

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292265 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.02

(51) Int. Cl. C12N 5/10 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.02.03

(54) СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ЛЕЙЦИНДЕКАРБОКСИЛАЗЫ

(31) 62/970,039

(32) 2020.02.04

(33) US

(86) PCT/US2021/016450

(87) WO 2021/158686 2021.08.12

(71) Заявитель:
КОДЕКСИС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Лю Джойс, Тидт Линн Квертинмонт,
Деллас Никки, Дженн Стефан, Ду
Фэй Лоан, Валлье Кристен Жан,
Макклюски Керрин (US)

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

(57) Изобретение относится к сконструированным полипептидам лейциндекарбоксилазы (LDC) и их композициям, а также к полинуклеотидам, кодирующим сконструированные полипептиды лейциндекарбоксилазы (LDC). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC оптимизированы для обеспечения повышенной каталитической активности, а также пониженной чувствительности к протеолизу и/или повышенной устойчивости к средам с низким pH. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC оптимизированы для обеспечения улучшенной стабильности при хранении. Настоящее изобретение также относится к способам применения композиций, содержащих сконструированные полипептиды LDC, в терапевтических и промышленных целях.

A1

202292265

202292265

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575093EA/061

СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ЛЕЙЦИНДЕКАРБОКСИЛАЗЫ

[0001] В настоящей заявке испрашивается приоритет относительно № 62/970039, поданной 4 февраля 2020 г., полностью включенной в настоящее описание посредством ссылки для всех целей.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам лейциндекарбоксилазы (LDC) и их композициям, а также к полинуклеотидам, кодирующим сконструированные полипептиды лейциндекарбоксилазы (LDC). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC оптимизированы для обеспечения повышенной каталитической активности, а также пониженной чувствительности к протеолизу и/или повышенной устойчивости к средам с низким pH. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC оптимизированы для обеспечения улучшенной стабильности при хранении. Настоящее изобретение также относится к способам применения композиций, содержащих сконструированные полипептиды LDC, в терапевтических и промышленных целях.

ССЫЛКА НА «СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ», ТАБЛИЦУ ИЛИ ПРИЛОЖЕНИЕ К СПИСКУ КОМПЬЮТЕРНЫХ ПРОГРАММ, ПРЕДСТАВЛЕННОЕ В ВИДЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА ASCII

[0003] Список последовательностей, записанный в файле CX7-198WO2_ST25.TXT, созданном 3 февраля 2021 г., размером 2,06 мегабайта, машинный формат IBM-PC, операционная система MS-Windows, настоящим включен посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Болезнь кленового сиропа (MSUD), также называемая как «лейцинурия», дефицит альфа-лейциндегидрогеназы с разветвленной цепью и «дефицит BCKD», представляет собой редкую наследственную аминокислотопатию, вторичную по отношению к дисфункции комплекса дегидрогеназы кетокислоты с разветвленной цепью (BCKDH), который участвует в катаболическом пути лейцина, изолейцина и валина (то есть аминокислот с разветвленной цепью). Впервые она была описана в 1954 году Menkes et al. (Menkes et al., Pediatrics 14:462-467 [1954]) и названа так из-за характерного сладкого запаха мочи пораженных новорожденных. Она также характеризуется плохим питанием, рвотой, вялостью, аномальными движениями (например, гипер- или гипотонией) и задержкой развития. Без лечения заболевание может прогрессировать до энцефалопатии, судорог, комы, постоянных неврологических нарушений и смерти. В более позднем возрасте распространены задержки развития, проблемы с обучением, судороги и двигательные трудности. Существуют четыре распространенные формы, которые классифицируются на основе признаков и симптомов заболевания. Наиболее распространенным и тяжелым типом является «классический» тип, который проявляется в течение двух недель после рождения. Другими типами являются промежуточная MSUD,

прерывистая MSUD и MSUD, чувствительная к тиамину. В классической форме заболевание проявляется после употребления новорожденным молока, содержащего белок. Это приводит к увеличению содержания изолейцина, лейцина и валина в организме, что становится токсичным для мозга. При перемежающейся форме поражение головного мозга происходит во время физического стресса (например, при инфекции, лихорадке или длительном отказе от еды), что приводит к метаболической декомпенсации.

[0005] Диагностическое тестирование на MSUD у новорожденных включает анализы крови и мочи на аминокислоты для определения концентрации лейцина, изолейцина, аллоизолейцина и валина в этих жидкостях. При выявлении MSUD будут признаки кетоза и ацидоза. При постановке диагноза и во время симптоматических эпизодов лечение включает соблюдение безбелковой диеты и коррекцию метаболических последствий, связанных с повышенным уровнем аминокислот. Использование специального раствора для внутривенного введения снижает уровень лейцина (самого токсичного) и корректирует дефицит энергии.

[0006] Текущее лечение включает диетическое ограничение аминокислот с разветвленной цепью (BCAA). Недостаточный уровень комплексных ферментов BCKDH приводит к токсическому нарастанию BCAA и родственных им метаболитов в спинномозговой жидкости, крови и тканях. Без лечения или постоянного внимательного ухода это приводит к многочисленным и серьезным побочным эффектам (например, неврологическая дисфункция, судороги и младенческая смерть). Хотя и имеется некоторый вывод BCAA через почечный клиренс (приводящий к типичному сладкому запаху кленового сиропа мочи пораженных пациентов), этого недостаточно для облегчения накопления уровней токсичных аминокислот в организме (см., Schadewalt and Wendel, Eur. J. Pediatr., 156(Suppl. 1): S62-66 [1997]; и Skvorak, J. Inherit. Metab. Dis., 32(2):229-46 [2009]).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам лейциндекарбоксилазы (LDC) и их композициям, а также к полинуклеотидам, кодирующим сконструированные полипептиды лейциндекарбоксилазы (LDC). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC оптимизированы для обеспечения повышенной каталитической активности, а также пониженной чувствительности к протеолизу и/или повышенной устойчивости к средам с низким pH. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC оптимизированы для обеспечения улучшенной стабильности при хранении. Настоящее изобретение также относится к способам применения композиций, содержащих сконструированные полипептиды LDC, в терапевтических и промышленных целях.

[0008] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам LDC и их биологически активным фрагментам и аналогам, обладающим улучшенными свойствами по сравнению с ферментом LDC дикого типа или эталонным полипептидом

LDC по существу в тех же условиях. Изобретение дополнительно относится к способам применения сконструированных полипептидов LDC и их биологически активных фрагментов и аналогов в терапевтических и/или промышленных композициях и к способам применения таких композиций в терапевтических и/или промышленных целях.

[0009] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам лейциндекарбоксилазы, содержащим аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по меньшей мере с одной из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766, где аминокислотные положения указанных аминокислотных последовательностей пронумерованы относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766.

[0010] Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам лейциндекарбоксилазы, где указанные полипептидные последовательности имеют по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. Настоящее изобретение дополнительно относится к сконструированным полипептидам лейциндекарбоксилазы, где указанные полипептидные последовательности имеют по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. Настоящее изобретение дополнительно относится к сконструированным полипептидам лейциндекарбоксилазы, где указанные полипептидные последовательности имеют по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. Настоящее изобретение дополнительно относится к сконструированным полипептидам лейциндекарбоксилазы, где указанные полипептидные последовательности имеют по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8. Настоящее изобретение дополнительно относится к сконструированным полипептидам лейциндекарбоксилазы, где указанные полипептидные последовательности имеют по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10. Настоящее изобретение дополнительно относится к сконструированным полипептидам лейциндекарбоксилазы, где указанные полипептидные последовательности имеют по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14.

[0011] В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированная полипептидная последовательность лейциндекарбоксилазы имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12, и где полипептидная

последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 5, 14, 14/34/38/39/102/267/275/350/357, 14/39/102/127/245/267/275/349/350, 34/38/39/102/127/275/357, 34/38/39/102/275/357, 34/38/39/127/245/349/350/357, 34/38/39/127/245/350/357, 34/39/102/127/264/275/357, 34/39/102/127/275/349/357, 34/39/102/264/275/350/357, 34/39/275/349/350/357, 38/39/102/127/264/267/350/357, 38/39/102/127/267/275/349/350/357, 38/39/102/127/349/350/357, 38/39/102/127/350, 38/39/102/127/350/357, 38/39/127/245/267/357, 38/39/127/264/275, 38/39/127/264/350/357, 38/39/127/350/357, 38/39/127/357, 38/39/245/275/357, 38/39/264/267/275/350, 38/39/264/275/357, 38/39/275, 38/39/275/350, 39, 39/102/127/264/275/357, 39/102/264/275/357, 39/102/267/275/357, 39/127/245/264/267/275/350, 39/127/245/264/275/350/357, 39/127/245/357, 39/127/267/275/350/357, 39/127/267/350/357, 39/127/357, 39/245/264/267/275/357, 39/264/267/275/350, 39/275/350/357, 48, 139, 164, 196, 255, 299, 318, 324, 339, 343, 350, 353, 357, 364, 365, 379, 381, 386, 389, 391, 393, 394, 395, 397, 398, и 405, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 12. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 5M, 14I, 14T/34L/38V/39N/102S/267I/275S/350E/357V, 14T/39N/102S/127S/245M/267I/275S/349T/350E, 34L/38V/39N/102S/127S/275S/357V, 34L/38V/39N/102S/275S/357V, 34L/38V/39N/127S/245M/349T/350E/357V, 34L/38V/39N/127S/245M/350E/357V, 34L/39N/102S/127S/264V/275S/357V, 34L/39N/102S/127S/275S/349T/357V, 34L/39N/102S/264V/275S/350E/357V, 34L/39N/275S/349T/350E/357V, 38V/39N/102S/127S/264V/267I/350E/357V, 38V/39N/102S/127S/267I/275S/349T/350E/357V, 38V/39N/102S/127S/349T/350E/357V, 38V/39N/102S/127S/350E, 38V/39N/102S/127S/350E/357V, 38V/39N/127S/245M/267I/357V, 38V/39N/127S/264V/275S, 38V/39N/127S/264V/350E/357V, 38V/39N/127S/350E/357V, 38V/39N/127S/357V, 38V/39N/245M/275S/357V, 38V/39N/264V/267I/275S/350E, 38V/39N/264V/275S/357V, 38V/39N/275S, 38V/39N/275S/350E, 39N/102S/127S/264V/275S/357V, 39N/102S/264V/275S/357V, 39N/102S/267I/275S/357V, 39N/127S/245M/264V/267I/275S/350E, 39N/127S/245M/264V/275S/350E/357V, 39N/127S/245M/357V, 39N/127S/267I/275S/350E/357V, 39N/127S/267I/350E/357V, 39N/127S/357V, 39N/245M/264V/267I/275S/357V, 39N/264V/267I/275S/350E, 39N/275S/350E/357V, 39S, 48F, 139G, 164A, 164C, 196D, 196R, 255G, 255N, 255P, 299A, 299V, 318K, 324M, 324S, 324T, 339A, 339D, 343A, 343E, 350S, 353D, 353E, 353L, 353N, 353S, 353W, 357C, 357M, 364K, 364R, 365E, 379D, 379P, 381D, 381E, 386*, 389E, 389G, 389P, 389Q, 391*, 391E, 393T, 394E, 395A, 395D, 395G, 395K, 395S, 397A, 398*, 405D, 405E, 405H, и 405L, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 12. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная

последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях, выбранных из K5M, H14I, H14T/I34L/C38V/T39N/T102S/V267I/T275S/N350E/I357V, H14T/T39N/T102S/T127S/I245M/V267I/T275S/V349T/N350E, I34L/C38V/T39N/T102S/T127S/T275S/I357V, I34L/C38V/T39N/T102S/T275S/I357V, I34L/C38V/T39N/T127S/I245M/V349T/N350E/I357V, I34L/C38V/T39N/T127S/I245M/N350E/I357V, I34L/T39N/T102S/T127S/I264V/T275S/I357V, I34L/T39N/T102S/T127S/T275S/V349T/I357V, I34L/T39N/T102S/I264V/T275S/N350E/I357V, I34L/T39N/T275S/V349T/N350E/I357V, C38V/T39N/T102S/T127S/I264V/V267I/N350E/I357V, C38V/T39N/T102S/T127S/V267I/T275S/V349T/N350E/I357V, C38V/T39N/T102S/T127S/V349T/N350E/I357V, C38V/T39N/T102S/T127S/N350E/I357V, C38V/T39N/T127S/I245M/V267I/I357V, C38V/T39N/T127S/I264V/T275S, C38V/T39N/T127S/I264V/N350E/I357V, C38V/T39N/T127S/N350E/I357V, C38V/T39N/T127S/I357V, C38V/T39N/I245M/T275S/I357V, C38V/T39N/I264V/V267I/T275S/N350E, C38V/T39N/I264V/T275S/I357V, C38V/T39N/T275S, C38V/T39N/T275S/N350E, T39N/T102S/T127S/I264V/T275S/I357V, T39N/T102S/I264V/T275S/I357V, T39N/T102S/V267I/T275S/I357V, T39N/T127S/I245M/I264V/V267I/T275S/N350E, T39N/T127S/I245M/I357V, T39N/T127S/V267I/T275S/N350E/I357V, T39N/T127S/V267I/N350E/I357V, T39N/T127S/I357V, T39N/I245M/I264V/V267I/T275S/I357V, T39N/I264V/V267I/T275S/N350E, T39N/T275S/N350E/I357V, T39S, L48F, N139G, I164A, I164C, K196D, K196R, H255G, H255N, H255P, K299A, K299V, R318K, R324M, R324S, R324T, Q339A, Q339D, H343A, H343E, N350S, R353D, R353E, R353L, R353N, R353S, R353W, I357C, I357M, L364K, L364R, Q365E, K379D, K379P, A381D, A381E, D386*, K389E, K389G, K389P, K389Q, A391*, A391E, K393T, K394E, R395A, R395D, R395G, R395K, R395S, T397A, P398*, T405D, T405E, T405H, и T405L, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 12.

[0012] В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированная полипептидная последовательность лейциндекарбоксилазы имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 38, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 48/64/164/324/343/353/357/364, 48/64/164/324/343/364, 48/64/164/353/357/364, 48/64/357/364, 64/164/324/343/353/357/364, 64/164/324/343/357/364, 64/164/353/357, 64/318/324/357/364, 64/324/353/357/364, 132/255/339/379/395, 164/196/324/357/364, 164/318/324/343/353/357, 164/318/324/357/364, 164/324/343/353/357/364, 164/324/357/364, 164/353/357/364, 164/364,

196/318/324/353/357/364, 318/343/357, 324/343/357/364, 324/353/357/364, 324/357/364, 339/379/389/394/395, 339/389/395, 339/391, 339/394/395/405, 357/364, 379/386, 379/394/395/397/404/405, 379/394/395/397/405, 389/394/395/397/405, и 394/397, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 38. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 48F/64E/164A/324M/343E/353E/357C/364K, 48F/64E/164A/324M/343E/364R, 48F/64E/164C/353N/357V/364R, 48F/64E/357M/364K, 64E/164A/324M/343E/353D/357V/364K, 64E/164A/324M/343E/357C/364R, 64E/164C/353D/357V, 64E/318K/324S/357V/364R, 64E/324M/353N/357C/364R, 132F/255P/339A/379D/395D, 164A/196D/324M/357C/364K, 164A/318K/324M/343E/353E/357C, 164A/324M/343E/353D/357C/364R, 164A/324M/357C/364K, 164A/353W/357C/364R, 164A/364R, 164C/318K/324S/357V/364R, 164C/324M/343E/353D/357V/364R, 164C/353D/357V/364K, 164C/353D/357V/364R, 164C/353W/357C/364R, 196D/318K/324M/353N/357C/364K, 318K/343E/357C, 318K/343E/357M, 324M/343E/357V/364K, 324M/357M/364R, 324N/353W/357C/364K, 339A/379D/389G/394E/395D, 339A/389G/395K, 339A/391*, 339A/394E/395K/405D, 357V/364R, 379D/386*, 379D/394E/395D/397A/404I/405H, 379D/394E/395K/397A/405D, 389G/394E/395D/397A/405D, и 394E/397A, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 38. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из L48F/A64E/I164A/R324M/H343E/R353E/I357C/L364K, L48F/A64E/I164A/R324M/H343E/L364R, L48F/A64E/I357M/L364K, L48F/A64E/I164C/R353N/I357V/L364R, A64E/I164A/R324M/H343E/R353D/I357V/L364K, A64E/I164A/R324M/H343E/I357C/L364R, A64E/I164C/R353D/I357V, A64E/R318K/R324S/I357V/L364R, A64E/R324M/R353N/I357C/L364R, Y132F/H255P/Q339A/K379D/R395D, I164A/K196D/R324M/I357C/L364K, I164A/R318K/R324M/H343E/R353E/I357C, I164A/R324M/H343E/R353D/I357C/L364R, I164A/R324M/I357C/L364K, I164A/R353W/I357C/L364R, I164A/L364R, I164C/R318K/R324S/I357V/L364R, I164C/R324M/H343E/R353D/I357V/L364R, I164C/R353D/I357V/L364K, I164C/R353D/I357V/L364R, I164C/R353W/I357C/L364R, K196D/R318K/R324M/R353N/I357C/L364K, R318K/H343E/I357C, R318K/H343E/I357M, R324M/H343E/I357V/L364K, R324M/I357M/L364R, R324N/R353W/I357C/L364K, Q339A/K379D/K389G/K394E/R395D, Q339A/K389G/R395K, Q339A/A391*, Q339A/K394E/R395K/T405D, I357V/L364R, K379D/D386*, K379D/K394E/R395D/T397A/R404I/T405H, K379D/K394E/R395K/T397A/T405D, K389G/K394E/R395D/T397A/T405D, и K394E/T397A, где положения аминокислот

пронумерованы относительно SEQ ID NO: 38.

[0013] В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированная полипептидная последовательность лейциндекарбоксилазы имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 234, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 2, 3, 33, 48/64/255, 48/255/339, 48/255/379, 64, 64/255, 69, 161, 193, 255, 255/318/379, 259, 263, 318/339/379, 324, 324/389/394, 324/389/394/395, 324/389/394/397, 324/394, 324/394/395, 324/394/395/397, 324/395, 339, 340, 380, 382, 389, 389/394, 389/394/395, 389/394/395/397, 389/394/397, 389/395, 389/397, 390, 394, 394/395, 394/395/397, 395, 395/397, 397, 401, и 405, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 234. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 2E, 3M, 33L, 48F/64E/255P, 48F/255P/339A, 48F/255P/379D, 64E, 64E/255P, 64S, 69I, 161V, 193I, 255P, 255P/318K/379D, 259L, 263T, 263V, 318K/339A/379D, 324N, 324N/394E/395K/397A, 324N/395D, 324S/389G/394E, 324S/389G/394E/395D, 324S/389G/394E/397A, 324S/394E, 324S/394E/395K, 324S/394E/395K/397A, 324S/395K, 339A, 340T, 340V, 380E, 382S, 389G, 389G/394E, 389G/394E/395D, 389G/394E/395D/397A, 389G/394E/395K, 389G/394E/395K/397A, 389G/394E/397A, 389G/395D, 389G/395K, 389G/397A, 390*, 390A, 390E, 390S, 394E, 394E/395D, 394E/395K/397A, 395D/397A, 395K, 397A, 401*, 401Y, и 405H, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 234. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из G2E, N3M, F33L, L48F/A64E/H255P, L48F/H255P/Q339A, L48F/H255P/K379D, A64E, A64E/H255P, A64S, V69I, T161V, M193I, H255P, H255P/R318K/K379D, R259L, S263T, S263V, R318K/Q339A/K379D, M324N, M324N/K394E/R395K/T397A, M324N/R395D, M324S/K389G/K394E, M324S/K389G/K394E/R395D, M324S/K389G/K394E/T397A, M324S/K394E, M324S/K394E/R395K, M324S/K394E/R395K/T397A, M324S/R395K, Q339A, S340T, S340V, A380E, A382S, K389G, K389G/K394E, K389G/K394E/R395D, K389G/K394E/R395D/T397A, K389G/K394E/R395K, K389G/K394E/R395K/T397A, K389G/K394E/T397A, K389G/R395D, K389G/R395K, K389G/T397A, P390*, P390A, P390E, P390S, K394E, K394E/R395D, K394E/R395K/T397A, R395D/T397A, R395K, T397A, A401*, A401Y, и T405H, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 234.

[0014] В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированная полипептидная последовательность лейциндекарбоксилазы имеет по меньшей мере 85%,

86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 284, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 2/64/69/324/380/382/388/389, 3/64/69/263/339/380/388, 3/64/69/389, 3/64/69/390, 3/64/379/380/390, 3/69/263/380, 3/69/324, 3/69/324/380/382/389/390, 12/135/259/263, 12/135/263/382, 12/259/263/304, 48/64/255, 64/69, 64/69/189/259/263/304, 64/69/189/259/263/304/339/340/379, 64/69/223/388, 64/69/223/388/389/390, 64/69/304/379/382, 64/69/324, 64/69/324/339/380/389/390, 64/69/339, 64/69/339/382/388/389, 64/69/339/389/390, 64/69/379/380, 64/69/380/388/390, 64/69/389, 64/69/390, 64/255/263, 64/263, 64/324/339/389/390, 69/223/263/324/382/388/390, 69/223/324/379/380/382/388/390, 69/263, 69/263/324, 69/263/339, 69/263/388, 69/263/389/390, 69/324/379/380/388, 69/324/380, 69/339/390, 69/382/390, 259/263/304, 259/263/304/339/340/379, 263/339/389/390, 263/390, и 304/340/379/380/382, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 284. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 2E/64S/69I/324S/380E/382S/388A/389G, 3M/64S/69I/263T/339A/380E/388A, 3M/64S/69I/389G, 3M/64S/69I/390*, 3M/64S/379D/380E/390*, 3M/69I/263T/380E, 3M/69I/324S, 3M/69I/324S/380E/382S/389G/390*, 12G/135V/259K/263T, 12G/135V/263T/382G, 12G/259K/263T/304R, 48L/64A/255H, 64A/255H/263T, 64S/69I, 64S/69I/189A/259Q/263T/304R/339A/340T/379N, 64S/69I/189D/259K/263T/304R, 64S/69I/223M/388A, 64S/69I/223M/388A/389G/390*, 64S/69I/304R/379E/382G, 64S/69I/324S, 64S/69I/324S/339A/380E/389G/390*, 64S/69I/339A, 64S/69I/339A/382S/388A/389G, 64S/69I/339A/389G/390*, 64S/69I/379D/380E, 64S/69I/380E/388A/390*, 64S/69I/389G, 64S/69I/390*, 64S/263T, 64S/324S/339A/389G/390*, 69I/223M/263T/324S/382S/388A/390*, 69I/223M/324S/379D/380E/382S/388A/390*, 69I/263T, 69I/263T/324S, 69I/263T/339A, 69I/263T/388A, 69I/263T/389G/390*, 69I/324S/379D/380E/388A, 69I/324S/380E, 69I/339A/390*, 69I/382S/390*, 259K/263T/304R, 259K/263T/304R/339A/340T/379N, 263T/339A/389G/390*, 263T/390*, и 304R/340T/379D/380E/382G, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 284. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из G2E/E64S/V69I/M324S/A380E/A382S/Q388A/K389G, N3M/E64S/V69I/S263T/Q339A/A380E/Q388A, N3M/E64S/V69I/K389G, N3M/E64S/V69I/P390*, N3M/E64S/K379D/A380E/P390*, N3M/V69I/S263T/A380E, N3M/V69I/M324S, N3M/V69I/M324S/A380E/A382S/K389G/P390*, S12G/L135V/R259K/S263T, S12G/L135V/S263T/A382G, S12G/R259K/S263T/A304R,

F48L/E64A/P255H, E64A/P255H/S263T, E64S/V69I,
 E64S/V69I/T189A/R259Q/S263T/A304R/Q339A/S340T/K379N,
 E64S/V69I/T189D/R259K/S263T/A304R, E64S/V69I/A223M/Q388A,
 E64S/V69I/A223M/Q388A/K389G/P390*, E64S/V69I/A304R/K379E/A382G,
 E64S/V69I/M324S, E64S/V69I/M324S/Q339A/A380E/K389G/P390*, E64S/V69I/Q339A,
 E64S/V69I/Q339A/A382S/Q388A/K389G, E64S/V69I/Q339A/K389G/P390*,
 E64S/V69I/K379D/A380E, E64S/V69I/A380E/Q388A/P390*, E64S/V69I/K389G,
 E64S/V69I/P390*, E64S/S263T, E64S/M324S/Q339A/K389G/P390*,
 V69I/A223M/S263T/M324S/A382S/Q388A/P390*,
 V69I/A223M/M324S/K379D/A380E/A382S/Q388A/P390*, V69I/S263T, V69I/S263T/M324S,
 V69I/S263T/Q339A, V69I/S263T/Q388A, V69I/S263T/K389G/P390*,
 V69I/M324S/K379D/A380E/Q388A, V69I/M324S/A380E, V69I/Q339A/P390*,
 V69I/A382S/P390*, R259K/S263T/A304R, R259K/S263T/A304R/Q339A/S340T/K379N,
 S263T/Q339A/K389G/P390*, S263T/P390*, и A304R/S340T/K379D/A380E/A382G, где
 положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 284.

[0015] В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированная полипептидная последовательность лейциндекарбоксилазы имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 484, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 3/194/304, 3/259/263/304, 3/259/304, 3/259/304/324/339, 3/259/304/324/382, 3/259/304/382, 3/263/304/324, 3/263/304/324/339, 3/263/304/324/382, 3/304, 3/304/324, 16, 63, 77, 80, 87/270, 87/270/365, 87/328/365, 91, 92, 126, 140, 156, 168/270/328/338, 181, 194, 201, 256, 259, 259/263, 259/263/304, 259/263/304/324, 259/263/304/324/382, 259/263/304/379, 259/263/304/382, 259/304, 259/304/324, 259/304/324/339, 259/304/324/339/382, 259/304/382, 262, 263/304, 263/304/324, 263/304/324/339, 263/304/324/382, 263/324, 270, 270/319, 270/328/338, 270/328/338/365, 304, 304/324, 324, 328, 352, 365, 366, и 382, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 484. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 3M/194L/304R, 3M/259K/263T/304R, 3M/259K/304R, 3M/259K/304R/324S/339A, 3M/259K/304R/324S/382S, 3M/259K/304R/382S, 3M/263T/304R/324S, 3M/263T/304R/324S/339A, 3M/263T/304R/324S/382S, 3M/304R, 3M/304R/324S, 16Q, 16V, 63C, 77L, 80G, 80K, 87R/270R, 87R/270R/365E, 87R/328N/365E, 91A, 91Q, 92K, 126A, 126T, 140V, 156A, 156S, 168K/270R/328N/338S, 181K, 181R, 181V, 194C, 194L, 201D, 256W, 259K, 259K/263T, 259K/263T/304R, 259K/263T/304R/324S, 259K/263T/304R/324S/382S, 259K/263T/304R/379D, 259K/263T/304R/382S, 259K/304R, 259K/304R/324S, 259K/304R/324S/339A, 259K/304R/324S/339A/382S, 259K/304R/382S,

262D, 262G, 262H, 262I, 262S, 262T, 263T/304R, 263T/304R/324S, 263T/304R/324S/339A, 263T/304R/324S/382S, 263T/324S, 270R, 270R/319A, 270R/328N/338S, 270R/328N/338S/365E, 304R, 304R/324S, 324S, 328N, 352A, 365E, 366A, 366L, 366M, 366Q, 366T, 366V, и 382S, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 484. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из N3M/F194L/A304R, N3M/R259K/S263T/A304R, N3M/R259K/A304R, N3M/R259K/A304R/M324S/Q339A, N3M/R259K/A304R/M324S/A382S, N3M/R259K/A304R/A382S, N3M/S263T/A304R/M324S, N3M/S263T/A304R/M324S/Q339A, N3M/S263T/A304R/M324S/A382S, N3M/A304R, N3M/A304R/M324S, R16Q, R16V, A63C, E77L, A80G, A80K, H87R/L270R, H87R/L270R/Q365E, H87R/C328N/Q365E, E91A, E91Q, E92K, D126A, D126T, M140V, G156A, G156S, C168K/L270R/C328N/P338S, T181K, T181R, T181V, F194C, F194L, E201D, Y256W, R259K, R259K/S263T, R259K/S263T/A304R, R259K/S263T/A304R/M324S, R259K/S263T/A304R/M324S/A382S, R259K/S263T/A304R/K379D, R259K/S263T/A304R/A382S, R259K/A304R, R259K/A304R/M324S, R259K/A304R/M324S/Q339A, R259K/A304R/M324S/Q339A/A382S, R259K/A304R/A382S, R262D, R262G, R262H, R262I, R262S, R262T, S263T/A304R, S263T/A304R/M324S, S263T/A304R/M324S/Q339A, S263T/A304R/M324S/A382S, S263T/M324S, L270R, L270R/I319A, L270R/C328N/P338S, L270R/C328N/P338S/Q365E, A304R, A304R/M324S, M324S, C328N, D352A, Q365E, H366A, H366L, H366M, H366Q, H366T, H366V, и A382S, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 484.

