

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043748**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.06.19**

(21) Номер заявки  
**201991637**

(22) Дата подачи заявки  
**2018.01.04**

(51) Int. Cl. **C12N 9/84** (2006.01)  
**C12P 21/00** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)

---

(54) **АЦИЛАЗЫ ПЕНИЦИЛЛИНА G**

---

(31) **62/442,810; 62/472,055**

(32) **2017.01.05; 2017.03.16**

(33) **US**

(43) **2019.11.29**

(86) **PCT/US2018/012305**

(87) **WO 2018/129130 2018.07.12**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**КОДЕКСИС, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Алвизо Оскар, Элгарт Дэвид, Орр  
Роберт Кевин, Риггинс Джеймс  
Николас, Фрисзковска Анна, Лекса  
Катрина В., И Сян, Дуан Да, Моффетт  
Кортни Дайанн, Деллас Никки,  
Митчелл Весна (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **US-A1-20120270282**

**KIM et al.: "One-step Purification of Poly-His Tagged Penicillin G Acylase Expressed in E. coli," Journal of Microbiology and Biotechnology, 28 April 2004 (28.04.2004), Vol. 14, № 2, Pgs. 231-236, entire document**

**US-A1-20160326508**

**US-B2-8541199**

**ZAKOVA et al.: "The use of Fmoc-Lys(Pac)-OH and penicillin G acylase in the preparation of novel semisynthetic insulin analogs," Journal of Peptide Science, 16 April 2007 (16.07.2007), Vol. 13, Iss. 5, Pgs. 334-341, entire document**

---

(57) Изобретение предусматривает сконструированные ферменты ацилазы пенициллина G (PGA), полинуклеотиды, кодирующие ферменты, композиции, содержащие ферменты, и способы использования сконструированных ферментов PGA.

---

**B1**

**043748**

**043748**

**B1**

По настоящей заявке испрашивают приоритет патентных заявок США с серийными №№ 62/442810 и 62/472055, поданных 5 января 2017 г. и 16 марта 2017 г. соответственно, обе они включены, таким образом, посредством ссылки во всей их полноте для всех целей.

#### **Область изобретения**

Настоящее изобретение предусматривает сконструированные ферменты ацилазы пенициллина G (PGA), полинуклеотиды, кодирующие ферменты, композиции, содержащие ферменты, и способы использования сконструированных ферментов PGA.

#### **Ссылка на список последовательностей, таблицу или компьютерную программу**

Официальная копия списка последовательностей подана одновременно с описанием в виде текстового файла в формате ASCII через EFS-Web с названием файла "Списки последовательностей.txt", датой создания 5 июня 2019 г. и размером 967 КБ. Список последовательностей, поданный через EFS-Web, является частью описания и включен в полном объеме по ссылке в настоящее описание.

#### **Предпосылки изобретения**

Ацилаза пенициллина G (PGA) (пенициллинамидаза, ЕС 3.5.1.11) катализирует расщепление амидной связи боковой цепи пенициллина G (бензилпенициллина). Фермент используют коммерчески при получении 6-амино-пенициллановой кислоты (6-APA) и фенилуксусной кислоты (PAA). 6-APA является ключевым соединением при промышленном получении полусинтетических  $\beta$ -лактамовых антибиотиков, таких как амоксициллин, ампициллин и цефалексин. Встречаемый в природе фермент PGA демонстрирует нестабильность в коммерческих процессах, что требует иммобилизации на твердых подложках для коммерческого применения. PGA ковалентно связывают с различными основами, и системы с иммобилизованной PGA описывают как эффективные инструменты для синтеза чистых оптических изомеров. Однако прикрепление к твердым поверхностям ведет к нарушению свойств фермента, таким как сниженная активность и/или избирательность, и ограничение доступом растворенных веществ. Кроме того, несмотря на то, что прикрепление к твердым подложкам делает возможным захват ферментов и повторное использование в дополнительных циклах обработки, стабильность фермента является такой, что такие применения могут быть ограничены. Ферментативный катализ пенициллина G с помощью PGA до 6-APA является региоспецифическим (не происходит расщепление лактам-амидной связи) и стереоспецифическим. Получение 6-APA составляет, возможно, наибольшую пользу от ферментативного катализа при получении фармацевтических средств. Ферментативная активность PGA, ассоциированная с фенацетильным фрагментом, допускает стереоспецифический гидролиз большого спектра фенацетильных производных первичных аминов, а также спиртов.

