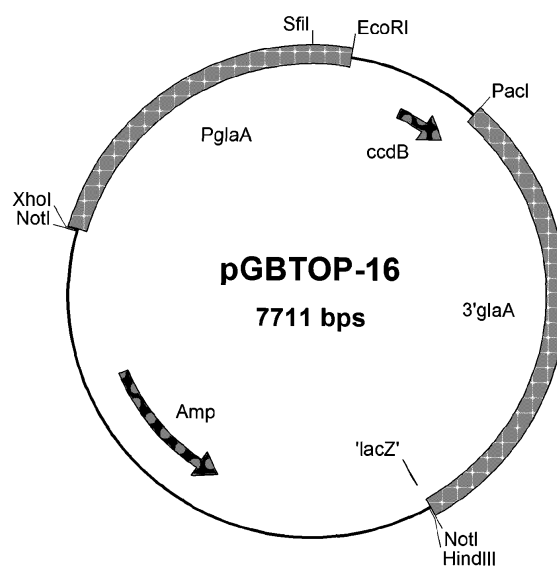
14. Способ по п.13, далее включающий выделение полипептида.

15. Способ приготовления пищевого или кормового продукта, включающий взаимодействие промежуточной формы пищевого или кормового продукта с полипептидом по пп.1-3 или композиции по п.6 или 7 и приготовление пищевого или кормового продукта.

16. Способ по п.15, в котором пищевой продукт представляет собой напиток, предпочтительно пиво.

17. Способ по п.15 или 16, отличающийся тем, что пищевой продукт содержит глютен.

18. Пищевой или кормовой продукт, получаемый способом по любому из пп.15-17.