[0016] В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированная полипептидная последовательность лейциндекарбоксилазы имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 594, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 16/63/80/126/168/366, 16/63/80/126/181/194/259/324/328/366, 16/63/126/168/270/328/366, 16/80/126/324/366, 16/80/126/366, 16/80/168, 16/80/168/270/366, 16/80/168/324, 16/80/168/366, 16/80/324, 16/91/126/168/324/366, 16/126/168/366, 16/168/259/366, 16/168/270/324/366, 16/168/324/328/366, 16/168/324/366, 16/168/366, 16/259/263/328, 16/324/328/366, 16/328/366, 80/126/168/270/366, 80/126/168/366, 80/126/181/270/324/366, 80/168/270/366, и 168/366, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 594. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 16Q/63C/80K/126T/168K/366M, 16Q/63C/80K/126T/181R/194C/259K/324S/328N/366M,

16Q/63C/126T/168K/270R/328N/366M, 16Q/80K/126T/324S/366M, 16Q/80K/126T/366M, 16Q/80K/168K, 16Q/80K/168K/270R/366M, 16Q/80K/168K/324S, 16Q/80K/168K/366M, 16Q/80K/324S, 16Q/91A/126T/168K/324S/366M, 16Q/126T/168K/366M, 16Q/168K/259K/366M, 16Q/168K/270R/324S/366M, 16Q/168K/324S/328N/366M, 16Q/168K/324S/366M, 16Q/168K/366M, 16Q/259K/263T/328N, 16Q/324S/328N/366M, 16Q/328N/366M, 80K/126T/168K/270R/366M, 80K/126T/168K/366M, 80K/126T/181R/270R/324S/366M, 80K/168K/270R/366M, и 168K/366M, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 594. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из R16Q/A63C/A80K/D126T/C168K/H366M, R16Q/A63C/A80K/D126T/T181R/F194C/R259K/M324S/C328N/H366M, R16Q/A63C/D126T/C168K/L270R/C328N/H366M, R16Q/A80K/D126T/M324S/H366M, R16Q/A80K/D126T/H366M, R16Q/A80K/C168K, R16Q/A80K/C168K/L270R/H366M, R16Q/A80K/C168K/M324S, R16Q/A80K/C168K/H366M, R16Q/A80K/M324S, R16Q/E91A/D126T/C168K/M324S/H366M, R16Q/D126T/C168K/H366M, R16Q/C168K/R259K/H366M, R16Q/C168K/L270R/M324S/H366M, R16Q/C168K/M324S/C328N/H366M, R16Q/C168K/M324S/H366M, R16Q/C168K/H366M, R16Q/R259K/S263T/C328N, R16Q/M324S/C328N/H366M, R16Q/C328N/H366M, A80K/D126T/C168K/L270R/H366M, A80K/D126T/C168K/H366M, A80K/D126T/T181R/L270R/M324S/H366M, A80K/C168K/L270R/H366M, и C168K/H366M, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 594.

[0017] В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированная полипептидная последовательность лейциндекарбоксилазы имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 686, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 66/76/118/141/201/300, 66/76/198/200/296/303, 66/76/198/200/300, 66/118/200/296/303/317, 66/118/296, 66/118/296/300, 66/200, 76/118/141/200/296, 76/141/198/200/201/300, 80/201/270, 80/270, 80/270/324, 89/118/200, 106/270/324/352, 118/141/200, 126, 126/201/270/324, 126/270, 141/144/198/200/300, 156/270, 156/270/324, 201/270, 201/270/352, 270, и 270/324, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 686. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 66N/76V/118D/141P/201R/300K, 66N/76V/198G/200S/296E/303Q, 66N/76V/198G/200S/300K, 66N/118D/200S/296E/303Q/317Q, 66N/118D/296E,

66N/118D/296E/300K, 66N/200S, 76V/118D/141P/200S/296E, 76V/141P/198G/200S/201R/300K, 80K/201D/270R, 80K/270R, 80K/270R/324S, 89P/118D/200S, 106M/270R/324S/352A, 118D/141P/200S, 126T, 126T/201D/270R/324S, 126T/270R, 141P/144V/198G/200S/300K, 156A/270R, 156A/270R/324S, 201D/270R, 201D/270R/352A, 270R, и 270R/324S, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 686. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из S66N/R76V/T118D/R141P/E201R/R300K, S66N/R76V/A198G/H200S/D296E/A303Q, S66N/R76V/A198G/H200S/R300K, S66N/T118D/H200S/D296E/A303Q/K317Q, S66N/T118D/D296E, S66N/T118D/D296E/R300K, S66N/H200S, R76V/T118D/R141P/H200S/D296E, R76V/R141P/A198G/H200S/E201R/R300K, A80K/E201D/L270R, A80K/L270R, A80K/L270R/M324S, A89P/T118D/H200S, L106M/L270R/M324S/D352A, T118D/R141P/H200S, D126T, D126T/E201D/L270R/M324S, D126T/L270R, R141P/M144V/A198G/H200S/R300K, G156A/L270R, G156A/L270R/M324S, E201D/L270R, E201D/L270R/D352A, L270R, и L270R/M324S, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 686.

[0018] В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированная полипептидная последовательность лейциндекарбоксилазы имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 686, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 19, 109, 123, 134, 170, 173, 187, 211 и 312, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 686. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 19I, 109G, 123F, 123M, 123V, 134A, 134S, 170A, 173A, 173I, 173T, 187L, 211S, и 312A, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 686. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из L19I, L109G, Y123F, Y123M, Y123V, N134A, N134S, P170A, F173A, F173I, F173T, V187L, A211S, и T312A, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 686.

[0019] В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях

аминокислот, выбранных из 5, 14, 14/34/38/39/102/267/275/350/357, 14/39/102/127/245/267/275/349/350, 34/38/39/102/127/275/357, 34/38/39/102/275/357, 34/38/39/127/245/349/350/357, 34/38/39/127/245/350/357, 34/39/102/127/264/275/357, 34/39/102/127/275/349/357, 34/39/102/264/275/350/357, 34/39/275/349/350/357, 38/39/102/127/264/267/350/357, 38/39/102/127/267/275/349/350/357, 38/39/102/127/349/350/357, 38/39/102/127/350, 38/39/102/127/350/357, 38/39/127/245/267/357, 38/39/127/264/275, 38/39/127/264/350/357, 38/39/127/350/357, 38/39/127/357, 38/39/245/275/357, 38/39/264/267/275/350, 38/39/264/275/357, 38/39/275, 38/39/275/350, 39, 39/102/127/264/275/357, 39/102/264/275/357, 39/102/267/275/357, 39/127/245/264/267/275/350, 39/127/245/264/275/350/357, 39/127/245/357, 39/127/267/275/350/357, 39/127/267/350/357, 39/127/357, 39/245/264/267/275/357, 39/264/267/275/350, 39/275/350/357, 48, 139, 164, 196, 255, 299, 318, 324, 339, 343, 350, 353, 357, 364, 365, 379, 381, 386, 389, 391, 393, 394, 395, 397, 398, и 405, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 12. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 5M, 14I, 14T/34L/38V/39N/102S/267I/275S/350E/357V, 14T/39N/102S/127S/245M/267I/275S/349T/350E, 34L/38V/39N/102S/127S/275S/357V, 34L/38V/39N/102S/275S/357V, 34L/38V/39N/127S/245M/349T/350E/357V, 34L/38V/39N/127S/245M/350E/357V, 34L/39N/102S/127S/264V/275S/357V, 34L/39N/102S/127S/275S/349T/357V, 34L/39N/102S/264V/275S/350E/357V, 34L/39N/275S/349T/350E/357V, 38V/39N/102S/127S/264V/267I/350E/357V, 38V/39N/102S/127S/267I/275S/349T/350E/357V, 38V/39N/102S/127S/349T/350E/357V, 38V/39N/102S/127S/350E, 38V/39N/102S/127S/350E/357V, 38V/39N/127S/245M/267I/357V, 38V/39N/127S/264V/275S, 38V/39N/127S/264V/350E/357V, 38V/39N/127S/350E/357V, 38V/39N/127S/357V, 38V/39N/245M/275S/357V, 38V/39N/264V/267I/275S/350E, 38V/39N/264V/275S/357V, 38V/39N/275S, 38V/39N/275S/350E, 39N/102S/127S/264V/275S/357V, 39N/102S/264V/275S/357V, 39N/102S/267I/275S/357V, 39N/127S/245M/264V/267I/275S/350E, 39N/127S/245M/264V/275S/350E/357V, 39N/127S/245M/357V, 39N/127S/267I/275S/350E/357V, 39N/127S/267I/350E/357V, 39N/127S/357V, 39N/245M/264V/267I/275S/357V, 39N/264V/267I/275S/350E, 39N/275S/350E/357V, 39S, 48F, 139G, 164A, 164C, 196D, 196R, 255G, 255N, 255P, 299A, 299V, 318K, 324M, 324S, 324T, 339A, 339D, 343A, 343E, 350S, 353D, 353E, 353L, 353N, 353S, 353W, 357C, 357M, 364K, 364R, 365E, 379D, 379P, 381D, 381E, 386*, 389E, 389G, 389P, 389Q, 391*, 391E, 393T, 394E, 395A, 395D, 395G, 395K, 395S, 397A, 398*, 405D, 405E, 405H, и 405L, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 12. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях

аминокислот, выбранных из K5M, H14I, H14T/I34L/C38V/T39N/T102S/V267I/T275S/N350E/I357V, H14T/T39N/T102S/T127S/I245M/V267I/T275S/V349T/N350E, I34L/C38V/T39N/T102S/T127S/T275S/I357V, I34L/C38V/T39N/T102S/T275S/I357V, I34L/C38V/T39N/T127S/I245M/V349T/N350E/I357V, I34L/C38V/T39N/T127S/I245M/N350E/I357V, I34L/T39N/T102S/T127S/I264V/T275S/I357V, I34L/T39N/T102S/T127S/T275S/V349T/I357V, I34L/T39N/T102S/I264V/T275S/N350E/I357V, I34L/T39N/T275S/V349T/N350E/I357V, C38V/T39N/T102S/T127S/I264V/V267I/N350E/I357V, C38V/T39N/T102S/T127S/V267I/T275S/V349T/N350E/I357V, C38V/T39N/T102S/T127S/V349T/N350E/I357V, C38V/T39N/T102S/T127S/N350E/I357V, C38V/T39N/T127S/I245M/V267I/I357V, C38V/T39N/T127S/I264V/T275S, C38V/T39N/T127S/I264V/N350E/I357V, C38V/T39N/T127S/N350E/I357V, C38V/T39N/T127S/I357V, C38V/T39N/I245M/T275S/I357V, C38V/T39N/I264V/V267I/T275S/N350E, C38V/T39N/I264V/T275S/I357V, C38V/T39N/T275S, C38V/T39N/T275S/N350E, T39N/T102S/T127S/I264V/T275S/I357V, T39N/T102S/I264V/T275S/I357V, T39N/T102S/V267I/T275S/I357V, T39N/T127S/I245M/I264V/V267I/T275S/N350E, T39N/T127S/I245M/I264V/T275S/N350E/I357V, T39N/T127S/I245M/I357V, T39N/T127S/V267I/T275S/N350E/I357V, T39N/T127S/V267I/N350E/I357V, T39N/T127S/I357V, T39N/I245M/I264V/V267I/T275S/I357V, T39N/I264V/V267I/T275S/N350E, T39N/T275S/N350E/I357V, T39S, L48F, N139G, I164A, I164C, K196D, K196R, H255G, H255N, H255P, K299A, K299V, R318K, R324M, R324S, R324T, Q339A, Q339D, H343A, H343E, N350S, R353D, R353E, R353L, R353N, R353S, R353W, I357C, I357M, L364K, L364R, Q365E, K379D, K379P, A381D, A381E, D386*, K389E, K389G, K389P, K389Q, A391*, A391E, K393T, K394E, R395A, R395D, R395G, R395K, R395S, T397A, P398*, T405D, T405E, T405H, и T405L, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 12.

[0020] В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 48/64/164/324/343/353/357/364, 48/64/164/324/343/364, 48/64/164/353/357/364, 48/64/357/364, 64/164/324/343/353/357/364, 64/164/324/343/357/364, 64/164/353/357, 64/318/324/357/364, 64/324/353/357/364, 132/255/339/379/395, 164/196/324/357/364, 164/318/324/343/353/357, 164/318/324/357/364, 164/324/343/353/357/364, 164/324/357/364, 164/353/357/364, 164/364, 196/318/324/353/357/364, 318/343/357, 324/343/357/364, 324/353/357/364, 324/357/364, 339/379/389/394/395, 339/389/395, 339/391, 339/394/395/405, 357/364, 379/386, 379/394/395/397/404/405, 379/394/395/397/405, 389/394/395/397/405, и 394/397, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 38. В некоторых

дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот из 48F/64E/164A/324M/343E/353E/357C/364K, 48F/64E/164A/324M/343E/364R, 48F/64E/164C/353N/357V/364R, 48F/64E/357M/364K, 64E/164A/324M/343E/353D/357V/364K, 64E/164A/324M/343E/357C/364R, 64E/164C/353D/357V, 64E/318K/324S/357V/364R, 64E/324M/353N/357C/364R, 132F/255P/339A/379D/395D, 164A/196D/324M/357C/364K, 164A/318K/324M/343E/353E/357C, 164A/324M/343E/353D/357C/364R, 164A/324M/357C/364K, 164A/353W/357C/364R, 164A/364R, 164C/318K/324S/357V/364R, 164C/324M/343E/353D/357V/364R, 164C/353D/357V/364K, 164C/353D/357V/364R, 164C/353W/357C/364R, 196D/318K/324M/353N/357C/364K, 318K/343E/357C, 318K/343E/357M, 324M/343E/357V/364K, 324M/357M/364R, 324N/353W/357C/364K, 339A/379D/389G/394E/395D, 339A/389G/395K, 339A/391*, 339A/394E/395K/405D, 357V/364R, 379D/386*, 379D/394E/395D/397A/404I/405H, 379D/394E/395K/397A/405D, 389G/394E/395D/397A/405D, и 394E/397A, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 38. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот из L48F/A64E/I164A/R324M/H343E/R353E/I357C/L364K, L48F/A64E/I164A/R324M/H343E/L364R, L48F/A64E/I164C/R353N/I357V/L364R, L48F/A64E/I357M/L364K, A64E/I164A/R324M/H343E/R353D/I357V/L364K, A64E/I164A/R324M/H343E/I357C/L364R, A64E/I164C/R353D/I357V, A64E/R318K/R324S/I357V/L364R, A64E/R324M/R353N/I357C/L364R, Y132F/H255P/Q339A/K379D/R395D, I164A/K196D/R324M/I357C/L364K, I164A/R318K/R324M/H343E/R353E/I357C, I164A/R324M/H343E/R353D/I357C/L364R, I164A/R324M/I357C/L364K, I164A/R353W/I357C/L364R, I164A/L364R, I164C/R318K/R324S/I357V/L364R, I164C/R324M/H343E/R353D/I357V/L364R, I164C/R353D/I357V/L364K, I164C/R353D/I357V/L364R, I164C/R353W/I357C/L364R, K196D/R318K/R324M/R353N/I357C/L364K, R318K/H343E/I357C, R318K/H343E/I357M, R324M/H343E/I357V/L364K, R324M/I357M/L364R, R324N/R353W/I357C/L364K, Q339A/K379D/K389G/K394E/R395D, Q339A/K389G/R395K, Q339A/A391*, Q339A/K394E/R395K/T405D, I357V/L364R, K379D/D386*, K379D/K394E/R395D/T397A/R404I/T405H, K379D/K394E/R395K/T397A/T405D, K389G/K394E/R395D/T397A/T405D, и K394E/T397A, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 38.

[0021] В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях

аминокислот, выбранных из 2, 3, 33, 48/64/255, 48/255/339, 48/255/379, 64, 64/255, 69, 161, 193, 255, 255/318/379, 259, 263, 318/339/379, 324, 324/389/394, 324/389/394/395, 324/389/394/397, 324/394, 324/394/395, 324/394/395/397, 324/395, 339, 340, 380, 382, 389, 389/394, 389/394/395, 389/394/395/397, 389/394/397, 389/395, 389/397, 390, 394, 394/395, 394/395/397, 395, 395/397, 397, 401, и 405, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 234. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 2E, 3M, 33L, 48F/64E/255P, 48F/255P/339A, 48F/255P/379D, 64E, 64E/255P, 64S, 69I, 161V, 193I, 255P, 255P/318K/379D, 259L, 263T, 263V, 318K/339A/379D, 324N, 324N/394E/395K/397A, 324N/395D, 324S/389G/394E, 324S/389G/394E/395D, 324S/389G/394E/397A, 324S/394E, 324S/394E/395K, 324S/394E/395K/397A, 324S/395K, 339A, 340T, 340V, 380E, 382S, 389G, 389G/394E, 389G/394E/395D, 389G/394E/395D/397A, 389G/394E/395K, 389G/394E/395K/397A, 389G/394E/397A, 389G/395D, 389G/395K, 389G/397A, 390*, 390A, 390E, 390S, 394E, 394E/395D, 394E/395K/397A, 395D/397A, 395K, 397A, 401*, 401Y, и 405H, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 234. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из G2E, N3M, F33L, L48F/A64E/H255P, L48F/H255P/Q339A, L48F/H255P/K379D, A64E, A64E/H255P, A64S, V69I, T161V, M193I, H255P, H255P/R318K/K379D, R259L, S263T, S263V, R318K/Q339A/K379D, M324N, M324N/K394E/R395K/T397A, M324N/R395D, M324S/K389G/K394E, M324S/K389G/K394E/R395D, M324S/K389G/K394E/T397A, M324S/K394E, M324S/K394E/R395K, M324S/K394E/R395K/T397A, M324S/R395K, Q339A, S340T, S340V, A380E, A382S, K389G, K389G/K394E, K389G/K394E/R395D, K389G/K394E/R395D/T397A, K389G/K394E/R395K, K389G/K394E/R395K/T397A, K389G/K394E/T397A, K389G/R395D, K389G/R395K, K389G/T397A, P390*, P390A, P390E, P390S, K394E, K394E/R395D, K394E/R395K/T397A, R395D/T397A, R395K, T397A, A401*, A401Y, и T405H, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 234.

[0022] В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 2/64/69/324/380/382/388/389, 3/64/69/263/339/380/388, 3/64/69/389, 3/64/69/390, 3/64/379/380/390, 3/69/263/380, 3/69/324, 3/69/324/380/382/389/390, 12/135/259/263, 12/135/263/382, 12/259/263/304, 48/64/255, 64/69, 64/69/189/259/263/304, 64/69/189/259/263/304/339/340/379, 64/69/223/388, 64/69/223/388/389/390, 64/69/304/379/382, 64/69/324, 64/69/324/339/380/389/390, 64/69/339, 64/69/339/382/388/389, 64/69/339/389/390, 64/69/379/380, 64/69/380/388/390, 64/69/389,

64/69/390, 64/255/263, 64/263, 64/324/339/389/390, 69/223/263/324/382/388/390, 69/223/324/379/380/382/388/390, 69/263, 69/263/324, 69/263/339, 69/263/388, 69/263/389/390, 69/324/379/380/388, 69/324/380, 69/339/390, 69/382/390, 259/263/304, 259/263/304/339/340/379, 263/339/389/390, 263/390, и 304/340/379/380/382, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 284. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 2E/64S/69I/324S/380E/382S/388A/389G, 3M/64S/69I/263T/339A/380E/388A, 3M/64S/69I/389G, 3M/64S/69I/390*, 3M/64S/379D/380E/390*, 3M/69I/263T/380E, 3M/69I/324S, 3M/69I/324S/380E/382S/389G/390*, 12G/135V/259K/263T, 12G/135V/263T/382G, 12G/259K/263T/304R, 48L/64A/255H, 64A/255H/263T, 64S/69I, 64S/69I/189A/259Q/263T/304R/339A/340T/379N, 64S/69I/189D/259K/263T/304R, 64S/69I/223M/388A, 64S/69I/223M/388A/389G/390*, 64S/69I/304R/379E/382G, 64S/69I/324S, 64S/69I/324S/339A/380E/389G/390*, 64S/69I/339A, 64S/69I/339A/382S/388A/389G, 64S/69I/339A/389G/390*, 64S/69I/379D/380E, 64S/69I/380E/388A/390*, 64S/69I/389G, 64S/69I/390*, 64S/263T, 64S/324S/339A/389G/390*, 69I/223M/263T/324S/382S/388A/390*, 69I/223M/324S/379D/380E/382S/388A/390*, 69I/263T, 69I/263T/324S, 69I/263T/339A, 69I/263T/388A, 69I/263T/389G/390*, 69I/324S/379D/380E/388A, 69I/324S/380E, 69I/339A/390*, 69I/382S/390*, 259K/263T/304R, 259K/263T/304R/339A/340T/379N, 263T/339A/389G/390*, 263T/390*, и 304R/340T/379D/380E/382G, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 284. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из G2E/E64S/V69I/M324S/A380E/A382S/Q388A/K389G, N3M/E64S/V69I/S263T/Q339A/A380E/Q388A, N3M/E64S/V69I/K389G, N3M/E64S/V69I/P390*, N3M/E64S/K379D/A380E/P390*, N3M/V69I/S263T/A380E, N3M/V69I/M324S, N3M/V69I/M324S/A380E/A382S/K389G/P390*, S12G/L135V/R259K/S263T, S12G/L135V/S263T/A382G, S12G/R259K/S263T/A304R, F48L/E64A/P255H, E64A/P255H/S263T, E64S/V69I, E64S/V69I/T189A/R259Q/S263T/A304R/Q339A/S340T/K379N, E64S/V69I/T189D/R259K/S263T/A304R, E64S/V69I/A223M/Q388A, E64S/V69I/A223M/Q388A/K389G/P390*, E64S/V69I/A304R/K379E/A382G, E64S/V69I/M324S, E64S/V69I/M324S/Q339A/A380E/K389G/P390*, E64S/V69I/Q339A, E64S/V69I/Q339A/A382S/Q388A/K389G, E64S/V69I/Q339A/K389G/P390*, E64S/V69I/K379D/A380E, E64S/V69I/A380E/Q388A/P390*, E64S/V69I/K389G, E64S/V69I/P390*, E64S/S263T, E64S/M324S/Q339A/K389G/P390*, V69I/A223M/S263T/M324S/A382S/Q388A/P390*, V69I/A223M/M324S/K379D/A380E/A382S/Q388A/P390*, V69I/S263T, V69I/S263T/M324S,

V69I/S263T/Q339A, V69I/S263T/Q388A, V69I/S263T/K389G/P390*,
 V69I/M324S/K379D/A380E/Q388A, V69I/M324S/A380E, V69I/Q339A/P390*,
 V69I/A382S/P390*, R259K/S263T/A304R, R259K/S263T/A304R/Q339A/S340T/K379N,
 S263T/Q339A/K389G/P390*, S263T/P390*, и A304R/S340T/K379D/A380E/A382G, где
 положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 284.

[0023] В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 3/194/304, 3/259/263/304, 3/259/304, 3/259/304/324/339, 3/259/304/324/382, 3/259/304/382, 3/263/304/324, 3/263/304/324/339, 3/263/304/324/382, 3/304, 3/304/324, 16, 63, 77, 80, 87/270, 87/270/365, 87/328/365, 91, 92, 126, 140, 156, 168/270/328/338, 181, 194, 201, 256, 259, 259/263, 259/263/304, 259/263/304/324, 259/263/304/324/382, 259/263/304/379, 259/263/304/382, 259/304, 259/304/324, 259/304/324/339, 259/304/324/339/382, 259/304/382, 262, 263/304, 263/304/324, 263/304/324/339, 263/304/324/382, 263/324, 270, 270/319, 270/328/338, 270/328/338/365, 304, 304/324, 324, 328, 352, 365, 366, и 382, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 484. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 3M/194L/304R, 3M/259K/263T/304R, 3M/259K/304R, 3M/259K/304R/324S/339A, 3M/259K/304R/324S/382S, 3M/259K/304R/382S, 3M/263T/304R/324S, 3M/263T/304R/324S/339A, 3M/263T/304R/324S/382S, 3M/304R, 3M/304R/324S, 16Q, 16V, 63C, 77L, 80G, 80K, 87R/270R, 87R/270R/365E, 87R/328N/365E, 91A, 91Q, 92K, 126A, 126T, 140V, 156A, 156S, 168K/270R/328N/338S, 181K, 181R, 181V, 194C, 194L, 201D, 256W, 259K, 259K/263T, 259K/263T/304R, 259K/263T/304R/324S, 259K/263T/304R/324S/382S, 259K/263T/304R/379D, 259K/263T/304R/382S, 259K/304R, 259K/304R/324S, 259K/304R/324S/339A, 259K/304R/324S/339A/382S, 259K/304R/382S, 262D, 262G, 262H, 262I, 262S, 262T, 263T/304R, 263T/304R/324S, 263T/304R/324S/339A, 263T/304R/324S/382S, 263T/324S, 270R, 270R/319A, 270R/328N/338S, 270R/328N/338S/365E, 304R, 304R/324S, 324S, 328N, 352A, 365E, 366A, 366L, 366M, 366Q, 366T, 366V, и 382S, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 484. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из N3M/F194L/A304R, N3M/R259K/S263T/A304R, N3M/R259K/A304R, N3M/R259K/A304R/M324S/Q339A, N3M/R259K/A304R/M324S/A382S, N3M/R259K/A304R/A382S, N3M/S263T/A304R/M324S, N3M/S263T/A304R/M324S/Q339A, N3M/S263T/A304R/M324S/A382S, N3M/A304R, N3M/A304R/M324S, R16Q, R16V, A63C, E77L, A80G, A80K, H87R/L270R, H87R/L270R/Q365E, H87R/C328N/Q365E, E91A, E91Q, E92K, D126A, D126T, M140V,

G156A, G156S, C168K/L270R/C328N/P338S, T181K, T181R, T181V, F194C, F194L, E201D, Y256W, R259K, R259K/S263T, R259K/S263T/A304R, R259K/S263T/A304R/M324S, R259K/S263T/A304R/M324S/A382S, R259K/S263T/A304R/K379D, R259K/S263T/A304R/A382S, R259K/A304R, R259K/A304R/M324S, R259K/A304R/M324S/Q339A, R259K/A304R/M324S/Q339A/A382S, R259K/A304R/A382S, R262D, R262G, R262H, R262I, R262S, R262T, S263T/A304R, S263T/A304R/M324S, S263T/A304R/M324S/Q339A, S263T/A304R/M324S/A382S, S263T/M324S, L270R, L270R/I319A, L270R/C328N/P338S, L270R/C328N/P338S/Q365E, A304R, A304R/M324S, M324S, C328N, D352A, Q365E, H366A, H366L, H366M, H366Q, H366T, H366V, и A382S, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 484.

[0024] В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 16/63/80/126/168/366, 16/63/80/126/181/194/259/324/328/366, 16/63/126/168/270/328/366, 16/80/126/324/366, 16/80/126/366, 16/80/168, 16/80/168/270/366, 16/80/168/324, 16/80/168/366, 16/80/324, 16/91/126/168/324/366, 16/126/168/366, 16/168/259/366, 16/168/270/324/366, 16/168/324/328/366, 16/168/324/366, 16/168/366, 16/259/263/328, 16/324/328/366, 16/328/366, 80/126/168/270/366, 80/126/168/366, 80/126/181/270/324/366, 80/168/270/366, и 168/366, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 594. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 16Q/63C/80K/126T/168K/366M, 16Q/63C/80K/126T/181R/194C/259K/324S/328N/366M, 16Q/63C/126T/168K/270R/328N/366M, 16Q/80K/126T/324S/366M, 16Q/80K/126T/366M, 16Q/80K/168K, 16Q/80K/168K/270R/366M, 16Q/80K/168K/324S, 16Q/80K/168K/366M, 16Q/80K/324S, 16Q/91A/126T/168K/324S/366M, 16Q/126T/168K/366M, 16Q/168K/259K/366M, 16Q/168K/270R/324S/366M, 16Q/168K/324S/328N/366M, 16Q/168K/324S/366M, 16Q/168K/366M, 16Q/259K/263T/328N, 16Q/324S/328N/366M, 16Q/328N/366M, 80K/126T/168K/270R/366M, 80K/126T/168K/366M, 80K/126T/181R/270R/324S/366M, 80K/168K/270R/366M, и 168K/366M, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 594. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из R16Q/A63C/A80K/D126T/C168K/H366M, R16Q/A63C/A80K/D126T/T181R/F194C/R259K/M324S/C328N/H366M, R16Q/A63C/D126T/C168K/L270R/C328N/H366M, R16Q/A80K/D126T/M324S/H366M, R16Q/A80K/D126T/H366M, R16Q/A80K/C168K, R16Q/A80K/C168K/L270R/H366M, R16Q/A80K/C168K/M324S, R16Q/A80K/C168K/H366M, R16Q/A80K/M324S,

R16Q/E91A/D126T/C168K/M324S/H366M, R16Q/D126T/C168K/H366M,
 R16Q/C168K/R259K/H366M, R16Q/C168K/L270R/M324S/H366M,
 R16Q/C168K/M324S/C328N/H366M, R16Q/C168K/M324S/H366M, R16Q/C168K/H366M,
 R16Q/R259K/S263T/C328N, R16Q/M324S/C328N/H366M, R16Q/C328N/H366M,
 A80K/D126T/C168K/L270R/H366M, A80K/D126T/C168K/H366M,
 A80K/D126T/T181R/L270R/M324S/H366M, A80K/C168K/L270R/H366M, и C168K/H366M,
 где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 594.