#### **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение предусматривает сконструированные ферменты ацилазы пенициллина G (PGA), полинуклеотиды, кодирующие ферменты, композиции, содержащие ферменты, и способы использования сконструированных ферментов PGA. Настоящее изобретение предусматривает сконструированные ацилазы пенициллина G, способные к ацилированию инсулина, где полипептидная последовательность указанной ацилазы пенициллина G по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична SEQ ID № 2, 4, 12, 24, 40, 56, 70, 82, 100, 108, 110, 116, 136, 142, 154 и 160. В некоторых вариантах осуществления ацилаза пенициллина G содержит SEQ ID № 4, 12, 24, 40, 56, 70, 82, 108, 110, 116, 136, 142, 154 или 160. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированная ацилаза пенициллина G содержит последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична по меньшей мере одной последовательности, приведенной в табл. 5.1, 5.1, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 7.1, 8.1, 9.1, 11.1, 12.1, 13.1, 14.1, 15.1, 16.1, 17.1, 18.1, 19.1 и/или табл. 20.1. В некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированная ацилаза пенициллина G содержит последовательность, приведенную в табл. 5.1, 5.1, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 7.1, 8.1, 9.1, 11.1, 12.1, 13.1, 14.1, 15.1, 16.1, 17.1, 18.1, 19.1 и/или табл. 20.1. В некоторых других дополнительных вариантах осуществления сконструированная ацилаза пенициллина G содержит гистидиновую метку. В некоторых вариантах осуществления гистидиновая метка присутствует на С-конце сконструированной ацилазы пенициллина G. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, сконструированная ацилаза пенициллина G содержит полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID № 110 и SEQ ID № 142.

Настоящее изобретение также относится к сконструированным полинуклеотидным последовательностям, кодирующим сконструированные ацилазы пенициллина G, предусмотренные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления сконструированная полинуклеотидная последовательность содержит полинуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична SEQ ID №№ 1, 11, 23, 39, 55, 69, 81, 99, 107, 109, 115, 135, 141, 153 и/или 159.

Настоящее изобретение также относится к векторам, содержащим сконструированные полинуклеотидные последовательности, предусмотренные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления векторы содержат по меньшей мере одну сконструированную полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность(и), по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичную SEQ ID №№ 2, 11, 23, 39, 55, 69, 81, 99,

107, 109, 115, 135, 141, 153 и/или 159. В некоторых дополнительных вариантах осуществления векторы содержат по меньшей мере одну управляющую последовательность.

Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, содержащим по меньшей мере один вектор, предусмотренный в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления векторы в клетках-хозяевах содержат по меньшей мере одну сконструированную полинуклеотидную последовательность, содержащую полинуклеотидную последовательность(и), по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичную SEQ ID №№ 1, 11, 23, 39, 55, 69, 81, 99, 107, 109, 115, 135, 141, 153 и/или 159. В некоторых дополнительных вариантах осуществления векторы содержат по меньшей мере одну управляющую последовательность.

Настоящее изобретение также относится к способам получения ацилированного инсулина, которые включают предоставление: по меньшей мере одной сконструированной ацилазы пенициллина G по любому из пп.1-7 и инсулина; и экспонирование сконструированной ацилазы пенициллина G и инсулина в таких условиях, что сконструированная ацилаза пенициллина G ацилирует инсулин, тем самым получая ацилированный инсулин. В некоторых вариантах осуществления ацилирование проводят в присутствии метилфенилацетата. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, ацилирование происходит в любом из положений A1, B1 и/или B29 указанного инсулина. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, ацилирование происходит в положении A1 указанного инсулина, тогда как в некоторых альтернативных вариантах осуществления ацилирование происходит в положении B1 указанного инсулина, и в других вариантах осуществления ацилирование происходит в положении B29 указанного инсулина. В некоторых вариантах осуществления ацилирование происходит в положениях A1, B1 и/или B29 указанного инсулина. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, ацилирование происходит в положениях A1, B1 и B29 инсулина. В некоторых дополнительных вариантах осуществления способов, сконструированная ацилаза пенициллина G продуцирует более чем 90% более ацилированного инсулина по сравнению с получением ацилированного инсулина с помощью полипептида из SEQ ID № 2, 4, 12, 24, 40, 56, 70, 82, 100, 108, 110, 116, 136, 142, 154 и/или 160.