Фиг. 1

	0 10 20 30 40 50 60
Aspergillus niger (PEP)	-----MVKSILASVFFAATALAARPLVVKPVSRRPASSKSAATTGEAYFEQLLDHNNPEKGTFSQRYWWS
Aspergillus carbonarius	-----MVKSILASVFFAATALAARPLVVKPVSRRPASSKSAATTGEAYFEQLVDHNNPEKGTFSQRYWWS
Aspergillus flavus	-----MVKSILASVFFAATALAARPLVVKPVSRRPASSKSAATTGEAYFEQLLDHNSKGTFSQRYWWS
Aspergillus aculeatus	-----MVKSILASVFFAATALAARPLVVKPVSRRPASSKSAATTGEAYFEQLDHSKGTFSQRYWWS
Rasamsoni_emersonii	MPSLSSLVALTASLVSLAAAAARPLFLPPRPPLPPRDPLHGPTNASATFQQLLDHNNPELGTFSQRYWWS
	70 80 90 100 110 120 130
Aspergillus niger (PEP)	TEYWGGPGSPVVLFTPGVEVSADGYEGYLTNETLTGVYAQEIQQGAVILIEHRYWGDSSPYEVLNAETLQYL
Aspergillus carbonarius	TEYWGGPGSPVVLFTPGVEVSADGYEGYLTNETLTGVYAQEIQQGAVILIEHRYWGDSSPYEVLNAETLQYL
Aspergillus flavus	TEYWGGPGSPVVLFTPGVEVSADGYEGYLTNETLTGVYAQEIQQGAVILIEHRYWGDSSPYEELTAE TLQYL
Aspergillus aculeatus	AQYWGGPGSPVVLFTPGVEVSADGYEGYLTNETLTGVYAQEIQQGAVILIEHRYWGDSSPYTNLTAE TLQYL
Rasamsoni_emersonii	DEFWKGPGSPVVLFTPGVEVSADGYEGYLTNETLTGVYAQEIQQGAVILIEHRYWGDSSPYD SLT TKNLQYL
	140 150 160 170 180 190 200
Aspergillus niger (PEP)	TLDQAILDMITYFAETVKLQFDNSTRSNAQNAFWVMVGGSYSGALTAWTESVAPGTFWAYHATSAPVEAIY
Aspergillus carbonarius	TLDQAVLDMITYFAETVKLQFDNSTRSNAQNAFWVMVGGSYSGALTAWTESVAPGTFWAYHATSAPVEAIY
Aspergillus flavus	TLEQSIILDLTHFAETVQLFDTSSNSSNAPKAPWVLVGGSYSGALAAWTAAPGTFWAYHATSAPVQAID
Aspergillus aculeatus	TLEQSVLDLTYFAENVKLFQFDNSTRSNAQNAFWVMVGGSYSGALTAWTEHLAPGTFWAYHATSAPVESIY
Rasamsoni_emersonii	TLKQSIADLTYFAETVKLQFDNSTRSNAQNAFWVLVGGSYSGALSAWTAASPGTFWAYHASSAPVEAIY
	210 220 230 240 250 260 270
Aspergillus niger (PEP)	DYWQYFYPIQQGMAQNCSDKVSLVAEYVDRIKNGTAKEQQALKKELFGLGAVEHFDFAAVLPNGPYLWQ
Aspergillus carbonarius	DFWQYFYPIQQGMAQNCSDKVSRVAEYVDRIKNGTAKEQQALKKELFGLGAVEHFDFAAVLPNGPYLWQ
Aspergillus flavus	DFWQYFDPRIHGMAPNCSDKVSLVANHIDTVGKNGSAADQLALKELFGLGAVEHFDFAAALPFGPYLWQ
Aspergillus aculeatus	DFWQYFRPIQDGMANKNCSDKVSLVAEYVDRIKNGTAKEQQALKKELFGLGAVEHFDFAAVLPNGPYLWQ
Rasamsoni_emersonii	DYWQYFAPVQDGLPANCSDKVSRVVDYIDSVLQSGNATAKQQLKDLFGLGAVEHFDFAALENGFWLWQ
	280 290 300 310 320 330 340
Aspergillus niger (PEP)	DNDPATGYSSFFQFCDAVEGVVEAGAAVTPGPEGVGLEKALANYANWFNSTILPDYCASGYGWTDEWSVAC
Aspergillus carbonarius	DNDPATGYSEFFQFCDAVEGVVEAGAAVTPGPEGVGLEKALANYANWFNSTILPDYCASGYGWTDEWSVAC
Aspergillus flavus	SNTFVTGYSNFFAFCDVAENVVAGAAVTPGPEGVGLEKALANYANWFNSTILPDYCASGYGWTDEWSVAC
Aspergillus aculeatus	DNTFATGYSDFFAFCDVAENVVAGAAVTPGAEGVGLEKALANYANWFNSTILPDYCASGYGWTDEWSVAC
Rasamsoni_emersonii	SNSFYDPIYPVVEFCDYVENAYASFPVVAAGPDGVGLEKALSGYATWNNKVFPPGFCATGYGWSNDSIAC
	350 360 370 380 390 400 410
Aspergillus niger (PEP)	FDSTYNASSPIYTDTSVGNVDRQWQWFLCNEPFFFWQDGAPEGVPTIVPRVLVSASYWQRQCPLYFPETNG
Aspergillus carbonarius	FDSTYNASSPLFTDTSVDNAVDRQWQWFLCNEPFFFWQDGAPEGVPTIVPRVLVSASYWQRQCPLYFPETNG
Aspergillus flavus	FDTHNPSSAIFDTSVDNAVDRQWQWFLCNEPFFFWQDGAPEGVPTIVPRVLVSASYWQRQCPLYFPETNG
Aspergillus aculeatus	YDTYNTTSPLFTDTSVDNAVDRQWQWFLCNEPFFFWQDGAPEGVPTIVPRVLVSASYWQRQCPLYFPETNG
Rasamsoni_emersonii	FDTYNQSSPMFTDLSYSNTINRQWQWFLCNEPFFFWQDGAPEGVPTIVPRVLVSASYWQRQCPLYFPETNG
	420 430 440 450 460 470 480
Aspergillus niger (PEP)	YTYGSAGKNAATVNSWTGGWDMTRNTTRLIWTNGQYDPRRDSGVSSSTRPGGQLASTANEPVQIIPGGF
Aspergillus carbonarius	YTFGSAGKNKTAATVNDWTGGWTFETRNTTRLIWTNGQYDPRRDSGVSSSTRPGGQLASTANEPVQIIPGGF
Aspergillus flavus	YTYGSAGKTAATVNTWTGGWSDSKNTSRLLWVNGQYDPRRDSGVSSSTRPGGQLASTANEPVQIIPGGF
Aspergillus aculeatus	YTYGSAGKKSANTFNAWTDGWFMMGNSTRLLIWTNGQYDPRRDSGVSSSTRPGGQLASTANEPVQIIPGGF
Rasamsoni_emersonii	YTYGSAGKTAADVNAWTKGWFLLT-NTTRLIWTNGELDPRRSAGVSSSTRPGGQLASTANEPVQIIPGGF
	490 500 510 520
Aspergillus niger (PEP)	HCSDLYMADYYANEGVKKVVDNEVQIKKVVVEYYA-
Aspergillus carbonarius	HCSDLYMADYYANAGVKKVVDNEVQIKKVVVEYYA-
Aspergillus flavus	HCSDLYLKDYFANAGVKKVVDNEVQIKKVVVEYYA-
Aspergillus aculeatus	HCSDLYISDSVYNAGVKKVVDNEVQIKKVVVEYYA-
Rasamsoni_emersonii	HCYDLILKNAEANAGVQVRVVDNEVQIKKVVVEYYA-

Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2