[0025] В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 66/76/118/141/201/300, 66/76/198/200/296/303, 66/76/198/200/300, 66/118/200/296/303/317, 66/118/296, 66/118/296/300, 66/200, 76/118/141/200/296, 76/141/198/200/201/300, 80/201/270, 80/270, 80/270/324, 89/118/200, 106/270/324/352, 118/141/200, 126, 126/201/270/324, 126/270, 141/144/198/200/300, 156/270, 156/270/324, 201/270, 201/270/352, 270, и 270/324, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 686. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 66N/76V/118D/141P/201R/300K, 66N/76V/198G/200S/296E/303Q, 66N/76V/198G/200S/300K, 66N/118D/200S/296E/303Q/317Q, 66N/118D/296E, 66N/118D/296E/300K, 66N/200S, 76V/118D/141P/200S/296E, 76V/141P/198G/200S/201R/300K, 80K/201D/270R, 80K/270R, 80K/270R/324S, 89P/118D/200S, 106M/270R/324S/352A, 118D/141P/200S, 126T, 126T/201D/270R/324S, 126T/270R, 141P/144V/198G/200S/300K, 156A/270R, 156A/270R/324S, 201D/270R, 201D/270R/352A, 270R, и 270R/324S, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 686. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из S66N/R76V/T118D/R141P/E201R/R300K, S66N/R76V/A198G/H200S/D296E/A303Q, S66N/R76V/A198G/H200S/R300K, S66N/T118D/H200S/D296E/A303Q/K317Q, S66N/T118D/D296E, S66N/T118D/D296E/R300K, S66N/H200S, R76V/T118D/R141P/H200S/D296E, R76V/R141P/A198G/H200S/E201R/R300K, A80K/E201D/L270R, A80K/L270R, A80K/L270R/M324S, A89P/T118D/H200S, L106M/L270R/M324S/D352A, T118D/R141P/H200S, D126T, D126T/E201D/L270R/M324S, D126T/L270R, R141P/M144V/A198G/H200S/R300K, G156A/L270R, G156A/L270R/M324S, E201D/L270R, E201D/L270R/D352A, L270R, и L270R/M324S, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 686.

[0026] В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная

последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 19, 109, 123, 134, 170, 173, 187, 211 и 312, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 686. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 19I, 109G, 123F, 123M, 123V, 134A, 134S, 170A, 173A, 173I, 173T, 187L, 211S, и 312A, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 686. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из L19I, L109G, Y123F, Y123M, Y123V, N134A, N134S, P170A, F173A, F173I, F173T, V187L, A211S, и T312A, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 686.

[0027] В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 19/109/123/141/170/198/200/211/270/312, 19/109/123/141/170/198/211, 19/109/123/141/170/198/211/270/312, 19/109/123/170/211/270/312, 19/109/123/198/200/211/270/312, 19/109/170/173/211/270/312, 19/109/211/270/312, 109/170/211/270/312, и 109/211/270/312, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 688. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 19I/109G/123F/170A/211S/270R/312A, 19I/109G/123F/198G/200S/211S/270R/312A, 19I/109G/123V/141P/170A/198G/200S/211S/270R/312A, 19I/109G/123V/141P/170A/198G/211S, 19I/109G/123V/141P/170A/198G/211S/270R/312A, 19I/109G/170A/173I/211S/270R/312A, 19I/109G/211S/270R/312A, 109G/170A/211S/270R/312A, и 109G/211S/270R/312A, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 688. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из L19I/L109G/Y123F/P170A/A211S/L270R/T312A, L19I/L109G/Y123F/A198G/H200S/A211S/L270R/T312A, L19I/L109G/Y123V/R141P/P170A/A198G/H200S/A211S/L270R/T312A, L19I/L109G/Y123V/R141P/P170A/A198G/A211S, L19I/L109G/Y123V/R141P/P170A/A198G/A211S/L270R/T312A,

L19I/L109G/P170A/F173I/A211S/L270R/T312A, L19I/L109G/A211S/L270R/T312A, L109G/P170A/A211S/L270R/T312A, и L109G/A211S/L270R/T312A, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 688.

[0028] В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 5/41, 5/41/228, 33, 41, 47, 51, 55, 64, 126, 265, 267, 270, 331, 353, 357, и 384, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 766. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 5V/41D, 5V/41D/228D, 33L, 41D, 47F, 51E, 51Q, 55I, 64N, 126A, 126T, 265P, 267L, 270A, 270T, 331V, 353E, 353I, 353L, 357S, и 384W, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 766. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из K5V/H41D, K5V/H41D/T228D, F33L, H41D, L47F, L51E, L51Q, V55I, S64N, D126A, D126T, E265P, I267L, R270A, R270T, T331V, D353E, D353I, D353L, C357S, и P384W, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 766.

[0029] В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 66, 66/118, 66/118/296, 66/118/296/300, 66/118/300, 66/296, 66/296/300, 66/300, 118, 118/296, 118/296/300, 118/300, 296, 296/300, и 300, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 766. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из 66S, 66S/118T, 66S/118T/296D, 66S/118T/296D/300R, 66S/118T/300R, 66S/296D, 66S/296D/300R, 66S/300R, 118T, 118T/296D, 118T/296D/300R, 118T/300R, 296D, 296D/300R, и 300R, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 766. В некоторых дополнительных вариантах осуществления полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из N66S, N66S/D118T, N66S/D118T/E296D, N66S/D118T/E296D/K300R, N66S/D118T/K300R, N66S/E296D, N66S/E296D/K300R, N66S/K300R, D118T, D118T/E296D, D118T/E296D/K300R, D118T/K300R, E296D, E296D/K300R, и K300R, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 766.

[0030] В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688, и/или 766, или с их функциональным фрагментом. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766, или ее функциональный фрагмент. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766, или ее функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы представляет собой вариант полипептида лейциндекарбоксилазы, представленный в любой из Таблиц 1-2, 2-1, 3-2, 4-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 8-2, 10-1, 11-1 и/или 11-2. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы представляет собой вариант фермента бактерий вида *Planctomycetaceae*. В некоторых вариантах осуществления лейциндекарбоксилаза проявляет по меньшей мере одно улучшенное свойство по сравнению с лейциндекарбоксилазой дикого типа бактерий вида *Planctomycetaceae*. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы проявляет большую активность в отношении лейцина, чем лейциндекарбоксилаза дикого типа вида *Planctomycetaceae*. Еще в некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы является более термостабильным, чем лейциндекарбоксилаза дикого типа бактерий вида *Planctomycetaceae*. Еще в некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы более устойчив к протеолизу, чем лейциндекарбоксилаза дикого типа бактерий вида *Planctomycetaceae*. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы является менее иммуногенным, чем лейциндекарбоксилаза дикого типа бактерий вида *Planctomycetaceae*. Еще в некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы более стабилен в сыворотке, чем лейциндекарбоксилаза дикого типа бактерий вида *Planctomycetaceae*. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы содержит последовательность по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную любой из четных последовательностей SEQ ID NO: 16-852. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы содержит последовательность по меньшей мере на 90% или более идентичную любой из четных последовательностей SEQ

ID NO: 16-852. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы содержит любую из четных последовательностей SEQ ID NO: 16-852. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы подвергают очистке. Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы, предложенный в настоящем описании. Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы, предложенный в настоящем описании.

[0031] Настоящее изобретение также относится к сконструированным полинуклеотидным последовательностям, кодирующим по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы, предложенный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления сконструированная полинуклеотидная последовательность кодирует сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы, предложенный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления сконструированная полинуклеотидная последовательность содержит последовательность по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную любой из нечетных последовательностей SEQ ID NO: 15-851. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированная полинуклеотидная последовательность содержит последовательность, по меньшей мере на 90% или более идентичную любой из нечетных последовательностей SEQ ID NO: 15-851. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированная полинуклеотидная последовательность содержит любую из нечетных последовательностей SEQ ID NO: 15-851. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированная полинуклеотидная последовательность функционально связана с контрольной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления сконструированная полинуклеотидная последовательность оптимизирована по кодонам.

[0032] Настоящее изобретение также относится к экспрессирующим векторам, содержащим по меньшей мере одну сконструированную полинуклеотидную последовательность, предложенную в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие векторы дополнительно содержат по меньшей мере одну контрольную последовательность. В некоторых вариантах осуществления контрольная последовательность содержит промотор. В некоторых дополнительных вариантах осуществления промотор представляет собой гетерологичный промотор.

[0033] Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, трансформированным по меньшей мере одной полинуклеотидной последовательностью и/или содержащим экспрессирующий вектор, предложенный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева трансформируют по меньшей мере одной полинуклеотидной последовательностью, представленной в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева трансформируют полинуклеотидной последовательностью, предложенной в настоящем описании. В некоторых

дополнительных вариантах осуществления клетка-хозяин содержит по меньшей мере один экспрессирующий вектор, предложенный в настоящем описании. В некоторых дополнительных вариантах осуществления клетки-хозяева содержат экспрессирующий вектор, предложенный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

[0034] Настоящее изобретение также относится к способам получения сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы в клетке-хозяине, включающим культивирование клетки-хозяина, содержащей по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по настоящему изобретению, и/или по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность по настоящему изобретению, и/или по меньшей мере один экспрессирующий вектор, предложенный в настоящем описании, в подходящих условиях культивирования, так что продуцируется по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы. В некоторых вариантах осуществления способы получения сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы в клетке-хозяине включают культивирование клетки-хозяина, содержащей по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по настоящему изобретению, в подходящих условиях культивирования, так что продуцируется по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы. В некоторых дополнительных вариантах осуществления способы получения сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы в клетке-хозяине включают культивирование клетки-хозяина, содержащей по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, предложенную в настоящем описании, в подходящих условиях культивирования, так что продуцируется по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы. В некоторых вариантах осуществления способы получения сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы в клетке-хозяине включают культивирование клетки-хозяина, содержащей по меньшей мере один экспрессирующий вектор, предложенный в настоящем описании, в подходящих условиях культивирования, так что продуцируется по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают выделение по меньшей мере одного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы из культуры и/или клеток-хозяев. В некоторых дополнительных вариантах осуществления способы дополнительно включают стадию очистки указанного по меньшей мере одного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы.

[0035] Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим по меньшей мере один сконструированный полинуклеотид, предложенный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат по меньшей мере один сконструированный полинуклеотид лейциндекарбоксилазы, предложенный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат по

меньшей мере один сконструированный полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы, предложенный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и/или носитель. В некоторых вариантах осуществления композиция пригодна для лечения болезни кленового сиропа. В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция пригодна для применения в генной терапии. Еще в некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция пригодна для применения в генной терапии для лечения болезни кленового сиропа, и/или повышенных уровней изолейцина, лейцина, аллоизолейцина и/или валина в крови. В некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция пригодна для применения в мРНК-терапии. Еще в некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция пригодна для перорального введения человеку. В некоторых вариантах осуществления композиция находится в форме пилюли, таблетки, капсулы, желатиновой капсулы, жидкости или эмульсии. В некоторых дополнительных вариантах осуществления пилюля, таблетка, капсула или желатиновая капсула дополнительно содержат энтеросолюбильное покрытие. Еще в некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция пригодна для парентеральной инъекции животному. Еще в некоторых дополнительных вариантах осуществления композиция пригодна для парентеральной инъекции человеку. В некоторых вариантах осуществления инъекции вводят ежедневно, еженедельно или ежемесячно. В некоторых дополнительных вариантах осуществления композицию вводят совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтически эффективным соединением. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере одно дополнительное терапевтически эффективное соединение.

[0036] Настоящее изобретение также относится к способам лечения и/или предотвращения симптомов болезни кленового сиропа, у пациента, включающим наличие пациента, страдающего болезнью кленового сиропа, и предоставление композиции, предложенной в настоящем описании, указанному пациенту. В некоторых вариантах осуществления симптомы болезни кленового сиропа, улучшаются. В некоторых дополнительных вариантах осуществления пациент может соблюдать диету, которая менее ограничена по содержанию изолейцина, лейцина и/или валина, чем диета, необходимая пациентам, которые не получали по меньшей мере одну композицию, содержащую по меньшей мере один сконструированный полипептид и/или полинуклеотид лейциндекарбоксилазы по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления пациент может придерживаться диеты, которая менее ограничена по содержанию изолейцина, лейцина и/или валина, чем диета, необходимая пациентам, которые не получали по меньшей мере одну композицию, содержащую по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы,

предложенный в настоящем описании.

[0037] В некоторых вариантах осуществления пациентом является младенец, ребенок, подросток или взрослый. В некоторых вариантах осуществления пациентом является младенец. В некоторых вариантах осуществления пациентом является ребенок.

[0038] В некоторых вариантах осуществления пациентом является подросток. В некоторых вариантах осуществления пациентом является взрослый. Настоящее изобретение также относится к применению композиций предложенных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы и/или полинуклеотид предложенный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы, предложенный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы, предложенный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат по меньшей мере один сконструированный полинуклеотид лейциндекарбоксилазы, предложенный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат сконструированный полинуклеотид лейциндекарбоксилазы, предложенный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы, предложенный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат по меньшей мере два полинуклеотида, кодирующих по меньшей мере два сконструированных полипептида лейциндекарбоксилазы, предложенных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере одну сконструированную лейциндекарбоксилазу, предложенную в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере две сконструированные лейциндекарбоксилазы, предложенные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы, предложенный в настоящем описании.

Описание изобретения

[0039] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам лейциндекарбоксилазы (LDC) и их композициям, а также к полинуклеотидам, кодирующим сконструированные полипептиды лейциндекарбоксилазы (LDC). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC оптимизированы для обеспечения повышенной каталитической активности, а также пониженной чувствительности к протеолизу и/или повышенной устойчивости к средам с низким pH. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC оптимизированы для обеспечения улучшенной стабильности при хранении. Настоящее

изобретение также относится к способам применения композиций, содержащих сконструированные полипептиды LDC, в терапевтических и промышленных целях. Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам LDC, их мутантам, биологически активным фрагментам и аналогам, а также фармацевтическим и промышленным композициям, их содержащим.

Сокращения и определения:

[0040] Если не указано иное, все используемые в настоящем описании технические и научные термины обычно имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится настоящее изобретение. Как правило, используемая в настоящем описании номенклатура и описанные ниже лабораторные процедуры клеточных культур, молекулярной генетики, микробиологии, органической химии, аналитической химии и химии нуклеиновых кислот хорошо известны и обычно используются в данной области. Такие методики хорошо известны и описаны в многочисленных текстах и справочных работах, хорошо известных специалистам в данной области. Стандартные методики или их модификации используются для химического синтеза и химического анализа. Все патенты, патентные заявки, статьи и публикации, упомянутые в настоящем описании, как выше, так и ниже, настоящим прямо включены в настоящее описание посредством ссылки.

[0041] Хотя любые подходящие способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем описании, находят применение в практике настоящего изобретения, в настоящем описании описаны некоторые способы и материалы. Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается описанными конкретными методологиями, протоколами и реагентами, поскольку они могут варьироваться в зависимости от контекста, в котором они используются специалистами в данной области. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно описаны со ссылкой на заявку в целом. Все патенты, патентные заявки, статьи и публикации, упомянутые в настоящем описании, как выше, так и ниже, настоящим прямо включены в настоящее описание посредством ссылки.

[0042] Кроме того, при использовании в настоящем описании, формы в единственном числе включают ссылку на множественное число, если контекст явно не предписывает иное.

[0043] Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Таким образом, каждый числовой диапазон, раскрытый в настоящем описании, предназначен для охвата каждого более узкого числового диапазона, который попадает в такой более широкий числовой диапазон, как если бы все такие более узкие числовые диапазоны были явно указаны в настоящем описании. Также подразумевается, что каждое максимальное (или минимальное) числовое ограничение, раскрытое в настоящем описании, включает каждое более низкое (или более высокое) числовое ограничение, как если бы такое более низкое (или более высокое) числовое ограничение было прямо указано в настоящем описании.

[0044] Термин «примерно» означает допустимую ошибку для конкретного значения. В некоторых случаях «примерно» означает в пределах 0,05%, 0,5%, 1% или 2% заданного диапазона значений. В некоторых случаях «примерно» означает в пределах 1, 2, 3 или 4 стандартных отклонений от заданного значения.

[0045] Кроме того, представленные в настоящем описании заголовки не являются ограничениями различных аспектов или вариантов осуществления изобретения, которые могут иметь место со ссылкой на заявку в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определены применительно к заявке в целом. Тем не менее, чтобы облегчить понимание изобретения, ниже определен ряд терминов.

[0046] Если не указано иное, нуклеиновые кислоты записываются слева направо в ориентации от 5' к 3'; аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от N-конца к C-концу, соответственно.

[0047] Используемый в настоящем описании термин «содержащий» и родственные ему термины используются в их инклюзивном смысле (т. е. эквивалентны термину «включая» и соответствующим родственным ему терминам).

[0048] Номер «ЕС» относится к Номенклатуре ферментов Номенклатурного комитета Международного союза биохимии и молекулярной биологии (NC-IUBMB). Биохимическая классификация IUBMB представляет собой числовую систему классификации ферментов, основанную на катализируемых ими химических реакциях.

[0049] «АТСС» относится к Американской коллекции типовых культур, коллекция биорепоэиториев которой включает гены и штаммы.

[0050] «NCBI» относится к Национальному центру биологической информации и предоставленным в нем базам данных последовательностей.

[0051] Используемый в настоящем описании термин «полипептид лейциндекарбоксилазы (LDC)» относится к члену класса ферментов валиндекарбоксилазы (ЕС 4.1.1.14). Эти ферменты используют пиридоксальный 5'-фосфатный (PLP) кофактор для декарбоксилирования аминокислот, таких как валин и лейцин, что приводит к образованию 2-метилпропанамина и изопентиламина, соответственно, с выделением углекислого газа.

[0052] «Белок», «полипептид» и «пептид» используются в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения полимера по меньшей мере из двух аминокислот, ковалентно связанных амидной связью, независимо от длины или посттрансляционной модификации (например, гликозилирования или фосфорилирования).

[0053] «Полинуклеотид» используется в настоящем описании для обозначения полимера, содержащего по меньшей мере два нуклеотида, где нуклеотиды представляют собой либо дезоксирибонуклеотиды, либо рибонуклеотиды.

[0054] «Аминокислоты» обозначаются в настоящем описании либо их общеизвестными трехбуквенными обозначениями, либо однобуквенными обозначениями, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Нуклеотиды также могут обозначаться их общепринятыми однобуквенными кодами, как указано.

Сокращения, используемые для генетически кодируемых аминокислот, являются общепринятыми и являются следующими: аланин (Ala или A), аргинин (Arg или R), аспарагин (Asn или N), аспартат (Asp или D), цистеин (Cys или C), глутамат (Glu или E), глутамин (Gln или Q), гистидин (His или H), изолейцин (Ile или I), лейцин (Leu или L), лизин (Lys или K), метионин (Met или M), фенилаланин (Phe или F), пролин (Pro или P), серин (Ser или S), треонин (Thr или T), триптофан (Trp или W), тирозин (Tyr или Y) и валин (Val или V).

[0055] Термины «сконструированный», «рекомбинантный», «не встречающийся в природе» и «вариант» при использовании в отношении клетки, полинуклеотида или полипептида относятся к материалу или материалу, соответствующему природной или нативной форме материала, который был модифицирован таким образом, что иначе не существовал бы в природе, или идентичен ему, но произведен или получен из синтетических материалов и/или путем манипуляции с использованием рекомбинантных методов.

[0056] Используемые в настоящем описании термины «дикого типа» и «встречающийся в природе» относятся к форме, встречающейся в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность дикого типа представляет собой последовательность, присутствующую в организме, которая может быть выделена из источника в природе и которая не была преднамеренно модифицирована человеческими манипуляциями.

[0057] «Кодирующая последовательность» относится к той части нуклеиновой кислоты (например, гена), которая кодирует аминокислотную последовательность белка.

[0058] Термин «процент (%) идентичности последовательности» используется в настоящем описании для обозначения сравнения между полинуклеотидами и полипептидами и определяется путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, где часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т. е. пробелы) по сравнению с эталонной последовательностью для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент можно рассчитать, определив количество положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток встречается в обеих последовательностях, чтобы получить количество совпадающих положений, разделив количество совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножение результата на 100, чтобы получить процент идентичности последовательности. В качестве альтернативы, процент может быть рассчитан путем определения количества положений, в которых либо идентичное основание нуклеиновой кислоты, либо аминокислотный остаток встречаются в обеих последовательностях, либо основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток выровнены с пробелом, чтобы получить количество совпадающих положений, разделив количество совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножив результат на 100, чтобы получить процент идентичности

последовательности. Специалисты в данной области понимают, что существует множество установленных алгоритмов, доступных для выравнивания двух последовательностей. Можно провести оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения (например, с помощью алгоритма локальной гомологии Смита и Уотермана; Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 [1981]), с помощью алгоритма гомологического выравнивания Нидлмана и Вунша (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 [1970]), методом поиска сходства Пирсона и Липмана (Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 [1988]), компьютеризированными реализациями этих алгоритмов (например, GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном пакете GCG Wisconsin) или визуальной проверкой, как известно в данной области техники. Примеры алгоритмов, подходящих для определения процентной идентичности последовательностей и сходства последовательностей, включают, но не ограничиваются ими, алгоритмы BLAST и BLAST 2.0 (см., например, Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 [1990]; и Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 3389-3402 [1977]). Программное обеспечение для проведения анализов BLAST находится в открытом доступе на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации. Этот алгоритм включает в себя сначала идентификацию пар последовательностей с высокой оценкой (HSP) путем определения коротких слов длины «W» в последовательности запроса, которые либо соответствуют, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому значению «Т» при сопоставлении со словом той же длины в последовательности базы данных. Т упоминается как порог оценки соседнего слова (см. Altschul et al., см. выше). Эти изначальные совпадения соседних слов выполняют роль затравки для начальных поисков для того чтобы найти более длинные HSP содержащие их. Совпадения слов распространяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности по мере увеличения кумулятивной балльной оценки выравнивания. Совокупные баллы рассчитываются с использованием для нуклеотидных последовательностей параметров «М» (поощрительный балл за пару совпадающих остатков; всегда >0) и «N» (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей, матрица баллов используется для расчета кумулятивной балльной оценки. Расширение совпадений слов в каждом направлении останавливается, когда: кумулятивный показатель выравнивания падает на величину «X» от максимально достигнутого значения; совокупная оценка становится равной нулю или ниже из-за накопления одного или более выравниваний остатков с отрицательной оценкой; или достигнут конец любой последовательности. Параметры алгоритма BLAST W, T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует по умолчанию длину слова (W), равную 11, ожидание (E), равное 10, M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей программа BLASTP использует по умолчанию длину слова (W), равную 3, ожидание (E), равное 10, и оценочную матрицу BLOSUM62 (см., например, Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 [1989]). Для примера

определения выравнивания последовательностей и % идентичности последовательностей можно использовать программы BESTFIT или GAP в программном пакете GCG Wisconsin Software (Accelrys, Madison WI) с использованием предоставленных параметров по умолчанию.

[0059] «Эталонная последовательность» относится к определенной последовательности, используемой в качестве основы для сравнения последовательностей. Эталонная последовательность может быть частью более крупной последовательности, например, сегментом полноразмерного гена или полипептидной последовательности. Как правило, эталонная последовательность имеет длину по меньшей мере 20 нуклеотидных или аминокислотных остатков, по меньшей мере 25 остатков, по меньшей мере 50 остатков, по меньшей мере 100 остатков или полную длину нуклеиновой кислоты или полипептида. Поскольку каждый из двух полинуклеотидов или полипептидов (1) может содержать последовательность (т. е. часть полной последовательности), сходную между двумя последовательностями, и (2) может дополнительно содержать последовательность, отличающуюся между двумя последовательностями, сравнение последовательностей между двумя (или более) полинуклеотидами или полипептидами обычно проводят путем сравнения последовательностей двух полинуклеотидов или полипептидов в «окне сравнения» для идентификации и сравнения локальных участков сходства последовательностей. В некоторых вариантах осуществления «эталонная последовательность» может быть основана на первичной аминокислотной последовательности, где эталонная последовательность представляет собой последовательность, которая может иметь одно или более изменений в первичной последовательности. Например, фраза «эталонная последовательность на основе SEQ ID NO: 686, содержащая валин в остатке, соответствующем X123», относится к эталонной последовательности, в которой соответствующий остаток в положении X123 в SEQ ID NO: 686 (например, тирозин) был заменен на валин.

[0060] «Окно сравнения» относится к концептуальному сегменту, состоящему по меньшей мере примерно из 20 последовательных положений нуклеотидов или аминокислотных остатков, в котором последовательность может быть сравнена с эталонной последовательностью, состоящей по меньшей мере из 20 последовательных нуклеотидов или аминокислот, и где часть последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т. е. пробелы), составляющие 20 процентов или менее по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Окно сравнения может быть длиннее, чем 20 смежных остатков, и может включать, необязательно, 30, 40, 50, 100 или более длинных окон.

[0061] «Соответствует», «ссылка на» и «относительно» при использовании в контексте нумерации данной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности относятся к нумерации остатков указанной эталонной последовательности, когда данная

аминокислотная или полинуклеотидная последовательность сравнивается с эталонной последовательностью. Другими словами, номер остатка или положение остатка данного полимера обозначается по отношению к эталонной последовательности, а не по фактическому числовому положению остатка в данной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности. Например, данная аминокислотная последовательность, такая как последовательность сконструированной LDC, может быть выровнена с эталонной последовательностью путем введения пробелов для оптимизации соответствия остатков между двумя последовательностями. В этих случаях, несмотря на наличие пробелов, нумерация остатка в данной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности производится относительно эталонной последовательности, с которой она была выровнена.

[0062] «Различие аминокислот» и «различие остатков» относятся к различию аминокислотного остатка в положении полипептидной последовательности относительно аминокислотного остатка в соответствующем положении в эталонной последовательности. Положения аминокислотных различий обычно обозначаются в настоящем описании как «X_n», где n относится к соответствующему положению в эталонной последовательности, на которой основано различие остатков. Например, «различие остатка в положении X123 по сравнению с SEQ ID NO: 686» относится к различию аминокислотного остатка в положении полипептида, соответствующем положению 123 SEQ ID NO: 686. Таким образом, если эталонный полипептид SEQ ID NO: 686 имеет тирозин в положении 123, то «различие остатка в положении X123 по сравнению с SEQ ID NO: 686» относится к аминокислотной замене любого остатка, отличного от тирозина, в положении полипептида, соответствующем положению 123 SEQ ID NO: 686. В большинстве случаев в настоящем описании различие между конкретным аминокислотным остатком в положении обозначается как «X_nY», где «X_n» указывает соответствующий остаток и положение эталонного полипептида (как описано выше), а «Y» представляет собой однобуквенный идентификатор аминокислоты, обнаруженной в сконструированном полипептиде (т. е. остаток, отличный от остатка в эталонном полипептиде). В некоторых случаях исходная аминокислота не указывается (например, 109G). В некоторых случаях (например, в таблицах 1-2, 2-1, 3-2, 4-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 8-2, 10-1, 11- 1 и/или 11-2), в настоящем описании также представлены специфические отличия аминокислот, обозначенные общепринятым обозначением «A_nB», где A представляет собой однобуквенный идентификатор остатка в эталонной последовательности, «n» представляет собой количество положение остатка в эталонной последовательности, а B представляет собой однобуквенный идентификатор замены остатка в последовательности сконструированного полипептида. В некоторых случаях полипептид по настоящему изобретению может включать одно или более отличий аминокислотных остатков по сравнению с эталонной последовательностью, на что указывает список определенных положений, в которых присутствуют различия остатков по сравнению с эталонной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления,

где в конкретном положении остатка полипептида может использоваться более одной аминокислоты, различные аминокислотные остатки, которые можно использовать, разделены символом «/» (например, X123F/X123M/X123V или X123F/M/V или 123F/M/V). Настоящее описание включает сконструированные полипептидные последовательности, содержащие одно или более различий аминокислот, которые включают либо/или как консервативные, так и неконсервативные аминокислотные замены.

[0063] Термины «набор замен аминокислот» и «набор замен» относятся к группе замен аминокислот в полипептидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления наборы замен включают 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления набор замен относится к набору аминокислотных замен, который присутствует в любом из вариантов полипептидов LDC, перечисленных в любой из таблиц в примерах (т.е. в таблицах 1-2, 2-1, 3-2, 4-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 8-2, 10-1, 11-1 и/или 11-2).

[0064] «Консервативная аминокислотная замена» относится к замене остатка другим остатком, имеющим аналогичную боковую цепь, и, таким образом, обычно включает замену аминокислоты в полипептиде аминокислотами из того же или подобного определенного класса аминокислот. В качестве примера, но не ограничения, аминокислота с алифатической боковой цепью может быть заменена другой алифатической аминокислотой (например, аланином, валином, лейцином и изолейцином); аминокислота с гидроксильной боковой цепью заменена другой аминокислотой с гидроксильной боковой цепью (например, серином и треонином); аминокислота с ароматическими боковыми цепями замещена другой аминокислотой с ароматическими боковыми цепями (например, фенилаланином, тирозином, триптофаном и гистидином); аминокислота с основной боковой цепью заменена другой аминокислотой с основной боковой цепью (например, лизином и аргинином); аминокислота с кислой боковой цепью заменена другой аминокислотой с кислой боковой цепью (например, аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой); и гидрофобная или гидрофильная аминокислота заменена другой гидрофобной или гидрофильной аминокислотой, соответственно. Примеры консервативных замен включают замену A, L, V или I другими алифатическими остатками (например, A, L, V, I) или другими неполярными остатками (например, A, L, V, I, G, M); замена G или M другими неполярными остатками (например, A, L, V, I, G, M); замена D или E другими кислотными остатками (например, D, E); замена K или R другими основными остатками (например, K, R); замена N, Q, S или T другими полярными остатками (например, N, Q, S, T); замена H, Y, W или F другими ароматическими остатками (например, H, Y, W, F); или замена C или P другими неполярными остатками (например, C, P).

[0065] «Неконсервативная замена» относится к замене аминокислоты в полипептиде аминокислотой со значительно отличающимися свойствами боковой цепи. Неконсервативные замены могут использовать аминокислоты между определенными группами, а не внутри них, и влияют на: (а) структуру пептидного остова в области

замены (например, пролин вместо глицина); (b) заряд или гидрофобность; и/или (c) основная часть боковой цепи. В качестве примера, но не ограничения, типичные неконсервативные замены включают кислую аминокислоту, замещенную основной или алифатической аминокислотой; ароматическая аминокислота, замещенная небольшой аминокислотой; и гидрофильную аминокислоту, замещенную гидрофобной аминокислотой.