Настоящее изобретение также относится к композициям ацилированного инсулина, получаемым с использованием по меньшей мере одной сконструированной ацилазы пенициллина G, предусмотренной в настоящем описании. В некоторых дополнительных вариантах осуществления, настоящее изобретение предусматривает композиции, содержащие ацилированный инсулин, получаемый с использованием по меньшей мере одного способа, предусмотренного в настоящем описании.

#### **Краткое описание фигур**

На фиг. 1 приведена хроматограмма для аналитического способа, описанного в табл. 21.5, которую используют для того, чтобы количественно определять инсулин и порядок элюирования ацилированных продуктов.

На фиг. 2 приведены результаты экспериментов, описанных в примере 10.

На фиг. 3 приведены результаты экспериментов, описанных в примере 16.

#### **Описание изобретения**

Настоящее изобретение предусматривает сконструированные ацилазы пенициллина G (PGA), которые способны расщеплять пенициллин до фенилуксусной кислоты и 6-аминопенициллановой кислоты (6-APA), которая является ключевым промежуточным соединением в синтезе большого спектра β-лактамных антибиотиков. В частности, настоящее изобретение предусматривает сконструированные PGA, которые способны продуцировать монозащищенный или дизащищенный фенилацетатом инсулин посредством добавления защитной группы в положения A1, B1 или B29 свободного инсулина или удаления защитных групп из A1/B1/B29 тризащищенного инсулина или удаления A1/B1/B29 трифенилацетатных защитных групп для того, чтобы высвободить свободный инсулин.

В целом, встречаемые в природе PGA представляют собой гетеродимерные ферменты, состоящие из альфа-субъединицы и бета-субъединицы. В природе PGA дикого типа синтезируется в виде полипептида препро-PGA, содержащего N-концевой сигнальный пептид, который опосредует транслокацию в периплазму, и линкерную область, соединяющую C-конец альфа-субъединицы с N-концом бета-субъединицы. Протеолитическая обработка ведет к зрелому гетеродимерному ферменту. Межмолекулярная линкерная область также может выполнять функцию содействия надлежащей укладке фермента. PGA, предусмотренные в настоящем описании, основаны на PGA из *Kluuvera citrophila*, в которую вводили различные модификации для того, чтобы создавать усовершенствованные ферментативные свойства, как описано подробно далее.

Для описаний, предусмотренных в настоящем описании, использование формы единственного числа включает множественное число (и наоборот), пока конкретно не указано иное. Например, формы единственного числа включают множественное число до тех пор, пока контекст явно не указывает на иное. Аналогичным образом, "содержать", "содержит", "содержащий", "включать", "включает" и "включающий" являются взаимозаменяемыми и не предназначены для ограничения. Кроме того, следует понимать, что когда в описаниях различных вариантов осуществления используют термин "содержащий", специалисты в данной области поймут, что в некоторых конкретных случаях вариант осуществления можно альтернативно описывать с использованием формулировки "состоящий по существу из" или "со-

стоящий из".

Как приведенное выше общее описание, включая чертежи, так и последующее подробное описание являются лишь образцовыми и разъясняющими и не являются ограничением этого раскрытия. Кроме того, заголовки разделов, используемые в настоящем описании, служат только цели организации и их не следует толковать в качестве ограничения описываемого объекта изобретения.

#### **Определения**

Как используют в настоящем описании, следующие термины приведены в следующих значениях.

По отношению к настоящему раскрытию, технические и научные термины, используемые в описании в настоящем описании, должны иметь значения, в которых их обычно понимает специалист в данной области, пока конкретно не определено иное. Соответственно, следующие термины приведены в следующих значениях. Все патенты и публикации, в том числе все последовательности, раскрытые в таких патентах и публикациях, упоминаемых в настоящем описании, в явной форме включены по ссылке. Если не указано иное, практическая реализация настоящего изобретения включает общепринятые способы, широко используемые в молекулярной биологии, ферментации, микробиологии и связанных областях, которые известны специалистам в данной области. Пока в настоящем описании не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, как их обычно понимает специалист в области, к которой это изобретение относится. Несмотря на то, что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем описании, можно использовать при практической реализации или тестировании настоящего изобретения, описаны предпочтительные способы и материалы. В действительности, подразумевают, что настоящее изобретение не ограничено конкретными способами, протоколами и реактивами, описанными в настоящем описании, поскольку они могут варьировать, в зависимости от контекста, в котором их используют. Заголовки, предусмотренные в настоящем описании, не являются ограничениями для различных аспектов или вариантов осуществления настоящего изобретения.