[0066] «Делеция» относится к модификации полипептида путем удаления одной или более аминокислот из эталонного полипептида. Делеции могут включать удаление 1 или более аминокислот, 2 или более аминокислот, 5 или более аминокислот, 10 или более аминокислот, 15 или более аминокислот или 20 или более аминокислот, до 10% от общего количества аминокислот или до 20% от общего количества аминокислот, составляющих эталонный фермент, при сохранении ферментативной активности и/или сохранении улучшенных свойств сконструированного фермента лейциндекарбоксилазы. Делеции могут быть направлены на внутренние участки и/или концевые участки полипептида. В различных вариантах осуществления делеция может включать непрерывный сегмент или может быть прерывистой.

[0067] «Вставка» относится к модификации полипептида путем добавления одной или более аминокислот из эталонного полипептида. Вставки могут быть во внутренних частях полипептида или на карбокси- или amino-конце. Вставки, используемые в настоящем описании, включают слитые белки, как известно в данной области. Вставка может быть непрерывным сегментом аминокислот или разделена одной или более аминокислотами в природном полипептиде.

[0068] Термины «функциональный фрагмент» и «биологически активный фрагмент» используются в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения полипептида, который имеет аминоконцевую и/или карбоксиконцевую делецию(и) и/или внутренние делеции, но где оставшаяся аминокислотная последовательность идентична соответствующим положениям в последовательности, с которой ее сравнивают (например, полноразмерный сконструированный LDC по настоящему изобретению), и которая сохраняет по существу всю активность полноразмерного полипептида.

[0069] «Выделенный полипептид» относится к полипептиду, который по существу отделен от других примесей, которые в природе сопровождают его (например, белок, липиды и полинуклеотиды). Этот термин охватывает полипептиды, которые были удалены или очищены от их природного окружения или системы экспрессии (например, клетки-хозяина или синтеза *in vitro*). Рекомбинантные полипептиды LDC могут находиться внутри клетки, присутствовать в клеточной среде или быть приготовлены в различных формах, таких как лизаты или выделенные препараты. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления рекомбинантные полипептиды LDC, предложенные в настоящем описании, представляют собой выделенные полипептиды.

[0070] «По существу чистый полипептид» относится к композиции, в которой виды полипептидов являются преобладающими присутствующими видами (т. е. в молярном

или массовом отношении они преобладают над любыми другими отдельными высокомолекулярными соединениями в композиции), и обычно представляют собой по существу очищенную композицию, когда целевые виды включают, по меньшей мере, примерно 50% высокомолекулярных соединений, присутствующих в молях или % по массе. Как правило, по существу чистая композиция LDC будет содержать примерно 60% или более, примерно 70% или более, примерно 80% или более, примерно 90% или более, примерно 95% или более и примерно 98% или более всех высокомолекулярных соединений в моль или % массы, присутствующих в композиции. В некоторых вариантах осуществления целевые соединения очищают до существенной гомогенности (т. е. виды загрязняющих веществ не могут быть детектированы в композиции с помощью обычных методов детектирования), где композиция состоит по существу из одного вида высокомолекулярных соединений. Растворители, низкомолекулярные соединения (<500 дальтон) и элементарные ионы не считаются высокомолекулярными соединениями. В некоторых вариантах осуществления выделенные рекомбинантные полипептиды LDC представляют собой по существу чистые полипептидные композиции.

[0071] «Улучшенное свойство фермента» относится к сконструированному полипептиду LDC, который демонстрирует улучшение любого свойства фермента по сравнению с эталонным полипептидом LDC, таким как полипептид LDC дикого типа (например, LDC дикого типа, имеющий SEQ ID NO: 2) или другой сконструированный полипептид LDC. Улучшенные свойства включают, но не ограничиваются этим, такие свойства, как повышенная продукция белка, повышенная стабильность в сыворотке, увеличенный период полувыведения из сыворотки *in vivo*, повышенная термоактивность, повышенная термостабильность, повышенная pH активность, повышенная стабильность, повышенная ферментативная активность, повышенная субстратная специфичность и/или аффинность, повышенная специфическая активность, повышенная устойчивость к ингибированию субстрата и/или конечного продукта, повышенная химическая стабильность, улучшенная хемоселективность, улучшенная устойчивость к растворителям, повышенная толерантность к кислому pH, повышенная толерантность к протеолитической активности (т. е. сниженная чувствительность к протеолизу), сниженная агрегация, повышенная растворимость, сниженная иммуногенность (т. е. сниженная способность индуцировать и/или вызывать иммунный ответ) и измененный температурный профиль.

[0071] «Повышенная ферментативная активность» и «повышенная каталитическая активность» относятся к улучшенному свойству сконструированных полипептидов LDC, которое может быть представлено увеличением удельной активности (например, количество произведенного продукта/время/масса белка) и/или увеличением процента превращения субстрата в продукт (например, процентное превращение исходного количества субстрата в продукт за определенный период времени с использованием определенного количества LDC) по сравнению с эталонным ферментом LDC (например, LDC дикого типа и/или другим сконструированным LDC). Примеры способов

определения ферментативной активности приведены в примерах. Любое свойство, относящееся к ферментативной активности, может быть затронуто, включая классические ферментативные свойства K_m , V_{max} или k_{cat} , изменение которых может привести к повышению ферментативной активности. Улучшение ферментативной активности может быть примерно в 1,1 раза выше ферментативной активности соответствующего фермента дикого типа до 2 раз, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 25 раз, 50 раз, 75 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз или более, чем ферментативная активность у встречающихся в природе LDC или других сконструированных LDC, из которых были получены полипептиды LDC.

[0073] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC обладают удельной активностью по меньшей мере 0,01 мкмоль/мин-мг, по меньшей мере 0,02/мкмоль/мин-мг, по меньшей мере 0,03/мкмоль/мин-мг, по меньшей мере 0,05/мкмоль/мин-мг, по меньшей мере 1/мкмоль/мин-мг и в некоторых предпочтительных вариантах осуществления более 2/мкмоль/мин-мг. В некоторых вариантах осуществления K_m находится в диапазоне от примерно 1 мкМ до примерно 5 мМ; в диапазоне от примерно 5 мкМ до примерно 2 мМ; в диапазоне от примерно 10 мкМ до примерно 2 мМ; или в диапазоне от примерно 10 мкМ до примерно 1 мМ. В некоторых конкретных вариантах осуществления сконструированный фермент LDC проявляет улучшенную ферментативную активность в диапазоне от 1,5 до 10 раз, от 1,5 до 25 раз, от 1,5 до 50 раз, от 1,5 до 100 раз или более, чем у эталонного фермента LDC. Активность LDC можно измерить с помощью любого стандартного анализа, известного в данной области (например, путем мониторинга истощения реагентов или образования продуктов). В некоторых вариантах осуществления количество произведенных продуктов или количество израсходованного субстрата измеряют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с определением поглощения в УФ-излучении или масс-спектров. В некоторых вариантах осуществления сравнения ферментативной активности проводят с использованием определенного препарата фермента, определенного анализа в заданных условиях и одного или более определенных субстратов, как подробно описано в настоящем описании. Как правило, при сравнении лизатов определяют количество клеток и количество анализируемого белка, а также использование идентичных систем экспрессии и идентичных клеток-хозяев, чтобы свести к минимуму различия в количестве фермента, продуцируемого клетками-хозяевами и присутствующего в лизатах.

[0074] Выражение «повышенная стабильность при хранении» означает, что сконструированный полипептид LDC по изобретению будет сохранять большую активность по сравнению с эталонным LDC в стандартном анализе (например, как описано в примерах) после того, как он был получен в высушенной форме (например, лиофилизацией или сушкой распылением), и его хранят в течение периода времени от нескольких дней до нескольких месяцев при температуре выше комнатной (например, 30°C, 37°C, 45°C, 55°C и т. д.).

[0075] «Превращение» относится к ферментативному превращению (или

биотрансформации) субстрата(ов) в соответствующий продукт(ы). «Процент превращения» относится к проценту субстрата, который превращается в продукт в течение периода времени при определенных условиях. Таким образом, «ферментативная активность» или «активность» полипептида LDC может быть выражена как «процент превращения» субстрата в продукт за определенный период времени.

[0076] «Жесткость гибридизации» относится к условиям гибридизации, таким как условия отмывки при гибридизации нуклеиновых кислот. Как правило, реакции гибридизации проводят в условиях более низкой жесткости с последующими отмывками различной, но более высокой жесткости. Термин «умеренно жесткая гибридизация» относится к условиям, которые позволяют ДНК-мишени связываться с комплементарной нуклеиновой кислотой, которая имеет примерно 0% идентичности, предпочтительно примерно 75% идентичности, примерно 85% идентичности с ДНК-мишенью, с идентичностью более чем примерно 90% с полинуклеотидом-мишенью. Примерами умеренно жестких условий являются условия, эквивалентные гибридизации в 50% формамиде, 5×растворе Денхарта, 5×SSPE, 0,2% SDS при 42°C с последующей отмывкой в 0,2×SSPE, 0,2% SDS, при 42°C. «Жесткая гибридизация» обычно относится к условиям, которые соответствуют температуре, которая примерно на 10°C или меньше, чем температура плавления T_m , как определено в условиях раствора для определенной полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления условия высокой жесткости относятся к условиям, которые позволяют гибридизацию только тех последовательностей нуклеиновых кислот, которые образуют стабильные гибриды в 0,018 М NaCl при 65°C (т. е. если гибрид нестабилен в 0,018 М NaCl при 65°C, он не будет стабильным в условиях высокой жесткости, как предполагается в настоящем описании). Условия высокой жесткости могут быть обеспечены, например, гибридизацией в условиях, эквивалентных 50% формамиду, 5× раствору Денхарта, 5×SSPE, 0,2% SDS при 42°C с последующей отмывкой в 0,1×SSPE и 0,1% SDS при 65°C. Другим условием высокой жесткости является гибридизация в условиях, эквивалентных гибридизации в 5X SSC, содержащем 0,1% (масса:объем) SDS, при 65°C и отмывке в 0,1x SSC, содержащем 0,1% SDS, при 65°C. Другие условия гибридизации высокой жесткости, а также условия умеренной жесткости описаны в цитированных выше ссылках.

[0077] «Оптимизирован по кодонам» относится к изменениям кодонов полинуклеотида, кодирующего белок, на те, которые предпочтительно используются в конкретном организме, так что кодируемый белок более эффективно экспрессируется в этом организме. Хотя генетический код является вырожденным, поскольку большинство аминокислот представлены несколькими кодонами, называемыми «синонимами» или «синонимичными» кодонами, хорошо известно, что использование кодонов конкретными организмами неслучайно и смещено в сторону определенных триплетов кодонов. Это смещение использования кодонов может быть выше по отношению к данному гену, генам с общей функцией или наследственным происхождением, белкам с высокой экспрессией по сравнению с белками с низким числом копий и совокупным кодирующим белок

областям генома организма. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие ферменты LDC, оптимизированы по кодонам для оптимальной продукции из организма-хозяина, выбранного для экспрессии. «Контрольная последовательность» в настоящем описании включает все компоненты, которые необходимы или выгодны для экспрессии полинуклеотида и/или полипептида по настоящему изобретению. Каждая контрольная последовательность может быть нативной или инородной по отношению к нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид. Такие контрольные последовательности включают, но не ограничиваются ими, лидеры, последовательности полиаденилирования, последовательности пропептидов, последовательности промоторов, последовательности сигнальных пептидов, последовательности инициации и терминаторы транскрипции. Минимально контрольные последовательности включают промотор и стоп-сигналы транскрипции и трансляции. В некоторых вариантах осуществления контрольные последовательности снабжены линкерами с целью введения специфических сайтов рестрикции, облегчающих лигирование контрольных последовательностей с кодирующим участком последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид.

[0078] «Функционально связанный» определяется в настоящем описании как конфигурация, в которой контрольная последовательность соответствующим образом размещена (т. е. в функциональном соотношении) в положении относительно представляющего интерес полинуклеотида, так что контрольная последовательность направляет или регулирует экспрессию полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид.

[0079] «Промоторная последовательность» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая распознается клеткой-хозяином для экспрессии представляющего интерес полинуклеотида, такой как кодирующая последовательность. Промоторная последовательность содержит последовательности контроля транскрипции, которые опосредуют экспрессию интересующего полинуклеотида. Промотор может представлять собой любую последовательность нуклеиновой кислоты, которая проявляет транскрипционную активность в выбранной клетке-хозяине, включая мутантные, укороченные и гибридные промоторы, и может быть получена из генов, кодирующих внеклеточные или внутриклеточные полипептиды, гомологичные или гетерологичные клетке-хозяину.

[0080] «Субстрат» в контексте процесса ферментативной реакции превращения относится к соединению или молекуле, на которую действует полипептид LDC. «Продукт» в контексте процесса ферментативной конверсии относится к соединению или молекуле, полученной в результате действия полипептида LDC на субстрат.

[0081] Используемый в настоящем описании термин «культивирование» относится к выращиванию популяции микробных клеток в подходящих условиях с использованием любой подходящей среды (например, жидкости, геля или твердого вещества).

[0082] Рекомбинантные полипептиды (например, варианты фермента LDC) могут

быть получены с использованием любых подходящих способов, известных в данной области. Например, существует широкий спектр различных методов мутагенеза, хорошо известных специалистам в данной области. Кроме того, наборы для мутагенеза также доступны от многих коммерческих поставщиков молекулярной биологии. Доступны методы для проведения специфических замен определенных аминокислот (сайт-направленные), специфических или случайных мутаций в локализованной области гена (область-специфические) или случайного мутагенеза по всему гену (например, мутагенез с насыщением). Специалистам в данной области известны многочисленные подходящие способы получения вариантов ферментов, включая, но не ограничиваясь этим, сайт-направленный мутагенез одноцепочечной ДНК или двухцепочечной ДНК с использованием ПЦР, касетный мутагенез, генный синтез, ПЦР пониженной точности, перетасовку, и химический мутагенез с насыщением или любой другой подходящий метод, известный в данной области. Неограничивающие примеры методов, используемых для конструирования ДНК и белков, представлены в следующих патентах: Пат. США № 6117679; Пат. США. № 6420175; Пат. США. № 6376246; Пат. США. № 6586182; Пат. США. № 7747391; Пат. США. № 7747393; Пат. США. № 7783428; и Пат. США. № 8383346. После получения вариантов их можно подвергнуть скринингу на любое желаемое свойство (например, высокую или повышенную активность, или низкую или пониженную активность, повышенную термическую активность, повышенную термостабильность и/или стабильность при кислом pH и т. д.). В некоторых вариантах осуществления находят применение «рекомбинантные полипептиды LDC» (также называемые в настоящем описании «сконструированными полипептидами LDC», «вариантами ферментов LDC» и «вариантами LDC»).

[0083] Используемый в настоящем описании термин «вектор» представляет собой конструкцию ДНК для введения последовательности ДНК в клетку. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой экспрессирующий вектор, который функционально связан с подходящей контрольной последовательностью, способной влиять на экспрессию в подходящем хозяине полипептида, закодированного в последовательности ДНК. В некоторых вариантах осуществления «экспрессирующий вектор» имеет промоторную последовательность, функционально связанную с последовательностью ДНК (например, трансгеном) для управления экспрессией в клетке-хозяине, а в некоторых вариантах осуществления также содержит последовательность терминатора транскрипции.

[0084] Используемый в настоящем описании термин «экспрессия» включает любую стадию, связанную с продуцированием полипептида, включая, но не ограничиваясь этим, транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию и посттрансляционную модификацию. В некоторых вариантах осуществления термин также включает секрецию полипептида из клетки.

[0085] В контексте настоящего документа аминокислотная или нуклеотидная последовательность (например, промоторная последовательность, сигнальный пептид,

терминаторная последовательность и т. д.) является «гетерологичной» другой последовательности, с которой она функционально связана, если две последовательности не связаны в природе.

[0086] Используемые в настоящем описании термины «клетка-хозяин» и «штамм-хозяин» относятся к подходящим хозяевам для экспрессирующих векторов, содержащих ДНК, представленную в настоящем документе (например, полинуклеотидные последовательности, кодирующие по меньшей мере один вариант LDC). В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева представляют собой прокариотические или эукариотические клетки, которые были трансформированы или трансфицированы векторами, сконструированными с использованием способов рекомбинантной ДНК, известных в данной области.

[0087] Термин «аналог» означает полипептид, имеющий более 70% идентичности последовательности, но менее 100% идентичности последовательности (например, более 75%, 78%, 80%, 83%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности последовательности) с эталонным полипептидом. В некоторых вариантах осуществления аналоги относятся к не встречающимся в природе аминокислотным остаткам, включая, но не ограничиваясь ими, гомоаргинин, орнитин и норвалин, а также к природным аминокислотам. В некоторых вариантах осуществления аналоги также включают один или более остатков D-аминокислот и непептидные связи между двумя или более аминокислотными остатками.

[0088] Термин «терапевтический» относится к соединению, вводимому пациенту, у которого проявляются признаки или симптомы патологии, обладающие полезными или желательными медицинскими эффектами.

[0089] Термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, подходящей для фармацевтического применения у пациента-млекопитающего (например, человека), содержащей фармацевтически эффективное количество сконструированного полипептида LDC, охватываемого изобретением, и приемлемый носитель.

[0090] Термин «генная терапия» используется в отношении применения генов (т.е. генетического материала) для лечения и/или предотвращения заболевания у пациента-млекопитающего (например, человека). В некоторых вариантах осуществления генетический материал вводят непосредственно по меньшей мере в некоторые клетки пациента-млекопитающего. Подразумевается, что настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным способом(ами) или композицией(ями), пригодными для генной терапии.

[0091] Термин «мРНК-терапия» используется в отношении применения матричной РНК (мРНК) для лечения и/или предотвращения заболевания у пациента-млекопитающего (например, у человека). В некоторых вариантах осуществления генетический материал вводят непосредственно по меньшей мере в некоторые клетки пациента-млекопитающего. Подразумевается, что настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным способом(ами) или композицией(ями), пригодными для мРНК-терапии.

[0092] Термин «эффективное количество» означает количество, достаточное для получения желаемого результата. Специалист в данной области техники может определить эффективное количество с помощью стандартных экспериментов.

[0093] Термины «выделенный» и «очищенный» используются для обозначения молекулы (например, выделенной нуклеиновой кислоты, полипептида и т. д.) или другого компонента, который удален по меньшей мере из одного другого компонента, с которым он связан в природе. Термин «очищенный» не требует абсолютной чистоты, скорее, это относительное определение.

[0094] Термин «субъект» охватывает млекопитающих, таких как люди, приматы, отличные от человека, домашний скот, домашние животные и лабораторные животные (например, грызуны и лагаторфы). Предполагается, что этот термин охватывает как особей женского пола, так и мужского.

[0095] Используемый в настоящем изобретении термин «пациент» означает любого субъекта, который проходит обследование, подвергается лечению или страдает заболеванием.

[0096] Термин «младенец» относится к ребенку в период от первого месяца после рождения до приблизительно одного (1) года. Используемый в настоящем описании термин «новорожденный» относится к ребенку в период от рождения до 28-го дня жизни. Термин «недоношенный ребенок» относится к младенцу, рожденному после двадцатой полной недели беременности, но до полного срока, обычно с массой тела от ~500 до ~2499 граммов при рождении. «Младенец с очень низкой массой тела при рождении» - это младенец с массой тела менее 1500 г при рождении.

[0097] Используемый в настоящем описании термин «ребенок» относится к лицу, не достигшему совершеннолетия для согласия на лечение или исследовательские процедуры. В некоторых вариантах осуществления термин относится к человеку в период между рождением и подростковым возрастом.

[0098] Используемый в настоящем описании термин «взрослый» относится к лицу, достигшему совершеннолетия в соответствующей юрисдикции (например, 18 лет в США). В некоторых вариантах осуществления термин относится к любому полностью выросшему зрелому организму. В некоторых вариантах осуществления термин «подросток» относится к лицу моложе 18 лет, но достигшему половой зрелости.

[0099] Используемые в настоящем описании термины «композиция» и «состав» охватывают продукты, содержащие по меньшей мере одну сконструированную LDC по настоящему изобретению, предназначенные для любого подходящего применения (например, фармацевтические композиции, диетические/пищевые добавки, корма и т. д.).

[0100] Термин «введение» композиции означает предоставление композиции по настоящему изобретению пациенту (например, человеку, страдающему от эффектов MSUD).

[0101] Термин «носитель» при использовании в отношении фармацевтической композиции означает любой из стандартных фармацевтических носителей, буферов и

вспомогательных веществ, таких как стабилизаторы, консерванты и адъюванты.

[0102] Термин «фармацевтически приемлемый» означает материал, который можно вводить пациенту, не вызывая каких-либо нежелательных биологических эффектов или вредного взаимодействия с любым из компонентов, в которых он содержится, и который обладает желаемой биологической активностью.

[0103] Используемый в настоящем описании термин «вспомогательное вещество» относится к любой фармацевтически приемлемой добавке, носителю, разбавителю, адъюванту или другому ингредиенту, отличному от активного фармацевтического ингредиента (API; например, сконструированные полипептиды LDC по настоящему изобретению). Вспомогательные вещества обычно включаются в состав и/или для целей введения.

[0104] Термин «терапевтически эффективное количество» при использовании в отношении симптомов заболевания/состояния относится к количеству и/или концентрации соединения (например, сконструированных полипептидов LDC), которое улучшает, ослабляет или устраняет один или более симптомов заболевания/состояния или предотвращает или задерживает появление симптома(ов) (например, MSUD). В некоторых вариантах осуществления этот термин используется в отношении количества композиции, которое вызывает биологический (например, медицинский) ответ ткани, системы или животного, который требуется исследователю, врачу, ветеринару или другому клиницисту.

[0105] Термин «терапевтически эффективное количество» при использовании в отношении заболевания/состояния относится к количеству и/или концентрации композиции, которая улучшает, ослабляет или устраняет заболевание/состояние.

[0106] Предполагается, что термины «лечить» и «лечение» охватывают как профилактическое (например, профилактическое), так и паллиативное лечение.

[0107] Используемый в настоящем описании термин «по меньшей мере один» не предназначен для ограничения изобретения каким-либо конкретным количеством элементов. Он предназначен для охвата одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или более элементов по желанию.

Сконструированные полипептиды LDC:

[0108] Родительские полипептиды LDC, из которых получают сконструированные полипептиды LDC по изобретению, включают бактериальные штаммы, такие как бактерии семейства *Planctomycetaceae*.

[0109] Кроме того, когда конкретный вариант LDC (т. е. сконструированный полипептид LDC) упоминается посредством ссылки на модификацию конкретных аминокислотных остатков в последовательности LDC дикого типа или эталонного LDC, следует понимать, что варианты другого модифицированного LDC в эквивалентном положении (положениях) (как определено из необязательного выравнивания аминокислотных последовательностей между соответствующими аминокислотными последовательностями) включены в настоящее описание.

[0110] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC получают путем культивирования микроорганизма, содержащего по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один сконструированный полипептид LDC, в условиях, благоприятных для получения сконструированного полипептида LDC. В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид LDC впоследствии выделяют из полученной культуральной среды и/или клеток.

[0111] Настоящее изобретение относится к иллюстративным сконструированным полипептидам LDC, обладающим активностью LDC. Примеры содержат таблицы (т. е. Таблицы 1-2, 2-1, 3-2, 4-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 8-2, 10-1, 11-1 и/или 11-2), демонстрирующие информацию о структуре последовательности, коррелирующую с особенностями аминокислотной последовательности с функциональной активностью сконструированных полипептидов LDC. Эта информация о корреляции структура-функция предоставляется в виде различий конкретных аминокислотных остатков по сравнению с эталонным сконструированным полипептидом SEQ ID NO: 2, а также связанных экспериментально определенных данных об активности типичных сконструированных полипептидов LDC.

[0112] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC по настоящему изобретению, обладающие активностью LDC, содержат а) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную эталонной последовательности SEQ ID NO: 2; б) различие аминокислотных остатков по сравнению с SEQ ID NO: 2 в одном или более положениях аминокислот; и с) которые проявляют улучшенное свойство, выбранное из i) повышенной каталитической активности, ii) пониженной протеолитической чувствительности, iii) пониженной агрегации, iv) повышенной стабильности лиофилизированного препарата к повышенным температурам, v) пониженной иммуногенности или комбинации любого из i), ii), iii), iv) или v) по сравнению с эталонной последовательностью.

[0113] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к функциональным фрагментам сконструированных полипептидов LDC. В некоторых вариантах осуществления функциональные фрагменты имеют по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98% или по меньшей мере примерно 99% активности сконструированного полипептида LDC, из которого он был получен (т. е. родительского сконструированного LDC). В некоторых вариантах осуществления функциональные фрагменты имеют по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 91%, по меньшей мере примерно 92%, по меньшей мере примерно 93%, по меньшей мере примерно 94%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98% или по меньшей мере примерно 99% исходной последовательности сконструированного LDC. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент укорочен менее чем на 5, менее чем на 10, менее чем на 15, менее чем на 10,

менее чем на 25, менее чем на 30, менее чем на 35, менее чем на 40, менее чем на 45 и менее чем на 50 аминокислот.

[0114] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к функциональным фрагментам сконструированных полипептидов LDC. В некоторых вариантах осуществления функциональные фрагменты имеют по меньшей мере примерно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% активности сконструированного полипептида LDC, из которого он был получен (т. е. родительского сконструированного LDC). В некоторых вариантах осуществления функциональные фрагменты имеют по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% родительской последовательности сконструированной LDC. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент укорочен менее чем на 5, менее чем на 10, менее чем на 15, менее чем на 10, менее чем на 25, менее чем на 30, менее чем на 35, менее чем на 40, менее чем на 45, менее чем на 50, менее чем на 55, менее чем на 60, менее чем на 65 или менее чем на 70 аминокислот.

[0115] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид LDC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с эталонной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766, или с аминокислотной последовательностью любого варианта (например, приведенной в примерах). В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность выбрана из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766.

[0116] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид LDC содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% %, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766, и одно или более отличий остатков по сравнению с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766.

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

[0117] Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим описанные в настоящем описании сконструированные полипептиды LDC. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды функционально связаны с одной или более гетерологичными регуляторными последовательностями, которые контролируют экспрессию гена, для создания рекомбинантного полинуклеотида, способного экспрессировать полипептид. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие конструкции, содержащие по меньшей мере один гетерологичный полинуклеотид, кодирующий сконструированный(ые) полипептид(ы) LDC, вводят в соответствующие клетки-хозяева для экспрессии соответствующего(их) полипептида(ов) LDC.

[0118] Как будет очевидно специалисту в данной области техники, доступность белковой последовательности и знание кодонов, соответствующих различным аминокислотам, обеспечивают описание всех полинуклеотидов, способных кодировать рассматриваемые полипептиды. Вырожденность генетического кода, когда одни и те же аминокислоты кодируются альтернативными или синонимичными кодонами, позволяет получить чрезвычайно большое количество нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует сконструированный полипептид LDC. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам и композициям для получения всех без исключения возможных вариантов полинуклеотидов LDC, которые можно получить, кодируя полипептиды LDC, описанные в настоящем описании, путем выбора комбинаций на основе возможного выбора кодонов, и все такие варианты следует рассматривать как конкретно раскрытые для любого описанного в настоящем описании полипептида, включая аминокислотные последовательности, представленные в Примерах (например, в Таблицах 1-2, 2-1, 3-2, 4-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 8-2, 10-1, 11-1 и/или 11-2).

[0119] В некоторых вариантах осуществления кодоны предпочтительно оптимизированы для использования выбранной клеткой-хозяином для продукции белка. Например, предпочтительные кодоны, используемые в бактериях, обычно используются для экспрессии в бактериях. Следовательно, кодон-оптимизированные полинуклеотиды, кодирующие сконструированные полипептиды LDC, содержат предпочтительные кодоны примерно в 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более чем 90% положений кодонов в полноразмерной кодирующей области.

[0120] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид LDC кодирует сконструированный полипептид, обладающий активностью LDC со свойствами, раскрытыми в настоящем описании, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90% %, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности с эталонной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766, или аминокислотной последовательностью любого варианта (например, представленных в примерах), и одно или более различий остатков по сравнению с эталонным полинуклеотидом SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 37, 233, 283, 483, 593, 685, 687 и/или 765, или аминокислотной последовательностью любого варианта как описано в Примерах (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более положений аминокислотных остатков). В некоторых вариантах осуществления эталонная последовательность выбрана из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766.

[0121] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид LDC кодирует сконструированный полипептид, обладающий активностью LDC со свойствами, раскрытыми в настоящем описании, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90% %, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности

последовательности с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766, и одно или более отличий остатков по сравнению с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766.

[0122] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий сконструированные полипептиды LDC, содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из полинуклеотидной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 37, 233, 283, 483, 593, 685, 687 и/или 765. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид LDC, имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% идентичности нуклеотидных остатков с SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 37, 233, 283, 483, 593, 685, 687 и/или 765.

[0123] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды способны гибридизоваться в очень жестких условиях с эталонной полинуклеотидной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766, или с их комплементарными последовательностями, или с полинуклеотидной последовательностью, кодирующей любой из вариантов полипептидов LDC, предложенных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, способный к гибридизации в очень жестких условиях, кодирует полипептид LDC, содержащий аминокислотную последовательность, которая имеет один или более остатков, отличающихся от SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766.

[0124] В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид, кодирующий любой из сконструированных в настоящем описании полипептидов LDC, подвергают манипуляциям различными способами для облегчения экспрессии полипептида LDC. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, кодирующие полипептиды LDC, содержат экспрессирующие векторы, в которых присутствует одна или более контрольных последовательностей для регуляции экспрессии полинуклеотидов и/или полипептидов LDC. Манипуляции с выделенным полинуклеотидом перед его встраиванием в вектор могут быть желательны или необходимы в зависимости от используемого экспрессирующего вектора. Методы модификации полинуклеотидов и последовательностей нуклеиновых кислот с использованием методов рекомбинантной ДНК хорошо известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления контрольные последовательности включают, среди прочего, промоторы, лидерные последовательности, последовательности полиаденилирования, последовательности пропептидов, последовательности сигнальных пептидов и терминаторы транскрипции. В некоторых вариантах осуществления подходящие промоторы выбирают на основе выбора клеток-хозяев. Для бактериальных клеток-хозяев подходящие промоторы для направления транскрипции конструкций нуклеиновых кислот по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, промоторы, полученные из *lac*-оперона *E. coli*, гена агаразы *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), гена левансахаразы *Bacillus subtilis* (*sacB*), гена альфа-

амилазы *Bacillus licheniformis* (amyL), гена мальтогенной амилазы *Bacillus stearothermophilus* (amyM), гена альфа-амилазы *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), гена пенициллиназы *Bacillus licheniformis* (penP), генов xylA и xylB *Bacillus subtilis* и прокариотического гена бета-лактамазы (см., например, Villa-Kamaroff et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 75:3727-3731 [1978]), а также промотор tac (см., например, DeBoer et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 80: 21-25 [1983]). Примеры промоторов для клеток-хозяев мицелиальных грибов включают, но не ограничиваются ими, промоторы, полученные из генов амилазы ТАКА *Aspergillus oryzae*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei*, нейтральной альфа-амилазы *Aspergillus niger*, кислотоустойчивой альфа-амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы (glaA) *Aspergillus niger* или *Aspergillus awamori*, липазы *Rhizomucor miehei*, щелочной протеазы *Aspergillus oryzae*, триозофосфатизомеразы *Aspergillus oryzae*, ацетамидазы *Aspergillus nidulans* и трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum* (см., например, WO 96/00787), а также промотор NA2-tpi (гибрид промоторов генов нейтральной альфа-амилазы *Aspergillus niger* и триозофосфатизомеразы *Aspergillus oryzae*), а также их мутантные, укороченные и гибридные промоторы. Примеры промоторов дрожжевых клеток могут происходить из генов энолазы *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), галактокиназы *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), алкогольдегидрогеназы/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP) и 3-фосфоглицераткиназы *Saccharomyces cerevisiae*. Другие полезные промоторы для дрожжевых клеток-хозяев известны в данной области. (См., например, Romanos et al., Yeast 8:423-488 [1992]).

[0125] В некоторых вариантах осуществления контрольная последовательность также представляет собой подходящую последовательность терминатора транскрипции (т. е. последовательность, распознаваемая клеткой-хозяином для терминации транскрипции). В некоторых вариантах осуществления последовательность терминатора функционально связана с 3'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид LDC. Любой подходящий терминатор, функционирующий в выбранной клетке-хозяине, находит применение в настоящем изобретении. Примеры терминаторов транскрипции для клеток-хозяев мицелиальных грибов могут быть получены из генов амилазы ТАКА *Aspergillus oryzae*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, антранилатсинтазы *Aspergillus nidulans*, альфа-глюкозидазы *Aspergillus niger* и трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum*. Иллюстративные терминаторы для дрожжевых клеток-хозяев могут быть получены из генов энолазы *Saccharomyces cerevisiae*, цитохрома C (CYC1) *Saccharomyces cerevisiae* и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae*. Другие полезные терминаторы для дрожжевых клеток-хозяев известны в данной области (см., например, Romanos et al., см. выше).

[0126] В некоторых вариантах осуществления контрольная последовательность также представляет собой подходящую лидерную последовательность (т. е. нетранслируемую область мРНК, которая важна для трансляции клеткой-хозяином). В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность функционально

связана с 5'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид LDC. Любая подходящая лидерная последовательность, которая является функциональной в выбранной клетке-хозяине, находит применение в настоящем изобретении. Примеры лидеров для клеток-хозяев мицелиальных грибов получают из генов амилазы TAKA *Aspergillus oryzae* и триозофосфатизомеразы *Aspergillus nidulans*. Подходящие лидеры для дрожжевых клеток-хозяев получают из генов энолазы *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-фосфоглицераткиназы *Saccharomyces cerevisiae*, альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и алкогольдегидрогеназы/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

[0127] В некоторых вариантах осуществления контрольная последовательность также представляет собой последовательность полиаденилирования (т. е. последовательность, функционально связанная с 3'-концом последовательности нуклеиновой кислоты и которая при транскрипции распознается клеткой-хозяином в качестве сигнала для добавления остатков полиаденозина к транскрибируемой мРНК). Любая подходящая последовательность полиаденилирования, которая является функциональной в выбранной клетке-хозяине, находит применение в настоящем изобретении. Иллюстративные последовательности полиаденилирования для клеток-хозяев мицелиальных грибов включают, но не ограничиваются ими, гены амилазы TAKA *Aspergillus oryzae*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, антранилатсинтазы *Aspergillus nidulans*, трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum* и альфа-глюкозидазы *Aspergillus niger*. Известны полезные последовательности полиаденилирования для дрожжевых клеток-хозяев. (См., например, Guo and Sherman, *Mol. Cell. Bio.*, 15:5983-5990 [1995]).

[0128] В некоторых вариантах осуществления контрольная последовательность также представляет собой сигнальный пептид (т. е. кодирующая область, которая кодирует аминокислотную последовательность, связанную с аминоконцом полипептида, и направляет кодируемый полипептид по секреторному пути клетки). В некоторых вариантах осуществления 5'-конец кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты по своей природе содержит кодирующую область сигнального пептида, естественно связанную в рамке считывания трансляции с сегментом кодирующей области, который кодирует секретируемый полипептид. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления 5'-конец кодирующей последовательности содержит область, кодирующую сигнальный пептид, которая является чужеродной для кодирующей последовательности. Любая подходящая область, кодирующая сигнальный пептид, которая направляет экспрессируемый полипептид по секреторному пути выбранной клетки-хозяина, находит применение для экспрессии сконструированного(ых) полипептида(ов). Кодирующие области эффективных сигнальных пептидов для бактериальных клеток-хозяев, включают, но не ограничиваются ими, те, что получены из генов мальтогенной амилазы *Bacillus* NCIB 11837, альфа-амилазы *Bacillus stearothermophilus*, субтилилина *Bacillus licheniformis*, бета-лактамазы *Bacillus licheniformis*, нейтральной протеазы *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM) и prsA

Bacillus subtilis. Дополнительные сигнальные пептиды известны в данной области (см., например, Simonen and Palva, *Microbiol. Rev.*, 57:109-137 [1993]). В некоторых вариантах осуществления эффективные области, кодирующие сигнальный пептид, для клеток-хозяев мицелиальных грибов включают, но не ограничиваются ими, области, кодирующие сигнальный пептид, полученные из генов амилазы ТАКА *Aspergillus oryzae*, нейтральной амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei*, целлюлазы *Humicola insolens* и липазы *Humicola lanuginosa*. Полезные сигнальные пептиды для дрожжевых клеток-хозяев включают, но не ограничиваются ими, пептиды из генов альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и инвертазы *Saccharomyces cerevisiae*.

[0129] В некоторых вариантах осуществления контрольная последовательность также представляет собой область, кодирующую пропептид, которая кодирует аминокислотную последовательность, расположенную на аминоконце полипептида. Полученный полипептид называют «проферментом», «прополипептидом» или «зимогеном». Пропептид можно превратить в зрелый активный полипептид путем каталитического или автокаталитического отщепления пропептида от прополипептида. Кодирующая пропептид область может быть получена из любого подходящего источника, включая, но не ограничиваясь этим, гены щелочной протеазы *Bacillus subtilis* (*aprE*), нейтральной протеазы *Bacillus subtilis* (*nprT*), альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei* и лактазы *Myceliophthora thermophila* (см., например, WO 95/33836). Если области сигнального пептида и пропептида присутствуют на аминоконце полипептида, область пропептида расположена рядом с аминоконцом полипептида, а область сигнального пептида расположена рядом с аминоконцом области пропептида.

[0130] В некоторых вариантах осуществления также используются регуляторные последовательности. Эти последовательности облегчают регуляцию экспрессии полипептида относительно роста клетки-хозяина. Примерами регуляторных систем являются те, которые вызывают включение или выключение экспрессии гена в ответ на химический или физический стимул, включая присутствие регуляторного соединения. В прокариотических клетках-хозяевах подходящие регуляторные последовательности включают, но не ограничиваются ими, системы операторов *lac*, *tac* и *trp*. В дрожжевых клетках-хозяевах подходящие регуляторные системы включают, но не ограничиваются ими, систему *ADH2* или систему *GAL1*. В мицелиальных грибах подходящие регуляторные последовательности включают, но не ограничиваются ими, промотор альфа-амилазы ТАКА, промотор глюкоамилазы *Aspergillus niger* и промотор глюкоамилазы *Aspergillus oryzae*.

[0131] В другом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному экспрессирующему вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид LDC, и одну или более областей, регулирующих экспрессию, таких как промотор и терминатор, последовательность начала репликации и

т. д., в зависимости от типа хозяев, в которые они должны быть введены. В некоторых вариантах осуществления различные последовательности нуклеиновой кислоты и контрольные последовательности, описанные в настоящем описании, соединяют вместе для получения рекомбинантных экспрессирующих векторов, которые включают один или более удобных сайтов рестрикции для обеспечения вставки или замены последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид LDC, в таких сайтах. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению экспрессируется путем вставки последовательности нуклеиновой кислоты или конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, в подходящий вектор для экспрессии. В некоторых вариантах осуществления, связанных с созданием экспрессирующего вектора, кодирующая последовательность расположена в векторе таким образом, что кодирующая последовательность функционально связана с соответствующими контрольными последовательностями для экспрессии.

[0132] Рекомбинантный экспрессирующий вектор может быть любым подходящим вектором (например, плазмидным или вирусным), который можно легко подвергнуть процедурам рекомбинантной ДНК и вызвать экспрессию полинуклеотидной последовательности LDC. Выбор вектора обычно зависит от совместимости вектора с клеткой-хозяином, в которую должен быть введен вектор. Векторы могут быть линейными или замкнутыми кольцевыми плазмидами.

[0133] В некоторых вариантах осуществления экспрессирующий вектор представляет собой автономно реплицирующийся вектор (т. е. вектор, который существует как внехромосомный объект, репликация которого не зависит от хромосомной репликации, такой как плазида, внехромосомный элемент, минихромосома, или искусственная хромосома). Вектор может содержать любые средства для обеспечения саморепликации. В некоторых альтернативных вариантах осуществления вектор представляет собой вектор, в котором при введении в клетку-хозяина он интегрируется в геном и реплицируется вместе с хромосомой(ами), в которую он был интегрирован. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления используется один вектор или плазида, или два или более векторов или плазмид, которые вместе содержат общую ДНК, подлежащую введению в геном клетки-хозяина, и/или транспозон.

[0134] В некоторых вариантах осуществления экспрессирующий вектор содержит один или более маркеров селекции, которые обеспечивают легкий отбор трансформированных клеток. «Маркер селекции» представляет собой ген, продукт которого обеспечивает устойчивость к биоцидам или вирусам, устойчивость к тяжелым металлам, прототрофность к ауксотрофам и т. п. Примеры бактериальных маркеров селекции включают, но не ограничиваются ими, гены *dal* из *Bacillus subtilis* или *Bacillus licheniformis*, или маркеры, которые придают устойчивость к антибиотикам, такие как устойчивость к ампициллину, канамицину, хлорамфениколу или тетрациклину. Подходящие маркеры для дрожжевых клеток-хозяев включают, но не ограничиваются

ими, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 и URA3. Маркеры селекции для использования в клетках-хозяевах мицелиальных грибов включают, но не ограничиваются ими, amdS (ацетамидазу; например, из *A. nidulans* или *A. oryzae*), argB (орнитинкарбамоилтрансферазы), bar (фосфинотрицинацетилтрансферазу; например, из *S. hygrosopicus*), hph (гипромицинфосфотрансфераза), niaD (нитратредуктаза), purG (оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза, например, из *A. nidulans* или *A. oryzae*), sC (сульфатаденилтрансфераза) и trpC (антранилатсинтаза), а также их эквиваленты. В другом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один сконструированный полипептид LDC по настоящему изобретению, причем полинуклеотид(ы) функционально связан с одной или более контрольными последовательностями для экспрессии сконструированного фермента LDC) в клетке-хозяине. Клетки-хозяева, подходящие для экспрессии полипептидов, кодируемых экспрессирующими векторами по настоящему изобретению, хорошо известны в данной области и включают, но не ограничиваются ими, бактериальные клетки, такие как клетки *E. coli*, *Vibrio fluvialis*, *Streptomyces* и *Salmonella typhimurium*; клетки грибов, такие как дрожжевые клетки (например, *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris* (номер доступа ATCC 201178)); клетки насекомых, такие как клетки *Drosophila S2* и *Spodoptera Sf9*; животные клетки, такие как CHO, COS, BHK, 293 и клетки меланомы Bowes; и растительные клетки. Примеры клеток-хозяев также включают различные штаммы *Escherichia coli* (например, W3110 (Δ fhuA) и BL21).

[0135] Соответственно, в другом аспекте настоящее изобретение относится к способам получения сконструированных полипептидов LDC, где способы включают культивирование клетки-хозяина, способной экспрессировать полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид LDC, в условиях, подходящих для экспрессии полипептида. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают стадии выделения и/или очистки полипептидов LDC, как описано в настоящем описании.

[0136] Подходящие культуральные среды и условия роста клеток-хозяев хорошо известны в данной области. Предполагается, что любой подходящий способ введения полинуклеотидов для экспрессии полипептидов LDC в клетки найдет применение в настоящем изобретении. Подходящие методы включают, но не ограничиваются ими, электропорацию, биолистическую бомбардировку частицами, трансфекцию, опосредованную липосомами, трансфекцию хлоридом кальция и слияние протопластов.

[0137] Сконструированные полипептиды LDC со свойствами, описанными в настоящем документе, можно получить, подвергая полинуклеотид, кодирующий встречающийся в природе или сконструированный полипептид LDC, любым подходящим методам мутагенеза и/или направленной эволюции, известным в данной области, и/или описанным в настоящем документе. Типичным методом направленной эволюции является мутагенез и/или перетасовка ДНК. (См., например, Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA

91:10747-10751 [1994]; WO 95/22625; WO 97/0078; WO 97/35966; WO 98/27230; WO 00/42651; WO 01/75767 и публикация заявки на Пат. 6537746). Другие процедуры направленной эволюции, которые можно использовать, включают, среди прочего, процесс ступенчатого удлинения (StEP), рекомбинацию *in vitro* (см., например, Zhao et al., *Nat. Biotechnol.*, 16:258-261 [1998]), мутагенную ПЦР (см., например, Caldwell et al., *PCR Methods Appl.*, 3:S136-S140 [1994]), и кассетный мутагенез (см., например, Black et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3525-3529 [1996]).

[0138] Методы мутагенеза и направленной эволюции могут быть легко применены к полинуклеотидам, кодирующим LDC, для создания библиотек вариантов, которые можно экспрессировать, подвергать скринингу и анализу. Любые подходящие методы мутагенеза и направленной эволюции находят применение в настоящем изобретении и хорошо известны в данной области (см., например, патенты США № 5605793, 5811238, 5830721, 5834252, 5837458, 5928905, 6096548, 6117679, 6132970, 6165793, 6180406, 6251674, 6265201, 6277638, 6287861, 6287862, 6291242, 6297053, 6303344, 6309883, 6319713, 6319714, 6323030, 6326204, 6335160, 6335198, 6344356, 6352859, 6355484, 6358740, 6358742, 6365377, 6365408, 6368861, 6372497, 6337186, 6376246, 6379964, 6387702, 6391552, 6391640, 6395547, 6406855, 6406910, 6413745, 6413774, 6420175, 6423542, 6426224, 6436675, 6444468, 6455253, 6479652, 6482647, 6483011, 6484105, 6489146, 6500617, 6500639, 6506602, 6506603, 6518065, 6519065, 6521453, 6528311, 6537746, 6573098, 6576467, 6579678, 6586182, 6602986, 6605430, 6613514, 6653072, 6686515, 6703240, 6716631, 6825001, 6902922, 6917882, 6946296, 6961664, 6995017, 7024312, 7058515, 7105297, 7148054, 7220566, 7288375, 7384387, 7421347, 7430477, 7462469, 7534564, 7620500, 7620502, 7629170, 7702464, 7747391, 7747393, 7751986, 7776598, 7783428, 7795030, 7853410, 7868138, 7783428, 7873477, 7873499, 7904249, 7957912, 7981614, 8014961, 8029988, 8048674, 8058001, 8076138, 8108150, 8170806, 8224580, 8377681, 8383346, 8457903, 8504498, 8589085, 8762066, 8768871, 9593326, 9665694, 9684771 и все соответствующие аналоги в США и за пределами США; Ling et al., *Anal. Biochem.*, 254(2):157-78 [1997]; Dale et al., *Meth. Mol. Biol.*, 57:369-74 [1996]; Smith, *Ann. Rev. Genet.*, 19:423-462 [1985]; Botstein et al., *Science*, 229:1193-1201 [1985]; Carter, *Biochem. J.*, 237:1-7 [1986]; Kramer et al., *Cell*, 38:879-887 [1984]; Wells et al., *Gene*, 34:315-323 [1985]; Minshull et al., *Curr. Op. Chem. Biol.*, 3:284-290 [1999]; Christians et al., *Nat. Biotechnol.*, 17:259-264 [1999]; Crameri et al., *Nature*, 391:288-291 [1998]; Crameri, et al., *Nat. Biotechnol.*, 15:436-438 [1997]; Zhang et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:4504-4509 [1997]; Crameri et al., *Nat. Biotechnol.*, 14:315-319 [1996]; Stemmer, *Nature*, 370:389-391 [1994]; Stemmer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91:10747-10751 [1994]; WO 95/22625; WO 97/0078; WO 97/35966; WO 98/27230; WO 00/42651; WO 01/75767; WO 2009/152336; и публикации Пат. No 2011/0082055, 2014/0005057, 2014/0214391, 2014/0221216, 2015/0133307, 2015/0134315 и 2015/0050658; все они включены в настоящее описание в качестве ссылки).

[0139] В некоторых вариантах осуществления клоны ферментов, полученные после

обработки мутагенезом, подвергают скринингу путем воздействия на ферментные препараты определенной температуры (или других условий анализа) и измерения степени ферментативной активности, оставшейся после тепловой обработки или других подходящих условий анализа. Клоны, содержащие полинуклеотид, кодирующий полипептид LDC, затем выделяют из гена, секвенируют для выявления изменений нуклеотидной последовательности (если таковые имеются) и используют для экспрессии фермента в клетке-хозяине. Измерение ферментативной активности экспрессирующих библиотек может быть выполнено с использованием любого подходящего метода, известного в данной области (например, стандартные методы биохимии, такие как анализ ВЭЖХ).

[0140] Для сконструированных полипептидов с известной последовательностью полинуклеотиды, кодирующие фермент, могут быть получены стандартными твердофазными методами в соответствии с известными синтетическими методами. В некоторых вариантах осуществления фрагменты примерно до 100 оснований могут быть синтезированы по отдельности, а затем соединены (например, с помощью ферментативных или химических способов линирования или методов, опосредованных полимеразой), с образованием любой желаемой непрерывной последовательности. Например, полинуклеотиды и олигонуклеотиды, описанные в настоящем описании, могут быть получены путем химического синтеза с использованием классического фосфорамидитного метода (см., например, Beaucage et al., *Tet. Lett.*, 22:1859-69 [1981]; и Matthes et al., *EMBO J.*, 3:801-05 [1984]), как это обычно практикуется в автоматизированных синтетических методах. В соответствии с фосфорамидитным методом синтезируют олигонуклеотиды (например, в автоматическом ДНК-синтезаторе, очищают, отжигают, лигируют и клонируют в соответствующих векторах).

[0141] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способ получения сконструированного полипептида LDC может включать: (а) синтез полинуклеотида, кодирующего полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотной последовательности любого варианта, описанного в настоящем описании, и (б) экспрессию полипептида LDC, кодируемого полинуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления способа аминокислотная последовательность, кодируемая полинуклеотидом, может необязательно иметь одну или более (например, до 3, 4, 5 или до 10) делеций, вставок и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность необязательно имеет 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-10, 1-15, 1-20, 1-21, 1-22, 1-23, 1-24, 1-25, 1-30, 1-35, 1-40, 1-45 или 1-50 делеций, вставок и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность необязательно имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 30, 35, 40, 45 или 50 делеций, вставок и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная последовательность необязательно имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 делеций, вставок и/или замен

аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления замены являются консервативными или неконсервативными заменами.

[0142] Экспрессированный сконструированный полипептид LDC можно оценить на любое желаемое улучшенное свойство или комбинацию свойств (например, активность, селективность, стабильность и т. д.) с использованием любого подходящего анализа, известного в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, анализы и условия, описанные в настоящем описании.

[0143] В некоторых вариантах осуществления любой из сконструированных полипептидов LDC, экспрессированных в клетке-хозяине, выделяют из клеток и/или культуральной среды с использованием любого одного или более хорошо известных способов очистки белка, включая, но не ограничиваясь этим, обработку лизоцимом, обработку ультразвуком, фильтрацию, высаливание, ультрацентрифугирование и хроматографию.

[0144] Хроматографические методы выделения полипептидов LDC включают, среди прочего, обращенно-фазовую хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, эксклюзионную хроматографию, гель-электрофорез и аффинную хроматографию. Условия очистки конкретного фермента частично зависят от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность, гидрофильность, молекулярная масса, форма молекулы и т. д., и они очевидны специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления для выделения улучшенных ферментов LDC можно использовать аффинные методики. Для очистки с помощью аффинной хроматографии может найти применение любое антитело, которое специфически связывает интересующий полипептид LDC. Для получения антител различных животных-хозяев, включая, но не ограничиваясь ими, кроликов, мышей, крыс и т. д., иммунизируют путем инъекции полипептида LDC или его фрагмента. В некоторых вариантах осуществления полипептид или фрагмент LDC присоединен к подходящему носителю, такому как BSA, с помощью функциональной группы боковой цепи или линкеров, присоединенных к функциональной группе боковой цепи.

[0145] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид LDC получают в клетке-хозяине способом, включающим культивирование клетки-хозяина (например, штамма *E. coli*), содержащей полинуклеотидную последовательность, кодирующую сконструированный полипептид LDC, как описано в настоящем описании, в условиях, способствующих получению сконструированного полипептида LDC и выделению сконструированного полипептида LDC из клеток и/или культуральной среды. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин продуцирует более одного сконструированного полипептида LDC.

[0146] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения сконструированного полипептида LDC, включающему культивирование рекомбинантной бактериальной клетки, содержащей полинуклеотидную

последовательность, кодирующую сконструированный полипептид LDC, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с эталонными последовательностями SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766, и одно или больше различий в аминокислотных остатках по сравнению с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766, как предусмотрено в настоящем описании, при подходящих условиях культивирования для получения сконструированного полипептида LDC и, необязательно, выделения сконструированного полипептида LDC из культуры и/или культивируемых бактериальных клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин продуцирует более одного сконструированного полипептида LDC.

[0147] В некоторых вариантах осуществления после извлечения сконструированных полипептидов LDC из рекомбинантных клеток-хозяев и/или культуральной среды их дополнительно очищают любым подходящим(и) способом(ами), известным(и) в данной области. В некоторых дополнительных вариантах осуществления очищенные полипептиды LDC комбинируют с другими ингредиентами и соединениями для получения композиций и составов, содержащих сконструированный полипептид LDC, подходящих для различных применений и использований (например, фармацевтических композиций).

Композиции:

[0148] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам LDC, пригодным для использования в многочисленных композициях. Эти композиции находят применение во многих областях, включая, но не ограничиваясь этим, фармацевтику, диетические/пищевые добавки, продукты питания, корма и тонкое химическое производство. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к продуктам питания и/или кормам, содержащим по меньшей мере один сконструированный вариант LDC и/или по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность, кодирующую по меньшей мере один вариант LDC. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к напиткам, содержащим по меньшей мере один сконструированный вариант LDC.

[0149] В некоторых вариантах осуществления сконструированный вариант LDC в пищевых продуктах, кормах и/или пищевых/диетических добавках является гликозилированным. Кроме того, сконструированные варианты LDC находят применение в любой подходящей матрице для доставки пищевых ферментов. В некоторых вариантах осуществления сконструированные варианты LDC присутствуют в съедобной матрице для доставки ферментов, предназначенной для быстрого распространения варианта LDC в пищеварительном тракте животного при проглатывании варианта.

[0150] Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам LDC, пригодным для использования в производстве тонких химикатов и других важных для промышленности соединений (см., например, Заявки на патент США No. 2013/0340119, 2013/0005012 и 2005/0260724, и WO 2012/122333).

Фармацевтические и другие композиции:

[0151] Настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам LDC, пригодным для использования в фармацевтических и других композициях, таких как диетические/пищевые добавки.

[0152] В зависимости от способа введения эти композиции, содержащие терапевтически эффективное количество сконструированной LDC согласно изобретению, находятся в твердой, полутвердой или жидкой форме. В некоторых вариантах осуществления композиции включают другие фармацевтически приемлемые компоненты, такие как разбавители, буферы, вспомогательные вещества, соли, эмульгаторы, консерванты, стабилизаторы, наполнители и другие ингредиенты. Подробная информация о способах приготовления и введения хорошо известна в данной области и описана в литературе.

[0153] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC готовят для применения в пероральных фармацевтических композициях. Любой подходящий формат для доставки сконструированных полипептидов LDC находит применение в настоящем изобретении, включая, но не ограничиваясь этим, пилюли, таблетки, гелевые таблетки, капсулы, леденцы, драже, порошки, мягкие гели, золь-гели, гели, эмульсии, имплантаты, пластыри, спреи, мази, линименты, кремы, пасты, желе, лекарственные вещества на вязком носителе, аэрозоли, жевательные резинки, успокаивающие средства, батончики, суспензии (включая, но не ограничиваясь, суспензии на масляной основе, эмульсии масло-в-воде и т. д.), суспензии, сиропы, препараты с контролируемым высвобождением, суппозитории и т. д. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC представлены в формате, подходящем для инъекций (т. е. в составе для инъекций). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC представлены в биосовместимых матрицах, таких как золь-гели, включая золь-гели на основе диоксида кремния (например, оксисилан). В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC инкапсулированы. В некоторых альтернативных вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC инкапсулированы в наноструктуры (например, нанотрубки, нанотрубочки, нанокапсулы или микрокапсулы, микросферы, липосомы и т. д.). Действительно, подразумевается, что настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным составом для доставки и/или средством доставки. Подразумевается, что сконструированные полипептиды LDC вводят любыми подходящими способами, известными в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, парентеральное введение, пероральное, местное, чрескожное, интраназальное, внутриглазное, подболобочное, введение через имплантаты и т. д.

[0154] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC химически модифицированы гликозилированием, пегилированием (т. е. модифицированы полиэтиленгликолем [ПЭГ] или активированным ПЭГ и т. д.) или другими соединениями (см., например, Ikeda, Amino Acids 29:283-287 [2005]; патент

США. No 7531341, 7534595, 7560263 и 7553653; Публикации заявок на Пат. США. No 2013/0039898, 2012/0177722, и т. д.). Действительно, настоящее изобретение не ограничивается каким-либо конкретным способом и/или механизмом доставки.

[0155] В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC представлены в препаратах, содержащих кристаллы фермента, стабилизированные матриксом. В некоторых вариантах осуществления состав содержит сшитый кристаллический сконструированный фермент LDC и полимер с реакционноспособным фрагментом, который прилипает к кристаллам фермента. Настоящее изобретение также относится к сконструированным полипептидам LDC в полимерах.

[0156] В некоторых вариантах осуществления композиции, содержащие сконструированные полипептиды LDC по настоящему изобретению, включают одно или более обычно используемых соединений-носителей, включая, но не ограничиваясь ими, сахара (например, лактозу, сахарозу, маннит и/или сорбит), крахмалы (например, кукурузный, пшеничный, рисовый, картофельный или другой растительный крахмал), целлюлозу (например, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия), камеди (например, аравийскую, трагакантовую, гуаровую и т. д.) и/или белки (например, желатин коллаген и т. д.). Дополнительные компоненты в составах для перорального применения могут включать красители и/или подсластители (например, глюкозу, сахарозу и маннит) и смазывающие вещества (например, стеарат магния), а также энтеросолюбильные покрытия (например, метакрилатные полимеры, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы и/или любое другое подходящее энтеросолюбильное покрытие, известное в данной области техники). В некоторых вариантах осуществления включены дезинтегрирующие или солюбилизующие агенты (например, сшитый поливинилпирролидон, агар, альгиновая кислота или ее соли, такие как альгинат натрия). В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид LDC комбинируют с различными дополнительными компонентами, включая, но не ограничиваясь этим, консерванты, суспендирующие агенты, загустители, смачивающие агенты, спирты, жирные кислоты и/или эмульгаторы, особенно в жидких составах.

[0157] В некоторых вариантах осуществления сконструированный полипептид LDC комбинируют с различными дополнительными компонентами, включая, но не ограничиваясь этим, консерванты, суспендирующие агенты, загустители, смачивающие агенты, спирты, жирные кислоты и/или эмульгаторы, особенно в жидких составах. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC вводят пациентам в комбинации с другими соединениями, используемыми для лечения MSUD, а также с любыми другими подходящими соединениями.

[0158] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к сконструированным полипептидам LDC, подходящим для применения для уменьшения, улучшения или устранения признаков и/или симптомов MSUD. Дозировка

сконструированного(ых) полипептида(ов) LDC, вводимого пациенту, зависит от генотипа пациента, общего состояния пациента и других факторов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления композиции предназначены для однократного или многократного введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления предполагается, что концентрация сконструированного(ых) полипептида(ов) LDC в композиции(ях), вводимой пациенту, достаточна для эффективного лечения, улучшения и/или предотвращения симптомов заболевания. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC вводят в комбинации с другими фармацевтическими и/или диетическими композициями.

Промышленные композиции:

[0159] Предполагается, что сконструированные полипептиды LDC по настоящему изобретению найдут применение в промышленных композициях, включая такие области, как пищевые ароматизаторы (например, в сырах).

[0160] В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC готовят для применения в пищевой и/или кормовой промышленности. В некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC готовят в виде гранулированных или пеллетированных продуктов, которые смешивают с компонентами корма для животных, такими как дополнительные ферменты (например, целлюлазы, лакказы и амилазы). В некоторых альтернативных вариантах осуществления сконструированные полипептиды LDC используют в жидких кормовых композициях для животных (например, суспензиях на водной или масляной основе). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сконструированные варианты LDC по настоящему изобретению являются достаточно термоустойчивыми и термостабильными, чтобы выдерживать обработку, используемую для производства гранул и других переработанных кормов/пищевых продуктов.

[0161] Вышеизложенные и другие аспекты изобретения могут быть лучше поняты в связи со следующими неограничивающими примерами. Примеры представлены только в иллюстративных целях и никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

[0162] Следующие примеры, включая эксперименты и полученные результаты, представлены только в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

[0163] В приведенном ниже экспериментальном описании применяются следующие сокращения: ppm (частей на миллион); M (моль); mM (миллимоль), μ M и μ M (микромоль); nM (наномоль); mol (моль); gm и g (грамм); mg (миллиграмм); μ g и μ g (микрограмм); L и l (литр); ml и mL (миллилитр); cm (сантиметры); mm (миллиметры); μ m и μ m (микрометры); sec. (секунды); min(s) (минут(ы)); h(s) и hr(s) (час(ы)); U (ед.); MW (молекулярная масса); rpm (обороты в минуту); psi и PSI (фунты на квадратный дюйм); °C (градусы Цельсия); RT и rt (комнатная температура); CDS (кодирующая

последовательность); ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота); РНК (рибонуклеиновая кислота); AUC (площадь под кривой); *E. coli* W3110 (обычно используемый лабораторный штамм *E. coli*, доступный в Coli Genetic Stock Center [CGSC], New Haven, CT); iMSUD (промежуточная болезнь кленового сиропа); НТР (высокая пропускная способность); HPLC (жидкостная хроматография высокого давления); LC (жидкостная хроматография); MS (масс-спектрометрия); LC-MS/MS (жидкостная хроматография с двумя масс-спектрометрами); SPE (твердофазная экстракция); KIC (кетоизокапроат); IPTG (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид); PLP (пиридоксаль-5'-фосфат); BSA (бычий сывороточный альбумин); BW (масса тела); MSUD (болезнь кленового сиропа); FIOPC (кратное улучшение по сравнению с положительным контролем); LB (бульон Лурия); TB (среда TB); Innovative Research (Innovative Research, Novi, MI); Microfluidics (Microfluidics Corp., Ньютон, Массачусетс); Thermotron (Термотрон, Голландия, Мичиган); Waters (Waters Corp., Милфорд, Массачусетс); Infors (Infors AG, Боттминген, Швейцария); Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Тьюксбери, Массачусетс); Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури); Applied Biosystems (Applied Biosystems, часть Life Technologies, Corp., Гранд-Айленд, Нью-Йорк), Agilent (Agilent Technologies, Inc., Санта-Клара, Калифорния); Thermo Scientific (часть Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс); Gibco (часть Gibco Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс); Khuner (Khunter Shaker, Inc., Санта-Клара, Калифорния); BN Labs (British Nutritions, LLC, Ирвин, Калифорния); Программное обеспечение GraphPad (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния); и Corning (Corning, Inc., Пало-Альто, Калифорния).

ПРИМЕР 1

Синтез и анализ ферментов декарбоксилазы аминокислот с

Активностью Лейциндекарбоксилазы

[0164] В этом примере описаны способы, используемые в синтезе и анализе ферментов декарбоксилазы аминокислот на активность лейциндекарбоксилазы (LDC).

Приобретение гена аминокислотной декарбоксилазы и создание экспрессирующих векторов

[0165] Полинуклеотидные последовательности, кодирующие декарбоксилазы аминокислот *Streptomyces* sp. GP55 (SEQ ID NO: 2; Acc. No. WP_101384472.1), *Saccharothrix* sp. ST-888 (SEQ ID NO: 4; Acc. No. WP_052681825.1) и *Kitasatospora* sp. MBT63 (SEQ ID NO: 6; Acc. No. WP_051812394.1), *Kitasatospora* sp. MMS61-BH015 (SEQ ID NO: 8; Acc. No. WP_104818078.1), *Streptomyces* sp. NRRL F-6131 (SEQ ID NO: 10; Acc. No. WP_051769113.1), бактерия *Planctomycetaceae* (SEQ ID NO: 12; Acc. No. RPI63066.1) и *Larkinella arboricola* (SEQ ID NO: 14; Acc. No. A0A327WPB0) были синтезированы в виде генов SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 и 13, соответственно. Эти синтетические гены клонировали в векторную систему pCK110900 (см., например, патент США No. 7629157 и публикацию заявки на патент США № 2016/0244787, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки), и впоследствии экспрессированы в штамме *E.*

coli, полученном из W3110. В некоторых вариантах осуществления находят применение экспрессирующие векторы, не содержащие маркеров устойчивости к противомикробным препаратам.

Производство порошков для встряхиваемых флаконов (SFP)

[0166] E. coli, трансформированные плазмидами, содержащими аминокислотные декарбоксилазы, высевали на чашки с агаром с бульоном Лурия с 1% глюкозой и, в некоторых случаях, с 30 мкг/мл хлорамфеникола, и выращивали в течение ночи при 37°C. Одну колонию из каждой культуры переносили в 5 мл бульона Лурия (LB) с 1% глюкозой и 30 мкг/мл хлорамфеникола, где это необходимо. Культуры выращивали в течение 18 ч при 30°C, 250 об/мин и пересеивали приблизительно 1:50 в 250 мл бульона Terrific (TB) с 30 мкг/мл хлорамфеникола. Культуры выращивали в течение примерно 3-4 ч при 30°C, 250 об/мин до OD₆₀₀ 0,6-0,8 и индуцировали с помощью 1 mM IPTG. Культуры выращивали в течение 20 ч при 30°C, 250 об/мин. Клетки собирали центрифугированием (7000 об/мин x 10 мин, 4°C) и удаляли супернатант. Осадки ресуспендировали в 30 мл 50 mM фосфата натрия, pH 7, с 1 mM PLP и лизировали с использованием однократного пропускания через микрофлюидайзер (Microfluidics) при 110 фунт/кв.дюйм. Лизат осаждали (10 000 об/мин, 30 мин, 4°C), полученный супернатант замораживали и лиофилизировали для получения порошка, содержащего экспрессированный фермент.

Анализ характеристик SFP на активность декарбоксилазы на лейцине при различных pH

[0167] Порошки во встряхиваемых колбах восстанавливали для получения порошка с концентрацией 40 г/л и серийно разбавляли до 2,5-40 г/л. Затем 25 мкл этих растворов добавляли к 75 мкл реакционной смеси для получения конечной концентрации 10 mM лейцина и 0,1 mM PLP в 50 mM фосфата натрия, pH 7, или в буфере Макилвейна, pH 4,6. Реакции инкубировали в течение 3-4 ч при 37°C при 250 об/мин в шейкере для титровальных планшетов THERMOTRON® перед гашением 3 объемами ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой. Полученные образцы центрифугировали в течение 10 минут при 4°C при 4000 об/мин, после чего супернатант анализировали с помощью LC-MS/MS на наличие изопентиламина, продукта декарбоксилирования лейцина. Пример прибора LC-MS/MS и параметры показаны в Таблице 1-1, а результаты для SEQ ID NO: 2-14 показаны в Таблице 1-2.

Таблица 1-1 HPLC-MS/MS Анализ изопентиламина	
Прибор	Agilent ВЭЖХ 1200, Sciex 4000 QTrap
Колонка	ZORBAX® Eclipse Plus C18, 4,6×50 мм, 1,8 μм с ZORBAX® Eclipse Plus C18, 4,6×5 мм, 1,8 μм предколонка (Agilent)
Подвижная фаза	Градиент (А: 0,1% муравьиная кислота в воде, В: 0.1% муравьиная кислота в ацетонитриле) <u>%В</u> 80 60 60 5

2,60	5
2,80	80
3,20	80
Скорость потока	0,5 мл/м
Рабочее время	3,2 м
Пиковое время удержания	Изопентиламин: 0,99 м
Температура колонки	40 °C
Объем инъекции	10 µL
MS детектирования	MRM 88.1/77.1 (для изопентиламина)
MS условия	MODE: MRM; CUR: 20; IS: 4500; CAD: med; TEM: 550 °C; GS1: 40; GS2: 40; DP: 61; EP: 10; CXP: 3; DT: 100 мс для каждого перехода; CE: 11.

Анализ характеристик SFP на устойчивость к pH

[0168] Чтобы оценить относительную толерантность ферментов к кислому pH, SFP восстанавливали для получения порошка с концентрацией 20 г/л и разбавляли в 2 раза буфером Макилвейна, pH 2,8-8. Смесь инкубировали в течение 1,5 ч при 37°C при 250 об/мин в шейкере для титровальных планшетов THERMOTRON®. После инкубации 20 мкл растворов фермента добавляли к 90 мкл реакционной смеси до конечной концентрации 5 мМ лейцина в 50 мМ фосфата натрия, pH 7. Реакции инкубировали в течение 2 ч при 37°C при 250 об/мин на шейкере для титровальных планшетов THERMOTRON®, затем разбавляли в 2 раза водой и гасили 3 объемами ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой. Полученные образцы обрабатывали, как описано выше, и супернатант анализировали с помощью LC-MS/MS на содержание изопентиламина. Результаты, полученные для SEQ ID NO: 2-14, показаны в Таблице 1-2.

Анализ характеристик SFP на термостабильность

[0169] Улучшенная термостабильность является ценным свойством, полезным при производстве и хранении ферментных терапевтических средств, и часто возникает как побочный продукт других усилий по стабилизации. Для оценки относительной стабильности вариантов, полученных при разработке настоящего изобретения, термостабильность ферментов оценивали следующим образом: 100 мкл SFP декарбоксилазы аминокислотной в концентрации 10 г/л инкубировали в течение 1,5 ч при 30-70°C в термоциклере. После инкубации образцы кратковременно центрифугировали и 10 мкл термообработанного SFP добавляли к 90 мкл реакционной смеси до конечной концентрации 5 мМ лейцина в 50 мМ фосфата натрия, pH 7. Реакции инкубировали в течение 2 ч при 37°C при 250 об/мин в титровальном планшете THERMOTRON® и обрабатывали и анализировали с помощью LC-MS/MS, как описано выше. Результаты для SEQ ID NO: 2-14 показаны в Таблице 1-2.

Анализ характеристик SFP на устойчивость к протеазам

[0170] Для оценки относительной стабильности ферментов к репрезентативным кишечным протеазам смесь свиного трипсина (Sigma Aldrich) и бычьего химотрипсина (Sigma Aldrich) растворяли в 50 мМ фосфата натрия, pH 7, до концентрации 3 г/л каждого и последовательно разбавляли в 2 раза. Затем 10 г/л SFP декарбоксилазы аминокислот инкубировали с 0-1,5 г/л трипсина/химотрипсина при 37°C в течение 1 часа при 250

об/мин в шейкере для титровальных планшетов THERMOTRON®. После инкубации 10 мкл обработанного протеазой SFP добавляли к 90 мкл реакционной смеси до конечной концентрации 3 мМ лейцина в 50 мМ фосфата натрия, pH 7. Реакции инкубировали в течение 1 ч при 37°C при 250 об/мин в титровальном планшете THERMOTRON®, затем разбавляли в 5 раз водой и гасили 3 объемами ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой. Полученные образцы обрабатывали, как описано выше, и супернатант анализировали с помощью LC-MS/MS, как описано выше. Результаты для SEQ ID NO: 2 и 12 показаны в Таблице 1-2.

Таблица 1-2. Активность декарбоксилаз аминокислот дикого типа Протестировано в различных условиях¹					
SEQ ID NO: (нт/ак)	pH 7 активн ость	pH 4.6 активн ость	pH Стабильность (% остаточная активность при pH 4)	термостабильн ость (%остаточная активность при 50°C)	Стабильность при воздействии протеаз (%остаточная активность после 0,25 г/л протеазы)
1/2	+++	+++	+++	+++	++
3/4	+++	+	++++	++	
5/6	+++	++	++	+++	
7/8	++	+	++	+++	
9/10	+++	+	++	++	
11/12	+++	+++	++	++++	++
13/14	+++	++	+	+++	
¹ pH 4 и pH 7 активности определяли в единицах площади пика изопентила и представлены ниже: «+»=2.5E05-5E05; «++» > 5E05; и «+++» > 1E06. pH стабильность, термостабильность и стабильность к воздействию протеаз представлены в виде % остаточной активности со значениями, определенными как: «+»=1-10%; «++»> 10%; «+++»> 50%; и «++++» > 80%.					

ПРИМЕР 2

Варианты LDC SEQ ID NO: 12

[0171] В этом примере описаны эксперименты по эволюции и скринингу вариантов LDC, полученных из SEQ ID NO: 12, на улучшенную лейциновую активность, устойчивость к низкому pH и устойчивость к протеазам. Направленную эволюцию LDC, кодируемой SEQ ID NO: 11, осуществляли путем конструирования библиотек вариантных генов. Затем эти библиотеки высевали, выращивали и подвергали скринингу с использованием методов, описанных ниже.

Высокопроизводительный (HTP) рост культур, экспрессирующих ферменты LDC

[0172] Трансформированные клетки E. coli отбирали путем посева на чашки с агаром LB, содержащим 1% глюкозы. После инкубации в течение ночи при 37°C колонии собирали на 96-луночные плоскодонные планшеты NUNC™ (Thermo-Scientific), заполненные 180 мкл/лунку среды LB с добавлением 1% глюкозы. Культурам давали расти в течение ночи в течение 18-20 часов в шейкере Kuhner (200 об/мин, 30°C и относительная влажность 85%). Образцы после ночного роста (20 мкл) переносили в 96-

луночные планшеты COSTAR® (Corning), заполненные 380 мкл ТВ. Культуры инкубировали в течение 2-3 часов на шейкере Kuhner (250 об/мин, 30°C и относительная влажность 85%), а затем индуцировали 40 мкл 10 mM IPTG в стерильной воде и инкубировали в течение ночи в течение 20-24 часов на шейкере Khuner (250 об/мин, 30°C, относительная влажность 85%). Клетки осаждали (4000 об/мин x 10 мин), супернатанты отбрасывали и перед анализом клетки замораживали при -80°C.

Лизис НТР клеточных осадков

[0173] E. coli лизировали 400 мкл лизирующего буфера (1 мг/мл лизоцима+0,5 г/л PMBS в 50 mM фосфата натрия, pH 7). Смесь перемешивали в течение 1,5 ч при комнатной температуре и осаждали (4000 об/мин x 10 мин), после чего осветленные лизаты предварительно инкубировали в течение 1 ч при 60°C в шейкере для титровальных планшетов THERMOTRON® (400 об/мин). Лизаты, подвергнутые тепловой обработке, осаждали (4000 об/мин x 10 мин), а супернатанты использовали в анализах НТР.

НТР Анализ активности осветленных лизатов, предварительно обработанных кислым буфером и протеазой

[0174] Термообработанные лизаты, содержащие варианты LDC, подвергали воздействию кислого буфера для имитации желудочной среды. Сначала термообработанный осветленный лизат предварительно инкубировали 1:1 с буфером McIlvaine, pH 3,6, в 96-луночных круглодонных планшетах COSTAR® (Corning). Планшеты запечатывали и инкубировали в течение 1 ч при 37°C в шейкере для титровальных планшетов THERMOTRON® (250 об/мин). Затем полученный лизат, обработанный кислым буфером, предварительно инкубировали 1:1 с конечной концентрацией трипсина 0,02 г/л и химотрипсина (1:1) в течение 1 ч при 37°C при встряхивании. После инкубации полученные образцы центрифугировали и 50 мкл образца добавляли к 50 мкл реакционной смеси до конечной концентрации 3 mM лейцина и 10 мкМ PLP в 50 mM фосфате натрия, pH 7. В некоторых экспериментах использовали реакционную смесь с конечной концентрацией 0,6-3 mM всех двадцати аминокислот с изолейцином-d10 (Cambridge Isotope Laboratories) вместо изолейцина и 10 мкМ PLP в 50 mM фосфата натрия, pH 7. Реакции инкубировали в течение 1 ч при 37°C при 250 об/мин в титровальном планшете THERMOTRON®, затем гасили 3 объемами ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой, центрифугировали в течение 10 мин при 4°C при 4000 об/мин и разводили в 50 раз в воде. Полученные образцы анализировали с помощью LC-MS/MS, как описано в Примере 1. Результаты этих анализов показаны в Таблице 2-1.

Таблица 2-1. Относительная активность вариантов LeuDC, протестированных в различных условиях
(Относительно SEQ ID NO: 12)¹

SEQ ID NO: (нт/ак)	Аминокислотные различия (Относительно SEQ ID NO: 12)	Leu FIOP (Относительн о SEQ ID NO: 12)	AK Микс. FIOP (Относительн о SEQ ID NO: 12)
--------------------	--	--	---

**Таблица 2-1. Относительная активность вариантов LeuDC, протестированных в различных условиях
(Относительно SEQ ID NO: 12)¹**

SEQ ID NO: (нт/ак)	Амнокислотные различия (Относительно SEQ ID NO: 12)	Leu FIOP (Относительн о SEQ ID NO: 12)	АК Микс. FIOP (Относительн о SEQ ID NO: 12)
15/16	I34L/C38V/T39N/T127S/I245M/N350E/I357V	+++	++
17/18	T39N/T102S/I264V/T275S/I357V	+++	+++
19/20	I34L/C38V/T39N/T102S/T275S/I357V	+++	++
21/22	T39N/I245M/I264V/V267I/T275S/I357V	+++	++
23/24	C38V/T39N/T127S/I264V/T275S	+++	++
25/26	T39N/T127S/I245M/I357V	+++	++
27/28	I34L/T39N/T275S/V349T/N350E/I357V	++++	++
29/30	T39N/T127S/I245M/I264V/T275S/N350E/I357V	++++	++
31/32	C38V/T39N/T102S/T127S/I264V/V267I/N350E/I357V	++++	+++
33/34	T39N/T275S/N350E/I357V	++++	++
35/36	C38V/T39N/I245M/T275S/I357V	+++	++
37/38	H14T/T39N/T102S/T127S/I245M/V267I/T275S/V349T/N350E	++++	++
39/40	H14T/I34L/C38V/T39N/T102S/V267I/T275S/N350E/I357V	++++	+++
41/42	C38V/T39N/I264V/V267I/T275S/N350E	+++	++
43/44	C38V/T39N/T127S/I264V/N350E/I357V	+++	++
45/46	C38V/T39N/T102S/T127S/N350E	+++	++
47/48	I34L/C38V/T39N/T102S/T127S/T275S/I357V	+++	+++
49/50	T39N/T102S/T127S/I264V/T275S/I357V	+++	+++
51/52	C38V/T39N/T127S/N350E/I357V	++++	++
53/54	I34L/T39N/T102S/T127S/I264V/T275S/I357V	+++	++
55/56	C38V/T39N/T275S/N350E	+++	++
57/58	C38V/T39N/T127S/I245M/V267I/I357V	+++	++
59/60	C38V/T39N/T102S/T127S/V267I/T275S/V349T/N350E/I357V	++++	+++
61/62	C38V/T39N/T275S	+++	++
63/64	T39N/T127S/V267I/T275S/N350E/I357V	+++	++
65/66	T39N/T127S/V267I/N350E/I357V	+++	++
67/68	I34L/C38V/T39N/T127S/I245M/V349T/N350E/I357V	+++	++
69/70	I34L/T39N/T102S/T127S/T275S/V349T/I357V	+++	++
71/72	C38V/T39N/T127S/I357V	+++	++
73/74	I34L/T39N/T102S/I264V/T275S/N350E/I357V	+++	++
75/76	C38V/T39N/T102S/T127S/N350E/I357V	++++	+++
77/78	C38V/T39N/T102S/T127S/V349T/N350E/I357V	++++	++

**Таблица 2-1. Относительная активность вариантов LeuDC, протестированных в различных условиях
(Относительно SEQ ID NO: 12)¹**

SEQ ID NO: (нт/ак)	Амнокислотные различия (Относительно SEQ ID NO: 12)	Leu FIOP (Относительно о SEQ ID NO: 12)	АК Микс. FIOP (Относительно о SEQ ID NO: 12)
79/80	T39N/I264V/V267I/T275S/N350E	++++	++
81/82	T39N/T127S/I357V	+++	++
83/84	T39N/T127S/I245M/I264V/V267I/T275S/N350E	++++	++
85/86	C38V/T39N/I264V/T275S/I357V	+++	++
87/88	T39N/T102S/V267I/T275S/I357V	+++	++
89/90	R395D	++	++
91/92	T397A	++	++
93/94	T39S	++	++
95/96	P398*	++	++
97/98	K389G	++	++
99/100	K389Q	++	+
101/102	L48F	++	++
103/104	T405L	++	+
105/106	A391*	++	++
107/108	H343E	++	++
109/110	K393T	++	++
111/112	K299A	++	++
113/114	H14I	++	+
115/116	K394E	++	+
117/118	A391E	++	++
119/120	K196R	++	++
121/122	H255G	++	+
123/124	K5M	++	+
125/126	K196D	++	++
127/128	R395K	++	++
129/130	H343A	++	+

Таблица 2-1. Относительная активность вариантов LeuDC, протестированных в различных условиях (Относительно SEQ ID NO: 12)¹			
SEQ ID NO: (нт/ак)	Амнокислотные различия (Относительно SEQ ID NO: 12)	Leu FIOP (Относительно SEQ ID NO: 12)	АК Микс. FIOP (Относительно SEQ ID NO: 12)
131/13 2	R324M	++	++
133/13 4	R353E	++	+
135/13 6	L364R	++	++
137/13 8	K389E	++	+
139/14 0	N350S	++	+
141/14 2	I164C	++	+
143/14 4	R395A	++	++
145/14 6	H255P	++	++
147/14 8	I164A	++	++
149/15 0	K389P	+	+
151/15 2	K379D	++	++
153/15 4	H255N	+	+
155/15 6	Q365E	++	++
157/15 8	Q339D	++	++
159/16 0	T405H	++	++
161/16 2	A381D	++	++
163/16 4	I357C	++	+
165/16 6	T405E	++	+
167/16 8	T405D	++	++
169/17 0	R353W	++	++
171/17 2	R324T	++	++

Таблица 2-1. Относительная активность вариантов LeuDC, протестированных в различных условиях (Относительно SEQ ID NO: 12)¹			
SEQ ID NO: (нт/ак)	Амнокислотные различия (Относительно SEQ ID NO: 12)	Leu FIOP (Относительно SEQ ID NO: 12)	АК Микс. FIOP (Относительно SEQ ID NO: 12)
173/174	A381E	++	+
175/176	N139G	+	++
177/178	K299V	+	++
179/180	K379P	+	++
181/182	Q339A	++	++
183/184	R324S	++	++
185/186	R353D	++	++
187/188	L364K	++	++
189/190	R395G	++	++
191/192	R353S	++	+
193/194	R395S	++	+
195/196	I357M	++	+
197/198	D386*	++	++
199/200	R353N	++	++
201/202	R353L	++	+
203/204	R318K	++	++
¹ Все активности определяли относительно эталонного полипептида SEQ ID NO: 12. Уровни повышенной активности определяются следующим образом: «+»=0,9-1,1; «++» > 1.1; «+++» > 3;и «++++» > 5.			

ПРИМЕР 3

Варианты LDC SEQ ID NO: 38

[0175] В этом примере описаны эксперименты по эволюции и скринингу вариантов LDC, полученных из SEQ ID NO: 38, на улучшенную лейциновую активность, устойчивость к низкому pH и устойчивость к протеазам. Направленную эволюцию LDC,

кодируемой SEQ ID NO: 38, осуществляли путем конструирования библиотек вариантных генов. Затем эти библиотеки высевали, выращивали и подвергали скринингу с использованием методов, описанных ниже.

НТР Анализ активности осветленных лизатов, предварительно обработанных кислым буфером и протеазой

[0176] Рост НТР и лизис клеток *E. coli*, экспрессирующих варианты LDC, проводили, как описано в Примере 2. Термообработанные лизаты, содержащие варианты LDC, инъецировали кислым буфером, как описано в Примере 2. Затем лизат, обработанный кислым буфером, предварительно инкубировали 1:1 с конечной концентрацией трипсина 0,1 г/л и химотрипсина (1:1) в течение 1 ч при 37°C при встряхивании. После инкубации образцы центрифугировали и 50 мкл образца добавляли к 50 мкл реакционной смеси до конечной концентрации 3 мМ лейцина и 10 мкМ PLP в 50 мМ фосфате натрия, pH 7. В некоторых экспериментах использовали реакционную смесь с конечной концентрацией 0,6-3 мМ всех двадцати аминокислот с изолейцином-d10 (Cambridge Isotope Laboratories) вместо изолейцина и 10 мкМ PLP в 50 мМ фосфата натрия, pH 7. Реакции инкубировали в течение 1 ч при 37°C при 250 об/мин в титровальном планшете THERMOTRON®, затем гасили 3 объемами ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой, центрифугировали в течение 10 мин при 4°C при 4000 об/мин и разводили в 50 раз в воде. Полученные образцы анализировали с помощью LC-MS/MS, как описано в Примере 1, или с помощью масс-спектрометрии RAPIDFIRE® (Agilent) с использованием параметров, показанных в Таблице 3-1. Результаты этих анализов показаны в Таблице 3-2.

Таблица 3-1. Agilent RAPIDFIRE® SPE-MS/MS Условия для детектирования изопентиламина	
Буфер А	0,1% муравьиная кислота в воде класса LC-MS; 1,5 мл/мин скорость потока (насос 1)
Буфер В	100% ацетонитрил класса LC-MS; 1,25мл/мин скорость потока (Pumps 2 & 3)
Водная промывка	Вода
Органическая промывка	Ацетонитрил
SPE картридж	Agilent RAPIDFIRE® картридж D (Hypercarb)
RF состояние 1	600 мс
RF состояние 2	3000 мс
RF состояние 3	0
RF состояние 4	6000 мс
RF состояние 5	1000 мс
Agilent Jet Параметры источника потока	
Температура осушительного газа	225 °C
Поток осушительного газа	9 л/мин
Давление	40 ps

Таблица 3-1. Agilent RAPIDFIRE® SPE-MS/MS Условия для детектирования изопентиламина						
распылителя						
Температура газа оболочки	200 °C					
Поток газа оболочки	8л/мин					
Капиллярное напряжение	+1500 В					
Напряжение сопла	+1000 В					
Agilent 6470 трехквадрупольная Параметры MRM						
Соединение	Q1	Q3	Dwell	Фрагментор	CE	CA V
Изопентиламин	88,1	43,3	165	50	12	4
Изопентиламин	88,1	71,2	165	50	6	4
Таблица 3-2. Относительная активность вариантов LeuDC, протестированных в различных условиях (Относительно SEQ ID NO: 38) ¹						
SEQ ID NO: (нт/ак)	Аминокислотные различия (Относительно SEQ ID NO: 38)		Leu FIOP (Относительн о SEQ ID NO: 38)	AA Mix FIOP (Относительн о SEQ ID NO: 38)		
205/206	I164A/R324M/I357C/L364K		++	+++		
207/208	I164A/R353W/I357C/L364R		++	+++		
209/210	A64E/R318K/R324S/I357V/L364R		++	+++		
211/212	R318K/H343E/I357M		++	+++		
213/214	R324N/R353W/I357C/L364K		++	+++		
215/216	L48F/A64E/I357M/L364K		++	+++		
217/218	A64E/R324M/R353N/I357C/L364R		++	++		
219/220	I164C/R353W/I357C/L364R		++	+++		
221/222	A64E/I164C/R353D/I357V		++	+++		
223/224	I164C/R324M/H343E/R353D/I357V/L364R		++	+++		
225/226	R318K/H343E/I357C		++	++		
227/228	I164A/L364R		++	+++		
229/230	L48F/A64E/I164A/R324M/H343E/L364R		++	+++		
231/232	I164C/R318K/R324S/I357V/L364R		+++	++++		

Таблица 3-1. Agilent RAPIDFIRE® SPE-MS/MS Условия для детектирования изопентиламина			
233/234	I164A/R324M/H343E/R353D/I357C/L364R	++	++++
235/236	L48F/A64E/I164A/R324M/H343E/R353E/I357C/L364K	++	+++
237/238	R324M/I357M/L364R	++	+++
239/240	I164A/R318K/R324M/H343E/R353E/I357C	++	+++
241/242	I164C/R353D/I357V/L364R	++	++++
243/244	A64E/I164A/R324M/H343E/R353D/I357V/L364K	++	++++
245/246	L48F/A64E/I164C/R353N/I357V/L364R	++	+++
247/248	R324M/H343E/I357V/L364K	++	+++
249/250	I164C/R353D/I357V/L364K	++	+++
251/252	I357V/L364R	++	+++
253/254	I164A/K196D/R324M/I357C/L364K	++	+++
255/256	K196D/R318K/R324M/R353N/I357C/L364K	++	+++
257/258	A64E/I164A/R324M/H343E/I357C/L364R	++	+++
259/260	K389G/K394E/R395D/T397A/T405D	+++	+++
261/262	Y132F/H255P/Q339A/K379D/R395D	++	++
263/264	K379D/D386*	++	+++
265/266	Q339A/A391*	++	++
267/268	Q339A/K389G/R395K	++	++
269/270	K379D/K394E/R395D/T397A/R404I/T405H	++	++
271/272	K379D/K394E/R395K/T397A/T405D	++	++
273/274	Q339A/K394E/R395K/T405D	++	++
275/276	K394E/T397A	++	++
277/278	Q339A/K379D/K389G/K394E/R395D	++	+++
¹ Все активности определяли относительно эталонного полипептида SEQ ID NO: 38. Уровни повышенной активности определяются следующим образом: «+»=0.9-1.1; «++» > 1.1; «+++» > 1.5; и «++++» > 2.			

ПРИМЕР 4

Варианты LDC SEQ ID NO: 234

[0177] В этом примере описаны эксперименты по эволюции и скринингу вариантов LDC, полученных из SEQ ID NO: 234, на улучшенную лейциновую активность, устойчивость к низкому pH и устойчивость к протеазам. Направленную эволюцию LDC, кодируемой SEQ ID NO: 234, осуществляли путем конструирования библиотек вариантных генов. Затем эти библиотеки высевали, выращивали и подвергали скринингу с использованием методов, описанных ниже.

НТР Анализ активности осветленных лизатов, предварительно обработанных кислым буфером и протеазой

[0178] Рост НТР и лизис клеток *E. coli*, экспрессирующих варианты LDC, проводили, как описано в Примере 2. Термообработанные лизаты, содержащие варианты LDC, инъецировали кислым буфером, как описано в Примере 2, при следующих условиях: термообработанный осветленный лизат предварительно инкубировали 1:1 с буфером Макилвейна, pH 3,3. Затем полученный лизат, обработанный кислым буфером, предварительно инкубировали 1:1 с конечной концентрацией трипсина 0,5 г/л и химотрипсина (1:1) в течение 1 ч при 37°C при встряхивании. После инкубации образцы центрифугировали и 40 мкл образца добавляли к 60 мкл реакционной смеси до конечной концентрации 3 mM лейцина и 10 мкМ PLP в 50 mM фосфате натрия, pH 7. В некоторых экспериментах использовали реакционную смесь с конечной концентрацией 0,6-3 mM всех двадцати аминокислот с изолеином-d10 (Cambridge Isotope Laboratories) вместо изолейцина и 10 мкМ PLP в 50 mM фосфата натрия, pH 7. Реакции инкубировали в течение 1 ч при 37°C при 250 об/мин в титровальном планшете THERMOTRON®, затем гасили 3 объемами ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой, центрифугировали в течение 10 мин при 4°C при 4000 об/мин и разбавляли 10 или 500 раз в воде. Полученные образцы анализировали с помощью LC-MS/MS, как описано в Примере 1, или с помощью RAPIDFIRE®-MS, как описано в Примере 3.

Таблица 4-1. Относительная активность вариантов LeuDC, протестированных в различных условиях (Относительно SEQ ID NO: 234)¹

SEQ ID NO: (нт/ак)	Аминокислотные различия (Относительно SEQ ID NO: 234)	Leu FIOP (Относительно SEQ ID NO: 234)	AA Mix FIOP (Относительно SEQ ID NO: 234)
279/280	R318K/Q339A/K379D	++	++
281/282	A64E/H255P	++	+
283/284	L48F/A64E/H255P	++	+
285/286	H255P	++	++
287/288	T405H	++	++
289/290	H255P/R318K/K379D	++	++
291/292	L48F/H255P/K379D	++	++
293/294	A64E	++	+

295/296	Q339A	++	+
297/298	L48F/H255P/Q339A	++	+
299/300	G2E	++	++
301/302	A380E	++	+
303/304	S340V	++	+
305/306	A382S	++	+
307/308	P390A	++	+
309/310	T161V	++	++
311/312	A64S	++	++
313/314	M193I	++	++
315/316	V69I	++	++
317/318	S340T	++	+
319/320	S263V	++	++
321/322	P390E	++	++
323/324	N3M	++	++
325/326	P390*	++	++
327/328	P390S	++	+
329/330	A401*	++	++
331/332	S263T	++	++
333/334	A401Y	++	+
335/336	F33L	++	++
337/338	R259L	++	++
339/340	R395D/T397A	++	++
341/342	K394E	++	++
343/344	T397A	++	++
345/346	R395K	++	++
347/348	M324N/K394E/R395K/T397A	+++	++
349/350	K389G	++	++
351/352	K389G/K394E/R395D	++	++
353/354	K389G/K394E/R395D/T397A	++	++
355/356	M324S/K394E/R395K	++	++
357/358	M324S/K389G/K394E/R395D	+++	++
359/360	K394E/R395D	++	+
361/362	M324S/K394E	++	++
363/364	M324N/R395D	++	++
365/366	K389G/K394E	++	++
367/368	K389G/R395D	++	++
369/370	M324S/R395K	++	+
371/372	M324S/K394E/R395K/T397A	+++	++
373/374	K389G/K394E/R395K/T397A	+++	++
375/376	M324S/K389G/K394E	+++	++
377/378	K389G/R395K	++	++
379/380	K389G/T397A	++	++
381/382	K389G/K394E/R395K	++	++
383/384	M324N	++++	++
385/386	K389G/K394E/T397A	++	++
387/388	M324S/K389G/K394E/T397A	++	++
389/390	K394E/R395K/T397A	++	++

¹ Все активности определяли относительно эталонного полипептида SEQ ID NO: 234. Уровни повышенной активности определяются следующим образом: «+»=0,9-1,1; «++» > 1,1; «+++» > 2; и «++++» > 3.

ПРИМЕР 5

Варианты LDC SEQ ID NO: 284

[0179] В этом примере описаны эксперименты по эволюции и скринингу вариантов LDC, полученных из SEQ ID NO: 284, на улучшенную лейциновую активность, устойчивость к низкому pH и устойчивость к протеазам. Направленную эволюцию LDC, кодируемую SEQ ID NO: 284, осуществляли путем конструирования библиотек вариантных генов. Затем эти библиотеки высевали, выращивали и подвергали скринингу с использованием методов, описанных ниже.

НТР Анализ активности осветленных лизатов, предварительно обработанных кислым буфером, пепсином и протеазой

[0180] Рост НТР и лизис клеток *E. coli*, экспрессирующих варианты LDC, проводили, как описано в Примере 2. Термообработанные лизаты, содержащие варианты LDC, подвергали воздействию кислого буфера, содержащего пепсин, для имитации желудочной среды. Сначала термообработанный осветленный лизат предварительно инкубировали 1:1 с буфером McIlvaine, pH 3,2, содержащим 0,05 г/л пепсина из слизистой оболочки желудка свиньи (Sigma), в 96-луночных круглодонных планшетах COSTAR® (Corning). Планшеты запечатывали и инкубировали в течение 1 ч при 37°C в шейкере для титровальных планшетов THERMOTRON® (250 об/мин). Затем образцы кратковременно центрифугировали, а полученный супернатант предварительно инкубировали 1:1 с конечной концентрацией трипсина 0,5 г/л и химотрипсина (1:1) в течение 1 ч при 37°C при встряхивании. После инкубации 40 мкл образца добавляли к 60 мкл реакционной смеси для получения конечной концентрации 3 мМ лейцина и 10 мкМ PLP в 50 мМ фосфата натрия, pH 7. Реакции инкубировали в течение 1 ч при 37°C при 250 об/мин в титровальном планшете THERMOTRON®, затем гасили 3 объемами ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой, центрифугировали в течение 10 мин при 4°C при 4000 об/мин и разбавляли в 500 раз в воде. Полученные образцы анализировали с помощью RAPIDFIRE®-MS, как описано в Примере 3.

Таблица 5-1. Относительная активность протестированных вариантов LeuDC (Относительно SEQ ID NO: 284)¹

SEQ ID NO: (нт/ак)	Аминокислотные различия (Относительно SEQ ID NO: 284)	Leu FIOP (Относительно SEQ ID NO: 284)
391/392	E64S/V69I/M324S/Q339A/A380E/K389G/P390*	+++
393/394	V69I/S263T/K389G/P390*	+++
395/396	E64S/V69I/Q339A/K389G/P390*	++++
397/398	N3M/E64S/V69I/S263T/Q339A/A380E/Q388A	+++
399/400	N3M/V69I/M324S/A380E/A382S/K389G/P390*	+++
401/402	V69I/Q339A/P390*	+++
403/404	S263T/P390*	+++

405/406	E64S/V69I/K389G	+++
407/408	V69I/S263T	+++
409/410	F48L/E64A/P255H	+++
411/412	V69I/A223M/S263T/M324S/A382S/Q388A/P390*	+++
413/414	V69I/M324S/K379D/A380E/Q388A	+++
415/416	E64S/V69I/T189A/R259Q/S263T/A304R/Q339A/S340T/K379N	++++
417/418	V69I/S263T/Q339A	+++
419/420	N3M/E64S/K379D/A380E/P390*	+++
421/422	E64S/V69I/T189D/R259K/S263T/A304R	+++
423/424	N3M/E64S/V69I/K389G	++++
425/426	E64S/V69I/A223M/Q388A	++++
427/428	S263T/Q339A/K389G/P390*	+++
429/430	V69I/S263T/Q388A	+++
431/432	G2E/E64S/V69I/M324S/A380E/A382S/Q388A/K389G	++++
433/434	E64S/M324S/Q339A/K389G/P390*	+++
435/436	V69I/A223M/M324S/K379D/A380E/A382S/Q388A/P390*	+++
437/438	E64S/V69I/Q339A/A382S/Q388A/K389G	+++
439/440	N3M/E64S/V69I/P390*	++++
441/442	E64S/V69I/P390*	++++
443/444	N3M/V69I/M324S	+++
447/448	E64S/V69I/A223M/Q388A/K389G/P390*	++++
449/450	E64S/S263T	+++
451/452	E64A/P255H/S263T	+++
453/454	V69I/A382S/P390*	+++
455/456	V69I/M324S/A380E	+++
457/458	V69I/S263T/M324S	+++
459/460	E64S/V69I	+++
461/462	E64S/V69I/Q339A	++++
463/464	E64S/V69I/M324S	+++
465/466	N3M/V69I/S263T/A380E	+++
467/468	R259K/S263T/A304R/Q339A/S340T/K379N	+++
469/470	R259K/S263T/A304R	+++
471/472	S12G/R259K/S263T/A304R	+++
473/474	E64S/V69I/K379D/A380E	+++
475/476	S12G/L135V/R259K/S263T	+++
477/478	E64S/V69I/A304R/K379E/A382G	+++
479/480	A304R/S340T/K379D/A380E/A382G	+++
481/482	S12G/L135V/S263T/A382G	+++
483/484	E64S/V69I/A380E/Q388A/P390*	++++
[†] Все активности определяли относительно эталонного полипептида SEQ ID NO: 284. Уровни повышенной активности определяются следующим образом: «+»=0,9-1,1; «++» > 1,1; «+++» > 3; и «++++» > 5.		

ПРИМЕР 6

Варианты LDC SEQ ID NO: 484

[0181] В этом примере описаны эксперименты по эволюции и скринингу вариантов

LDC, полученных из SEQ ID NO: 484, на улучшенную активность лейцина, устойчивость к низкому pH и устойчивость к протеазам. Направленную эволюцию LDC, кодируемую SEQ ID NO: 484, осуществляли путем конструирования библиотек вариантных генов. Затем эти библиотеки высевали, выращивали и подвергали скринингу с использованием методов, описанных ниже.

НТР Анализ активности осветленных лизатов, предварительно обработанных кислым буфером и протеазой

[0182] Рост НТР и лизис клеток *E. coli*, экспрессирующих варианты LDC, проводили, как описано в Примере 2, за исключением того, что буфер для лизиса содержал 40 мкМ PLP. Термообработанные лизаты, содержащие варианты LDC, подвергали воздействию кислого буфера, содержащего пепсин, а затем обрабатывали протеазами, как описано в Примере 5. В частности, термообработанный осветленный лизат преинкубировали 1:1 с конечной концентрацией пепсина 0,375 г/л в буфере McIlvaine, pH 3, в течение 1 ч при 37°C, а полученный супернатант предварительно инкубировали 1:1 с конечной концентрацией пепсина. 0,75 г/л трипсина и химотрипсина (1:1), растворенных в 200 мМ фосфате натрия, pH 8, в течение 1 ч при 37°C. После инкубации 40 мкл образца добавляли к 60 мкл реакционной смеси до конечной концентрации 3 мМ лейцина в 50 мМ фосфата натрия, pH 7. Реакции инкубировали, гасили и анализировали, как описано в Примере 5, за исключением того, что перед анализом с помощью RAPIDFIRE®-MS образцы разбавляли водой в 50 раз. Результаты этих анализов показаны в Таблице 6-1.

Таблица 6-1. Относительная активность протестированных вариантов LeuDC (Относительно SEQ ID NO: 484)¹		
SEQ ID NO: (нт/ак)	Аминокислотные различия (Относительно SEQ ID NO: 484)	ОР сительно SEQ ID 484)
485/486	R259K/A304R	++
487/488	R259K/S263T/A304R	++
489/490	R259K/S263T/A304R/M324S	++
491/492	N3M/R259K/A304R/M324S/Q339A	++
493/494	A304R/M324S	++
495/496	S263T/A304R/M324S	++
497/498	N3M/S263T/A304R/M324S/A382S	++
499/500	S263T/A304R/M324S/A382S	++
501/502	M324S	++
503/504	A382S	++
505/506	R259K/A304R/M324S/Q339A	++
507/508	S263T/M324S	++
509/510	R259K/A304R/M324S	+++
511/512	N3M/R259K/A304R	++
513/514	R259K/S263T/A304R/A382S	++
515/516	N3M/S263T/A304R/M324S	++
517/518	R259K	++
519/520	N3M/A304R/M324S	++
521/522	N3M/R259K/S263T/A304R	++

523/524	S263T/A304R/M324S/Q339A	++
525/526	R259K/S263T/A304R/M324S/A382S	+++
527/528	N3M/R259K/A304R/M324S/A382S	++
529/530	S263T/A304R	++
531/532	N3M/A304R	++
533/534	A304R	++
535/536	R259K/S263T/A304R/K379D	++
537/538	N3M/R259K/A304R/A382S	++
539/540	R259K/A304R/M324S/Q339A/A382S	++
541/542	R259K/S263T	+++
543/544	R259K/A304R/A382S	++
545/546	N3M/S263T/A304R/M324S/Q339A	++
547/548	N3M/F194L/A304R	+++
549/550	C328N	++
551/552	H87R/L270R/Q365E	+
553/554	L270R/C328N/P338S	++
555/556	L270R/C328N/P338S/Q365E	++
557/558	L270R	++
559/560	L270R/I319A	++
561/562	H87R/C328N/Q365E	++
563/564	Q365E	++
565/566	C168K/L270R/C328N/P338S	++
567/568	H87R/L270R	++
569/570	R262G	++
571/572	T181R	++
573/574	H366T	++
575/576	H366Q	++
577/578	E92K	++
579/580	T181V	+
581/582	F194L	+++
583/584	A63C	++
585/586	Y256W	+
587/588	G156A	+
589/590	H366M	++
591/592	R262D	++
593/594	R262T	++++
595/596	R262H	+++
597/598	F194C	++
599/600	D126A	+
601/602	D352A	+
603/604	E201D	+
605/606	R16Q	++
607/608	H366L	++
609/610	R262S	+++
611/612	A80K	++
613/614	H366V	++
615/616	D126T	++
617/618	T181K	++
619/620	A80G	+
621/622	E91A	++

623/624	M140V	+
625/626	H366A	+
627/628	G156S	+
629/630	E77L	+
631/632	E91Q	++
633/634	R262I	+++
635/636	R16V	+
[†] Все активности определяли относительно эталонного полипептида SEQ ID NO: 484. Уровни повышенной активности определяются следующим образом: «+»=0.9-1.1; «++» > 1.1; «+++» > 2; и «++++» > 3.		

ПРИМЕР 7

Варианты LDC SEQ ID NO: 594

[0183] В этом примере описаны эксперименты по эволюции и скринингу вариантов LDC, полученных из SEQ ID NO: 594, на улучшенную лейциновую активность, устойчивость к низкому pH и устойчивость к протеазам. Направленную эволюцию LDC, кодируемую SEQ ID NO: 594, осуществляли путем конструирования библиотек вариантных генов. Затем эти библиотеки высевали, выращивали и подвергали скринингу с использованием методов, описанных ниже.

НТР Анализ активности осветленных лизатов, предварительно обработанных кислым буфером и протеазой

[0184] Рост НТР и лизис клеток *E. coli*, экспрессирующих варианты LDC, проводили, как описано в Примере 2, за исключением того, что буфер для лизиса содержал 40 мкМ PLP. Термообработанные лизаты, содержащие варианты LDC, подвергали воздействию кислого буфера, содержащего пепсин, а затем обрабатывали протеазами, как описано в Примере 5. В частности, термообработанный осветленный лизат преинкубировали 1:1 с конечной концентрацией пепсина 0,2 г/л в буфере Макилвейна, pH 2,8, в течение 1 ч при 37°C, а полученный супернатант предварительно инкубировали 1:1 с конечной концентрацией трипсина 1,5 г/л и химотрипсина (1:1), растворенных в 400 мМ фосфата натрия, pH 8, в течение 1 ч при 37°C. После инкубации 40 мкл образца добавляли к 60 мкл реакционной смеси до конечной концентрации 2,5 мМ лейцина в 50 мМ фосфата натрия, pH 7. Реакции инкубировали, гасили, разбавляли и анализировали, как описано в Примере 6. Результаты этих анализов показаны в Таблице 7-1.

Таблица 7-1. Относительная активность вариантов LeuDC, протестированных при различных условиях (Относительно SEQ ID NO: 594)¹		
SEQ ID NO: (нт/ак)	Аминокислотные различия (Относительно SEQ ID NO: 594)	Leu FIOP (Относительно SEQ ID NO: 594)
637/638	R16Q/M324S/C328N/H366M	++
639/640	R16Q/A63C/A80K/D126T/T181R/F194C/R259K/M324S/C328N/H366M	++

641/642	R16Q/C328N/H366M	++
643/644	A80K/D126T/T181R/L270R/M324S/H366M	++
645/646	R16Q/A80K/M324S	++
647/648	R16Q/A80K/D126T/M324S/H366M	++
649/650	R16Q/D126T/C168K/H366M	++
651/652	R16Q/C168K/H366M	++
653/654	A80K/D126T/C168K/L270R/H366M	+++
655/656	R16Q/C168K/M324S/C328N/H366M	++
657/658	R16Q/C168K/M324S/H366M	++
659/660	R16Q/R259K/S263T/C328N	++
661/662	R16Q/A80K/D126T/H366M	++
663/664	C168K/H366M	++
665/666	R16Q/A80K/C168K	++
667/668	R16Q/A80K/C168K/L270R/H366M	+++
669/670	R16Q/A63C/A80K/D126T/C168K/H366M	++
671/672	R16Q/E91A/D126T/C168K/M324S/H366M	++
673/674	R16Q/A63C/D126T/C168K/L270R/C328N/H366M	++
675/676	A80K/D126T/C168K/H366M	++
677/678	R16Q/A80K/C168K/H366M	++
679/680	R16Q/A80K/C168K/M324S	++
681/682	R16Q/C168K/L270R/M324S/H366M	++
683/684	A80K/C168K/L270R/H366M	++
685/686	R16Q/C168K/R259K/H366M	++
[†] Все активности определяли относительно эталонного полипептида SEQ ID NO: 594. Уровни повышенной активности определяются следующим образом: «+»=0,9-1,1; «++» > 1,1; «+++» > 2; и «++++» > 3.		

ПРИМЕР 8

Варианты LDC SEQ ID NO: 686

[0185] В этом примере описаны эксперименты по эволюции и скринингу вариантов LDC, полученных из SEQ ID NO: 686, на улучшенную лейциновую активность, устойчивость к низкому pH и устойчивость к протеазам. Направленную эволюцию LDC, кодируемую SEQ ID NO: 686, осуществляли путем конструирования библиотек вариантных генов. Затем эти библиотеки высевали, выращивали и подвергали скринингу с использованием методов, описанных ниже.

НТР Анализ активности осветленных лизатов, предварительно обработанных кислым буфером и протеазой

[0186] Рост НТР и лизис клеток *E. coli*, экспрессирующих варианты LDC, проводили, как описано в Примере 2, за исключением того, что буфер для лизиса содержал 40 мкМ PLP. Термообработанные лизаты, содержащие варианты LDC, подвергали воздействию кислого буфера, содержащего пепсин, а затем обрабатывали протеазами, как описано в Примере 5. В частности, термообработанный осветленный лизат преинкубировали 1:1 с конечной концентрацией пепсина 0,4 г/л в буфере McIlvaine, pH 2,8, в течение 1-1,5 ч при 37°C, а полученный супернатант предварительно инкубировали 1:1 с конечная концентрация 2-4 г/л трипсина и 1,5 г/л химотрипсина, растворенных в 400 мМ фосфата натрия, pH 8, в течение 1-2 ч при 37°C. После инкубации

40 мкл образца добавляли к 60 мкл реакционной смеси до конечной концентрации 2,5 мМ лейцина в 50 мМ фосфата натрия, pH 7. В некоторых экспериментах использовали реакционную смесь, дающую конечную концентрацию 2,5 мМ лейцина, изолейцина-d10, валина, аспарагина, метионина и цистеина в 50 мМ фосфата натрия, pH 7. Реакции инкубировали, гасили, разбавляли и анализировали, как описано в Примере 6. Результаты этих анализов представлены в таблицах 8-1 и 8-2.

Таблица 8-1. Относительная активность вариантов LeuDC протестированных при различных условиях (Относительно SEQ ID NO: 686)¹			
SEQ ID NO: (нт/ак)	Аминокислотные различия (Относительно SEQ ID NO: 686)	Leu FIOP (Относительно SEQ ID NO: 686)	6 АК Микс FIOP (Относительно SEQ ID NO: 686)
687/688	S66N/T118D/D296E/R300K	++	++
689/690	S66N/T118D/H200S/D296E/A303Q/K317Q	++	++
691/692	R141P/M144V/A198G/H200S/R300K	++	++
693/694	S66N/T118D/D296E	++	++
695/696	A89P/T118D/H200S	++	++
697/698	T118D/R141P/H200S	++	++
699/700	R76V/R141P/A198G/H200S/E201R/R300K	++	++
701/702	S66N/R76V/T118D/R141P/E201R/R300K	++	++
703/704	R76V/T118D/R141P/H200S/D296E	++	++
705/706	S66N/H200S	++	++
707/708	S66N/R76V/A198G/H200S/D296E/A303Q	++	++
709/710	S66N/R76V/A198G/H200S/R300K	++	++
711/712	D126T	++	++
713/714	E201D/L270R/D352A	++	+
715/716	G156A/L270R/M324S	++	++
717/718	D126T/E201D/L270R/M324S	++	++
719/720	A80K/E201D/L270R	++	+
721/722	L270R	++	+

Таблица 8-1. Относительная активность вариантов LeuDC протестированных при различных условиях
(Относительно SEQ ID NO: 686)¹

SEQ ID NO: (нт/ак)	Аминокислотные различия (Относительно SEQ ID NO: 686)	Leu FIOP (Относительно SEQ ID NO: 686)	6 АК Микс FIOP (Относительно SEQ ID NO: 686)
723/724	D126T/L270R	++	+
725/726	L106M/L270R/M324S/D352A	++	
727/728	L270R/M324S	++	+
729/730	G156A/L270R	++	+
731/732	E201D/L270R	++	+
733/734	A80K/L270R/M324S	++	+
735/736	A80K/L270R	++	++

¹ Все активности определяли относительно эталонного полипептида SEQ ID NO: 686. Уровни повышенной активности определяются следующим образом: «+»=0,9-1,1; «++» > 1,1; «+++» > 2; и «++++» > 3.

Таблица 8-2. Относительная активность вариантов LeuDC, протестированных при различных условиях
(Относительно SEQ ID NO: 686)¹

SEQ ID NO: (нт/ак)	Аминокислотные различия (Относительно SEQ ID NO: 686)	Leu FIOP (Относительно SEQ ID NO: 686)	6 АК Микс FIOP (Относительно SEQ ID NO: 686)
737/738	L19I	++	++
739/740	N134S	+	++
741/742	F173T	+	+++
743/744	P170A	++	++
745/746	Y123M	+	++
747/748	V187L	++	++
749/750	A211S	++	++
751/752	F173I	++	++++
753/754	L109G	++	+++
755/756	N134A	++	++
757/758	T312A	++	++
759/760	Y123V	++	++
761/762	F173A	++	+++
445/446	Y123F	++	++

¹ Все активности определяли относительно эталонного полипептида SEQ ID NO: 686. Уровни повышенной активности определяются следующим образом: «+»=0,9-1,1; «++» > 1,1; «+++» > 2; и «++++» > 3.

ПРИМЕР 9

Анализ аминокислотной активности вариантов LDC

[0187] В этом примере описаны эксперименты по оценке активности SEQ ID NO: 12 и 594 в отношении всех двадцати аминокислот.

Производство порошков для встряхиваемых флаконов (SFP)

[0188] Порошки для встряхиваемых флаконов LDC готовили, как описано в Примере 1, со следующими изменениями: осадок клеток ресуспендировали в 30 мл 50 мМ фосфата натрия, pH 7, с 200 мкМ PLP. После лизиса с использованием однократного пропускания через микрофлюидайзер (Microfluidics) при 110 фунт/кв.дюйм лизат осаждали (10000 об/мин, 30 мин, 4°C) и полученный супернатант подвергали термообработке при 60°C в течение 1 ч на водяной бане. Затем образцы центрифугировали (10000 об/мин, 1 час, 4°C) перед тем, как полученный супернатант заморозили и лиофилизировали для получения порошка, содержащего экспрессированный фермент.

Анализ характеристики SFP на активность декарбоксилазы в отношении различных аминокислот

[0189] Порошки во встряхиваемых колбах восстанавливали в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4, чтобы получить стоковые растворы порошка с концентрацией 10 г/л. Затем 20 мкл этих растворов SFP добавляли к 180 мкл реакционной смеси, содержащей 2 мМ всех двадцати аминокислот с изолейцином-d10 (Cambridge Isotope Laboratories) вместо изолейцина, растворенного в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7. Реакции инкубировали в течение 1,5-2 ч при 37°C при 400 об/мин на шейкере для титровальных планшетов THERMOTRON® перед гашением 2 объемами ацетонитрила с 0,1% муравьиной кислотой. Полученные образцы центрифугировали 10 мин при 4°C при 4000 об/мин, супернатант разбавляли до 6 раз ацетонитрилом с 0,1% муравьиной кислотой. Образцы анализировали на наличие всех двадцати аминокислот с помощью LC-MS/MS, пример прибора LC-MS/MS и параметры показаны в Таблицах 9-1 и 9-2. Конверсию (т. е. истощение) каждой аминокислоты рассчитывали относительно отрицательного контроля, и результаты для SEQ ID NO: 12 и 594 показаны в Таблице 9-2.

Таблица 9-1. HPLC-MS/MS Анализ аминокислот	
Прибор	Agilent ULTIMO [®] Triple Quad MS
Колонка	Agilent INFINITYLAB [®] POROSHELL [®] 120 HILIC-OH5, 2,1×100 мм
Подвижная фаза	Градиент (A: 10% 0,2 М Формиат аммония pH 3, 90% вода; B: 10% 0,2 М Формиат аммония pH 3, 90% ацетонитрил) <u>%B</u> 100 70 100 100
Скорость потока	0,8 мл/м
Рабочее время	16 м
Температура колонки	30 °C
Объем инъекции	0,25 μл
Условия MS	Режим: MRM, ESI положительный; Темп газа & поток:

Таблица 9-1. HPLC-MS/MS Анализ аминокислот						
		250 °C, 7 мл/мин; Распылитель: 45 фунтов/кв.дюйм; Темп газа в оболочке & поток: 11 мл/мин; Капиллярное напряжение: 3500 В; Напряжение сопла: 0 В				
Таблица 9-2. HPLC-MS/MS Анализ аминокислот (продолж.)						
Название соединения	Предшественник (m/z)	Продукт (m/z)	Dwell (мс)	Фрагментор (В)	СЕ (В)	Полярность
Аланин	90,1	44,1	10	25	8	Положительное
Аргинин	175,1	70,1	75	25	28	Положительное
Аспарагин	133,1	87,1	10	25	20	Положительное
Аспартат	134	74	10	25	15	Положительное
Цистеин	122,1	59	15	25	20	Положительное
Глутамат	148,1	84,1	10	75	16	Положительное
Глутамин	147,1	84	10	25	20	Положительное
Глицин	76	30,1	15	25	5	Положительное
Гистидин	156,1	110	25	25	12	Положительное
Изолейцин	132,1	86,1	10	25	8	Положительное
Изолейцин-d10	142,1	96,1	10	25	8	Положительное
Лейцин	132,1	86,1	10	25	8	Положительное
Лизин	147,1	84,1	50	25	16	Положительное
Метионин	150	104	10	75	8	Положительное
Фенилаланин	166,1	120,1	10	25	5	Положительное
Пролин	116,1	70,1	10	50	16	Положительное
Серин	106,1	60,1	10	25	8	Положительное
Треонин	120	74,1	10	25	10	Положительное
Триптофан	205,2	146	10	50	20	Положительное
Тирозин	182,1	136,1	10	25	12	Положительное
Валин	118,1	72,1	10	25	8	Положительное
Таблица 9-3. Процент превращения вариантов LeuDC на различных						

Таблица 9-1. HPLC-MS/MS Анализ аминокислот		
	аминокислотах ¹	
Аминокислота	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 594
Ala	+	
Arg	+	
Asn	++++	++++
Asp		
Cys	++	++
Gln	+	
Glu	+	
Gly	+	+
His	+	
Ile-d ₁₀	+++	+++
Leu	++++	++++
Lys	+	
Met	++	+++
Phe	+++	+
Pro	+	+
Ser	+	
Thr	+	+
Trp	++	+
Tyr	+	
Val	+++	+++
¹ Уровень активности представлен в виде % превращения и определяется следующим образом: «+» > 0.1%; «++» > 20%; «+++» > 40%; и «++++» > 60%.		

ПРИМЕР 10

Варианты LDC SEQ ID NO: 688

[0190] В этом примере описаны эксперименты по эволюции и скринингу вариантов LDC, полученных из SEQ ID NO: 688, на улучшенную активность в отношении лейцина, устойчивость к низкому pH и устойчивость к протеазам. Направленную эволюцию LDC, кодируемую SEQ ID NO: 688, осуществляли путем конструирования библиотек вариантных генов. Затем эти библиотеки высевали, выращивали и подвергали скринингу с использованием методов, описанных ниже.

НТР Анализ активности осветленных лизатов, предварительно обработанных кислым буфером и протеазой

[0191] Рост НТР и лизис клеток *E. coli*, экспрессирующих варианты LDC, проводили, как описано в Примере 2, за исключением того, что буфер для лизиса содержал 20 мМ фосфата натрия и 40 мкМ PLP. Термообработанные лизаты, содержащие варианты LDC, подвергали воздействию кислого буфера, содержащего пепсин, а затем обрабатывали протеазами, как описано в Примере 5. В частности, термообработанный

осветленный лизат предварительно инкубировали 1:1 с конечной концентрацией пепсина 0,4 г/л в буфере Макилвейна, pH 3, в течение 1,5 ч при 37°C, а полученный супернатант предварительно инкубировали 1:1 с конечной концентрацией пепсина. 4 г/л трипсина и 1,5 г/л химотрипсина, растворенных в 400 мМ фосфата натрия, pH 8, в течение 2 ч при 37°C. После инкубации 40 мкл образца добавляли к 60 мкл реакционной смеси, в результате чего конечная концентрация лейцина, изолейцина-d10, валина, аспарагина, метионина и цистеина в имитируемой кишечной жидкости составляла 2,5 мМ. Реакции инкубировали, гасили, разбавляли и анализировали, как описано в Примере 6. Результаты этих анализов представлены в Таблицах 10-1.

Таблица 10-1. Относительная активность вариантов LeuDC в отношении лейцина после имитации воздействия желудочно-кишечных условий (Относительно SEQ ID NO: 688)¹

SEQ ID NO: (нт/ак)	Аминокислотные различия (Относительно SEQ ID NO: 688)	АК Микс FIOP (Относительно SEQ ID NO: 688)
763/764	L19I/L109G/A211S/L270R/T312A	++++
765/766	L19I/L109G/Y123F/P170A/A211S/L270R/T312A	++++
767/768	L19I/L109G/Y123V/R141P/P170A/A198G/A211S/L270R/T312A	+++
769/770	L19I/L109G/P170A/F173I/A211S/L270R/T312A	++++
771/772	L109G/A211S/L270R/T312A	++++
773/774	L19I/L109G/Y123F/A198G/H200S/A211S/L270R/T312A	++++
775/776	L109G/P170A/A211S/L270R/T312A	++++
777/778	L19I/L109G/Y123V/R141P/P170A/A198G/H200S/A211S/L270R/T312A	+++
779/780	L19I/L109G/Y123V/R141P/P170A/A198G/A211S	+++

¹ Все активности определяли относительно эталонного полипептида SEQ ID NO: 688. Уровни повышенной активности определяются следующим образом: «+»=0,9-1,1; «++» > 4; «+++» > 7; и «++++» > 10.

ПРИМЕР 11

Варианты LDC SEQ ID NO: 766

[0192] В этом примере описаны эксперименты по эволюции и скринингу вариантов LDC, полученных из SEQ ID NO: 766, на улучшенную лейциновую активность, устойчивость к низкому pH и устойчивость к протеазам. Направленную эволюцию LDC, кодируемую SEQ ID NO: 766, осуществляли путем конструирования библиотек вариантных генов. Затем эти библиотеки высевали, выращивали и подвергали скринингу с использованием методов, описанных ниже.

НТР Анализ активности осветленных лизатов, предварительно обработанных кислым буфером и протеазой

[0193] Рост НТР и лизис клеток *E. coli*, экспрессирующих варианты LDC, проводили, как описано в Примере 10. Термообработанные лизаты, содержащие варианты

LDC, подвергали воздействию кислого буфера, содержащего пепсин, а затем обрабатывали протеазами, как описано в Примере 5. В частности, термообработанный осветленный лизат преинкубировали 1:1 с конечной концентрацией пепсина 0,8 г/л в буфере Макилвейна, pH 2,6-2,8, в течение 2 ч при 37°C, а полученный супернатант преинкубировали 1:1 с конечная концентрация трипсина 4 г/л и химотрипсина 1,5 г/л, растворенных в 400 мМ фосфата натрия, pH 8, в течение 2 ч при 37°C. После инкубации 40 мкл образца добавляли к 60 мкл реакционной смеси, в результате чего конечная концентрация лейцина, изолейцина-d10, валина, аспарагина, метионина и цистеина в имитируемой кишечной жидкости составляла 2-3 мМ. Реакции инкубировали, гасили, разбавляли и анализировали, как описано в Примере 6. Результаты этих анализов представлены в Таблицах 11-1 и 11-2.

НТР Анализ активности осветленных лизатов в отношении лейцина

[0194] Рост НТР и лизис клеток *E. coli*, экспрессирующих варианты LDC, проводили, как описано в Примере 10. Термообработанные лизаты разбавляли водой в 20 раз и добавляли 20 мкл образца к 80 мкл реакционной смеси, в результате чего получали конечную концентрацию лейцина 3 мМ в 50 мМ фосфата натрия, pH 7. Реакции инкубировали, гасили, разбавляли и анализировали, как описано в Примере 6. Активность в отношении лейцина нормализовали по концентрации лейциндекарбоксилазы в термообработанных осветленных лизатах, которую определяли с помощью SDS-PAGE и эксклюзионной хроматографии. Результаты этих анализов представлены в Таблицах 11-2.

Таблица 11-1. Относительная активность вариантов LeuDC в отношении лейцина после имитации воздействия желудочно-кишечных условий (Относительно SEQ ID NO: 766)¹

SEQ ID NO: (нт/ак)	Аминокислотные различия (Относительно SEQ ID NO: 766)	АК Микс FIOP (Относительно SEQ ID NO: 766)
781/782	K5V/H41D	+++
783/784	K5V/H41D/T228D	+++
785/786	H41D	++
787/788	T331V	++
789/790	D353I	+
791/792	V55I	+++
793/794	S64N	++
795/796	L47F	++
797/798	L51E	+++
799/800	D353L	++
801/802	L51Q	++
803/804	P384W	+
805/806	C357S	++
807/808	I267L	++
809/810	D126A	++
811/812	F33L	++
813/814	D126T	++
815/816	R270T	++

817/818	R270A	+
819/820	E265P	++
821/822	D353E	+

¹ Все активности определяли относительно эталонного полипептида SEQ ID NO: 766. Уровни повышенной активности определяются следующим образом: «+» 1-1,1, «++» > 1,1, «+++» > 1,5

Таблица 11-2. Относительная активность вариантов LeuDC, протестированных при различных условиях (Относительно SEQ ID NO: 766)¹

SEQ ID NO: (нт/ак)	Аминокислотные различия (Относительно SEQ ID NO: 766)	АК Микс FIOP (Относительно SEQ ID NO: 766)	Leu нормализованный FIOP (Относительно SEQ ID NO: 766)
823/824	D118T/K300R		+
825/826	D118T		+
827/828	N66S		+++
829/830	E296D	++	
831/832	N66S/D118T		+++
833/834	K300R	++	+
835/836	N66S/D118T/E296D		+++
837/838	E296D/K300R	++	+
839/840	N66S/E296D/K300R		+++
841/842	N66S/E296D		+++
843/844	N66S/K300R		+++
845/846	D118T/E296D	+	++
847/848	N66S/D118T/E296D/K300R		+++
849/850	N66S/D118T/K300R		+++
851/852	D118T/E296D/K300R	+	+

¹ Все активности определяли относительно эталонного полипептида SEQ ID NO: 766. Уровни повышенной активности определяются следующим образом: «+»=0,9-1,1; «++» > 1,1; и «+++» > 1,5.

ПРИМЕР 12:

In vivo Характеристика вариантов LDC у здоровых яванских макак

[0195] Фармакодинамические исследования in vivo проводили на здоровых яванских макаках (n=12, самцы, масса тела 3-4 кг) для характеристики трех вариантов LDC (SEQ ID: 484; SEQ ID: 686 и SEQ ID: 766). Каждый вариант дозировали 25, 50 или 100 мг/кг. Исследование проводили в течение четырех недель, состоящих из четырех дней дозирования, каждый из которых разделен недельным периодом вымывания. Группы дозирования чередовали, чтобы животные не получали одну и ту же дозу дважды. За день до введения дозы животных разделяли по отдельным клеткам и не кормили в течение

ночи. В каждый день дозирования 10 г порошка сывороточного белка (BN Labs Grass Fed Whey Protein; 9,14% лейцина), приготовленного с водой в общем объеме 20 мл на животное, вводили через желудочный зонд. Сразу же после суспензии сывороточного белка вводили либо носитель (20 мМ фосфат натрия, 0,4 мМ пиридоксальфосфат, pH 7,2), либо соответствующую дозу LDC в количестве 2,5 мл/кг с последующим ополаскиванием 4 мл воды, чтобы обеспечить эффективную доставку всех веществ с помощью той же зондовой трубки. Животным давали обычную пищу через 8 часов, сразу после забора крови, в дни дозирования. Образцы крови были получены через 90 и 30 минут до приема пищи и через 5, 15, 30 минут, а также через 1, 2, 4, 8, 12 и 24 часа после приема пищи (24-часовой момент времени соответствовал сбору на следующий день перед кормлением). Образцы переносили в пробирки, содержащие антикоагулянт K2EDTA, помещали на влажный лед в ожидании обработки и центрифугировали при 2500 об/мин в течение 10 минут при температуре приблизительно 4°C. Полученную плазму извлекали и хранили в замороженном виде ($\leq -60^{\circ}\text{C}$) до проведения анализа. Лейцин, фенилаланин, тирозин и метионин плазмы определяли количественно с помощью LC-MS/MS для оценки эффективности. Значительное увеличение уровня лейцина в плазме наблюдалось только при приеме пищи по сравнению с исходным уровнем до приема пищи. Все варианты LDC во всех дозах приводили к значительному подавлению лейцина в плазме в ответ на прием пищи с сывороточным белком. SEQ ID: 484 и SEQ ID: 686 продемонстрировали эффективность в зависимости от дозы. Все дозы SEQ ID: 766 продемонстрировали схожую эффективность, которая превосходила как SEQ ID: 484, так и SEQ ID: 686. LDC не влиял на уровень фенилаланина, тирозина или метионина в плазме. В таблице 12-1 суммировано процентное снижение прироста площади под кривой (iAUC) лейцина в плазме при обработке по сравнению с носителем. iAUC определяли, сначала вычитая значения лейцина до приема пищи (фон натошак) из каждого значения момента времени после приема пищи для каждого животного, а затем выполняя расчеты AUC. Статистические расчеты и значимость определяли с использованием GraphPad Prism 7 (программное обеспечение GraphPad).

Таблица 12-1. % Снижение уровня лейцина в плазме у здоровых яванских макаков с вариантами LeuDC в ответ на прием пищи с сывороточным белком (% Снижения iAUC относительно носителя)			
SEQ ID NO:	25 мг/кг	50 мг/кг	100 мг/кг
SEQ ID NO: 484	32,3	28,9	45,7
SEQ ID NO: 686	33,4	49,6	58,1
SEQ ID NO: 766	48	53,8	52,6

ПРИМЕР 13

In vivo Характеристика вариантов LDC в мышинных моделях заболеваний

[0196] Фармакодинамические исследования *in vivo* проводились на мышинной модели промежуточной болезни кленового сиропа (iMSUD; (Dbt^{tm1Geh}Tg(Cebpb-tTA)5Bjd Tg(tetO-DBT)A1Geh/J; JAX stock #6999)), чтобы охарактеризовать три варианта LDC (SEQ ID: 484; SEQ ID: 686 и SEQ ID: 766). Каждый вариант дозировали по 200 мг/кг. Перед

введением дозы и началом отлучения от грудного вскармливания мышей iMSUD содержали на безлейциновой диете для мышей с добавлением лейцина в питьевую воду (5,75 г лейцина/л) для поддержки роста и увеличения продолжительности жизни. Для экспериментов использовали животных в возрасте не менее 2 месяцев и массой тела 20 г. Животных не кормили в течение ночи (~ 15 часов) перед введением дозы. В каждый день дозирования 45 мг порошка сывороточного белка (BN Labs Grass Fed Whey Protein; 9,14% лейцина), приготовленного с водой в общем объеме 100 мл на животное, вводили перорально через желудочный зонд. Сразу же после суспензии сывороточного белка вводили либо носитель (20 мМ фосфат натрия, 0,4 мМ пиридоксальфосфат, pH 7,2), либо соответствующий вариант LDC в дозе 5 мл/кг. Образцы крови были получены за 15 минут до приема пищи и через 15, 30, 60, 120 и 240 минут после приема пищи. Образцы переносили в пробирки, содержащие антикоагулянт K₂EDTA, помещали на влажный лед в ожидании обработки и центрифугировали при 2500 об/мин в течение 10 минут при температуре приблизительно 4°C. Полученную плазму извлекали и хранили в замороженном виде ($\leq -60^{\circ}\text{C}$) до проведения анализа. Лейцин плазмы определяли количественно с помощью LC-MS/MS для оценки эффективности. Значительное увеличение уровня лейцина в плазме наблюдалось только при приеме пищи по сравнению с исходным уровнем до приема пищи. Все варианты LDC приводили к значительному снижению уровня лейцина в плазме в ответ на прием пищи с сывороточным белком. SEQ ID: 484 и SEQ ID: 686 продемонстрировали аналогичную эффективность, в то время как SEQ ID: 766 показала более высокую эффективность. В Таблице 13-1 суммировано процентное снижение iAUC лейцина в плазме при обработке по сравнению с носителем. iAUC определяли, сначала вычитая значения лейцина до приема пищи (фон натошак) из каждого значения момента времени после приема пищи для каждого животного, а затем выполняя расчеты AUC. Статистические расчеты и значимость определяли с использованием GraphPad Prism 7 (программное обеспечение GraphPad).

Таблица 13-1. % Снижение уровня лейцина в плазме в мышинной модели iMSUD с вариантами LeuDC в ответ на прием пищи с сывороточным белком (%Снижения iAUC относительно носителя)	
SEQ ID NO:	200 мг/кг
SEQ ID NO: 484	30,6
SEQ ID NO: 686	30
SEQ ID NO: 766	45

[0197] Несмотря на то, что изобретение было описано со ссылкой на конкретные варианты осуществления, могут быть внесены различные изменения и заменены эквиваленты для адаптации к конкретной ситуации, материалу, составу вещества, процессу, стадии или стадиям процесса, тем самым достигая преимуществ изобретения не выходя за рамки заявленного.

[0198] Для всех целей в Соединенных Штатах Америки каждая и каждая публикация и патентный документ, цитируемые в этом раскрытии, включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы каждая такая публикация или документ были

специально и отдельно указаны для включения в настоящий документ посредством ссылки. Ссылки на публикации и патентные документы не предназначены для указания на то, что любой такой документ относится к известному уровню техники, а также не является признанием его содержания или даты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности по меньшей мере с одной из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688, и/или 766, где аминокислотные положения указанной аминокислотной последовательности пронумерованы относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766.

2. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2.

3. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4.

4. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6.

5. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 8.

6. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 10.

7. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 14.

8. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 12, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из положения 5, 14, 14/34/38/39/102/267/275/350/357,

14/39/102/127/245/267/275/349/350, 34/38/39/102/127/275/357, 34/38/39/102/275/357, 34/38/39/127/245/349/350/357, 34/38/39/127/245/350/357, 34/39/102/127/264/275/357, 34/39/102/127/275/349/357, 34/39/102/264/275/350/357, 34/39/275/349/350/357, 38/39/102/127/264/267/350/357, 38/39/102/127/267/275/349/350/357, 38/39/102/127/349/350/357, 38/39/102/127/350, 38/39/102/127/350/357, 38/39/127/245/267/357, 38/39/127/264/275, 38/39/127/264/350/357, 38/39/127/350/357, 38/39/127/357, 38/39/245/275/357, 38/39/264/267/275/350, 38/39/264/275/357, 38/39/275, 38/39/275/350, 39, 39/102/127/264/275/357, 39/102/264/275/357, 39/102/267/275/357, 39/127/245/264/267/275/350, 39/127/245/264/275/350/357, 39/127/245/357, 39/127/267/275/350/357, 39/127/267/350/357, 39/127/357, 39/245/264/267/275/357, 39/264/267/275/350, 39/275/350/357, 48, 139, 164, 196, 255, 299, 318, 324, 339, 343, 350, 353, 357, 364, 365, 379, 381, 386, 389, 391, 393, 394, 395, 397, 398, и 405, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 12.

9. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 38, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из положения 48/64/164/324/343/353/357/364, 48/64/164/324/343/364, 48/64/164/353/357/364, 48/64/357/364, 64/164/324/343/353/357/364, 64/164/324/343/357/364, 64/164/353/357, 64/318/324/357/364, 64/324/353/357/364, 132/255/339/379/395, 164/196/324/357/364, 164/318/324/343/353/357, 164/318/324/357/364, 164/324/343/353/357/364, 164/324/357/364, 164/353/357/364, 164/364, 196/318/324/353/357/364, 318/343/357, 324/343/357/364, 324/353/357/364, 324/357/364, 339/379/389/394/395, 339/389/395, 339/391, 339/394/395/405, 357/364, 379/386, 379/394/395/397/404/405, 379/394/395/397/405, 389/394/395/397/405, и 394/397, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 38.

10. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 234, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из положения 2, 3, 33, 48/64/255, 48/255/339, 48/255/379, 64, 64/255, 69, 161, 193, 255, 255/318/379, 259, 263, 318/339/379, 324, 324/389/394, 324/389/394/395, 324/389/394/397, 324/394, 324/394/395, 324/394/395/397, 324/395, 339, 340, 380, 382, 389, 389/394, 389/394/395, 389/394/395/397, 389/394/397, 389/395, 389/397, 390, 394, 394/395, 394/395/397, 395, 395/397, 397, 401, и 405, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 234.

11. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 284, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из положения 2/64/69/324/380/382/388/389, 3/64/69/263/339/380/388, 3/64/69/389, 3/64/69/390, 3/64/379/380/390, 3/69/263/380, 3/69/324, 3/69/324/380/382/389/390, 12/135/259/263, 12/135/263/382, 12/259/263/304, 48/64/255, 64/69, 64/69/189/259/263/304, 64/69/189/259/263/304/339/340/379, 64/69/223/388, 64/69/223/388/389/390, 64/69/304/379/382, 64/69/324, 64/69/324/339/380/389/390, 64/69/339, 64/69/339/382/388/389, 64/69/339/389/390, 64/69/379/380, 64/69/380/388/390, 64/69/389, 64/69/390, 64/255/263, 64/263, 64/324/339/389/390, 69/223/263/324/382/388/390, 69/223/324/379/380/382/388/390, 69/263, 69/263/324, 69/263/339, 69/263/388, 69/263/389/390, 69/324/379/380/388, 69/324/380, 69/339/390, 69/382/390, 259/263/304, 259/263/304/339/340/379, 263/339/389/390, 263/390 и 304/340/379/380/382, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 284.

12. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 484, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из положения 3/194/304, 3/259/263/304, 3/259/304, 3/259/304/324/339, 3/259/304/324/382, 3/259/304/382, 3/263/304/324, 3/263/304/324/339, 3/263/304/324/382, 3/304, 3/304/324, 16, 63, 77, 80, 87/270, 87/270/365, 87/328/365, 91, 92, 126, 140, 156, 168/270/328/338, 181, 194, 201, 256, 259, 259/263, 259/263/304, 259/263/304/324, 259/263/304/324/382, 259/263/304/379, 259/263/304/382, 259/304, 259/304/324, 259/304/324/339, 259/304/324/339/382, 259/304/382, 262, 263/304, 263/304/324, 263/304/324/339, 263/304/324/382, 263/324, 270, 270/319, 270/328/338, 270/328/338/365, 304, 304/324, 324, 328, 352, 365, 366, и 382, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 484.

13. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 594, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из положения 16/63/80/126/168/366, 16/63/80/126/181/194/259/324/328/366, 16/63/126/168/270/328/366, 16/80/126/324/366, 16/80/126/366, 16/80/168, 16/80/168/270/366,

16/80/168/324, 16/80/168/366, 16/80/324, 16/91/126/168/324/366, 16/126/168/366, 16/168/259/366, 16/168/270/324/366, 16/168/324/328/366, 16/168/324/366, 16/168/366, 16/259/263/328, 16/324/328/366, 16/328/366, 80/126/168/270/366, 80/126/168/366, 80/126/181/270/324/366, 80/168/270/366, и 168/366, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 594.

14. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 686, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из положения 66/76/118/141/201/300, 66/76/198/200/296/303, 66/76/198/200/300, 66/118/200/296/303/317, 66/118/296, 66/118/296/300, 66/200, 76/118/141/200/296, 76/141/198/200/201/300, 80/201/270, 80/270, 80/270/324, 89/118/200, 106/270/324/352, 118/141/200, 126, 126/201/270/324, 126/270, 141/144/198/200/300, 156/270, 156/270/324, 201/270, 201/270/352, 270, и 270/324, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 686.

15. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 686, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из положения 19, 109, 123, 134, 170, 173, 187, 211 и 312, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 686.

16. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 688, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из положения 19/109/123/141/170/198/200/211/270/312, 19/109/123/141/170/198/211, 19/109/123/141/170/198/211/270/312, 19/109/123/170/211/270/312, 19/109/123/198/200/211/270/312, 19/109/170/173/211/270/312, 19/109/211/270/312, 109/170/211/270/312, и 109/211/270/312, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 688.

17. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 766, и где полипептидная последовательность

указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из положения 5/41, 5/41/228, 33, 41, 47, 51, 55, 64, 126, 265, 267, 270, 331, 353, 357 и 384, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 766.

18. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 1, где указанная полипептидная последовательность имеет по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с SEQ ID NO: 766, и где полипептидная последовательность указанного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы содержит по меньшей мере одну замену или набор замен в одном или более положениях аминокислот, выбранных из положения 66, 66/118, 66/118/296, 66/118/296/300, 66/118/300, 66/296, 66/296/300, 66/300, 118, 118/296, 118/296/300, 118/300, 296, 296/300, и 300, где положения аминокислот пронумерованы относительно SEQ ID NO: 766.

19. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688, и/или 766.

20. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы, где указанный сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы содержит сконструированный полипептид по любому из пп. 1-19.

21. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 20, где указанный сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 38, 234, 284, 484, 594, 686, 688 и/или 766.

22. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по любому из пп. 1-18, где указанный сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы представляет собой вариант полипептида лейциндекарбоксилазы, представленный в любой из Таблиц 1-2, 2-1, 3-2, 4-1, 5-1, 6-1, 7-1, 8-1, 8-2, 10-1, 11-1 и/или 11-2.

23. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по любому из пп. 1-22, где указанный сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы представляет собой вариант фермента *Planctomycetaceae*.

24. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по любому из пп. 1-23, где указанный сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы проявляет большую активность в отношении лейцина, чем лейциндекарбоксилаза дикого типа из вида *Planctomycetaceae*.

25. Полипептид сконструированной лейциндекарбоксилазы по любому из пп. 1-24, где указанная сконструированная лейциндекарбоксилаза более устойчива к протеолизу, чем лейциндекарбоксилаза дикого типа из вида *Planctomycetaceae*.

26. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по любому из пп. 1-25, где указанный сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы является более

термостабильным, чем лейциндекарбоксилаза дикого типа из вида *Planctomycetaceae*.

27. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по любому из пп. 1-26, где указанный сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы содержит последовательность, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную любой из четных последовательностей SEQ ID NO: 16-852.

28. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 27, где указанный полипептид лейциндекарбоксилазы содержит последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из четных последовательностей SEQ ID NO: 16-852.

29. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по п. 28, где указанный полипептид лейциндекарбоксилазы содержит любую из четных последовательностей SEQ ID NO: 16-852.

30. Сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по любому из пп. 1-29, где указанный сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы является очищенным.

31. Композиция, содержащая по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по любому из пп. 1-30.

32. Сконструированная полинуклеотидная последовательность, кодирующая по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по любому из пп. 1-31.

33. Сконструированная полинуклеотидная последовательность по п. 32, где указанная полинуклеотидная последовательность содержит последовательность, по меньшей мере на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную любой из нечетных последовательностей SEQ ID NO: 15-851.

34. Сконструированная полинуклеотидная последовательность по п. 32, где указанная полинуклеотидная последовательность содержит последовательность, по меньшей мере на 90% или более идентичную любой из нечетных последовательностей SEQ ID NO: 15-851.

35. Сконструированная полинуклеотидная последовательность по п. 32, где указанная полинуклеотидная последовательность содержит любую из нечетных последовательностей SEQ ID NO: 15-851.

36. Сконструированная полинуклеотидная последовательность по любому из пп. 32-35, где указанная последовательность функционально связана с контрольной последовательностью.

37. Сконструированная полинуклеотидная последовательность по любому из пп. 32-36, где указанный полинуклеотид оптимизирован по кодонам.

38. Экспрессирующий вектор, содержащий по меньшей мере одну сконструированную полинуклеотидную последовательность по любому из пп. 32-37 и по меньшей мере одну контрольную последовательность.

39. Экспрессирующий вектор по п. 38, где указанная контрольная последовательность содержит промотор.

40. Экспрессирующий вектор по п. 39, где указанный промотор представляет собой гетерологичный промотор.

41. Клетка-хозяин, трансформированная по меньшей мере одной полинуклеотидной последовательностью по любому из пп. 32-37 и/или содержащая экспрессирующий вектор по любому из пп. 38-40.

42. Клетка-хозяин по п. 41, где указанная клетка-хозяин представляет собой *E. coli*.

43. Способ получения сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы в клетке-хозяине, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по любому из пп. 1-30, и/или по меньшей мере одну полинуклеотидную последовательность по любому из пп. 32-37 и/или по меньшей мере один экспрессирующий вектор по любому из пп. 38-40, в подходящих условиях культивирования, так что продуцируется по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы.

44. Способ по п. 43, включающий культивирование клетки-хозяина, содержащей по меньшей мере один полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по любому из пп. 1-30, в подходящих условиях культивирования, так что продуцируется по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы.

45. Способ по п. 43 и/или 44, дополнительно включающий выделение по меньшей мере одного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы из культуры и/или клеток-хозяев.

46. Способ по любому из пп. 43-45, дополнительно включающий стадию очистки указанного по меньшей мере одного сконструированного полипептида лейциндекарбоксилазы.

47. Композиция, содержащая по меньшей мере один сконструированный полинуклеотид по любому из пп. 32-37.

48. Композиция по п. 47, где указанная композиция представляет собой фармацевтическую композицию.

49. Композиция по п. 48, дополнительно содержащая по меньшей мере одно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество и/или носитель.

50. Композиция по любому из пп. 31, 48 и 49, где указанная композиция пригодна для лечения болезни кленового сиропа.

51. Композиция по любому из пп. 31 и 47-50, где указанная композиция пригодна для перорального введения человеку.

52. Композиция по любому из пп. 31 и 47-51, где указанная композиция представлена в форме пилюли, таблетки, капсулы, желатиновой капсулы, жидкости или эмульсии.

53. Композиция по п. 52, где указанная пилюля, таблетка, капсула или желатиновая капсула дополнительно содержат энтэросолюбильное покрытие.

54. Композиция по любому из пп. 31 и 47-52, где указанная композиция пригодна для парентеральной инъекции человеку.

55. Композиция по любому из пп. 31 и 47-54, где указанную композицию вводят совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтически эффективным соединением.

56. Композиция по п. 55, где указанная композиция содержит по меньшей мере одно дополнительное терапевтически эффективное соединение.

57. Способ лечения и/или предотвращения симптомов болезни кленового сиропа у пациента, включающий предоставление пациента, страдающего болезнью кленового сиропа, и предоставление композиции по любому из пп. 31 и 47-56 указанному пациенту.

58. Способ по п. 57, где указанные симптомы болезни кленового сиропа улучшаются.

59. Способ по пп. 57 и/или 58, где указанный пациент может соблюдать диету, которая менее ограничена по своему содержанию изолейцина, лейцина и/или валина, чем диеты, необходимые пациентам, которые не получали по меньшей мере одну композицию, содержащую по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы по пп. 1-30.

60. Способ по любому из пп. 57-59, где указанный пациент может соблюдать диету, которая менее ограничена по своему содержанию изолейцина, лейцина и/или валина, чем диеты, необходимые пациентам, которые не получали по меньшей мере одну композицию, содержащую по меньшей мере один сконструированный полипептид лейциндекарбоксилазы, полученный с использованием способов по пп. 43-46.

61. Способ по любому из пп. 57-60, где указанный пациент является младенцем, ребенком, подростком или взрослым.

62. Применение композиций по любому из пп. 31 и/или 47-56.

По доверенности