Тем не менее, чтобы облегчать понимание настоящего изобретения, многие термины определены далее. Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Таким образом, предусмотрено, что каждый числовой диапазон, раскрытый в настоящем описании, охватывает каждый более узкий числовой диапазон, который попадает в такой более узкий числовой диапазон, как если бы все такие более узкие числовые диапазоны были в явной форме изложены в настоящем описании. Также предусмотрено, что каждое максимальное (или минимальное) числовое ограничение, раскрытое в настоящем описании, включает каждое меньшее (или большее) числовое ограничение, как если бы такие меньшие (или большие) числовые ограничения были в явной форме изложены в настоящем описании.

Как используют в настоящем описании, термин "содержащий" и его производные используют в их инклюзивном значении (т.е. эквиваленты термину "включающий" и соответствующим ему производным).

Как используют в настоящем описании и в приложенной формуле изобретения, форма единственного числа включает множественное число, пока контекст явно не указывает на иное. Таким образом, например, упоминание о "клетке-хозяине" включает множество таких клеток-хозяев.

Если не указано иное, нуклеиновые кислоты пишут слева направо в ориентации от 5' к 3' и аминокислотные последовательности пишут слева направо в ориентации от amino к карбокси соответственно.

Заголовки, предусмотренные в настоящем описании, не являются ограничениями для различных аспектов или вариантов осуществления изобретения, которые можно получить, обратившись к описанию в целом. Соответственно, термины, которые определены далее, более полно определены путем обращения к описанию в целом.

Как используют в настоящем описании, термины "белок", "полипептид" и "пептид" используют взаимозаменяемо в настоящем описании для обозначения полимера по меньшей мере двух аминокислот, ковалентно связанных амидной связью, независимо от длины или посттрансляционных модификаций (например, гликозилирования, фосфорилирования, липидизация, миристилирования, убиквитинилирования и т.д.). В это определение включены D- и L-аминокислоты и смеси D- и L-аминокислот.

Как используют в настоящем описании, "полинуклеотид" и "нуклеиновая кислота" относятся к двум или больше нуклеозидам, которые ковалентно связаны вместе. Полинуклеотид может полностью состоять из рибонуклеозидов (т.е. РНК), полностью состоять из 2'-дезоксирибонуклеотидов (т.е. ДНК) или смесей рибо- и 2'-дезоксирибонуклеозидов. Хотя нуклеозиды обычно связывают вместе через стандартные фосфодиэфирные связи, полинуклеотиды могут содержать одну или несколько нестандартных связей. Полинуклеотид может быть одноцепочечным или двухцепочечным или может содержать как одноцепочечные области, так и двухцепочечные области. Кроме того, хотя полинуклеотид обычно состоит из встречаемых в природе кодирующих нуклеиновых оснований (т.е. аденина, гуанина, урацила, тимина и цитозина), он может содержать одно или несколько модифицированных и/или синтетических нуклеиновых оснований (например, инозин, ксантин, гипоксантин и т.д.). Предпочтительно такие модифицированные или синтетические нуклеиновые основания будут кодирующими нуклеиновыми основаниями.

Как используют в настоящем описании, "степень строгости гибридизации" относится к условиям гибридизации, таким как условия промывания, при гибридизации нуклеиновых кислот. В целом, реакции

гибридизации осуществляют в условиях более низкой степени строгости, после чего следуют промывания переменной, но более высокой степени строгости. Термин "умеренно строгая гибридизация" относится к условиям, которые допускают связывание целевой ДНК с комплементарной нуклеиновой кислотой, которая обладает приблизительно 60% идентичностью, предпочтительно приблизительно 75% идентичностью, приблизительно 85% идентичностью с целевой ДНК; с более чем приблизительно 90% идентичностью с целевым полинуклеотидом. Образцовые умеренно строгие условия представляют собой условия, эквивалентные гибридизации в 50% формамиде, 5× растворе Денхарта, 5× SSPE, 0,2% SDS при 42°C, после чего следует промывание в 0,2× SSPE, 0,2% SDS при 42°C. "Гибридизация высокой степени строгости" в целом относится к условиям, которые составляют приблизительно 10°C или меньше от температуры теплового плавления  $T_m$ , как определяют в условиях раствора для определенной полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления условия высокой степени строгости относятся к условиям, которые допускают гибридизацию только тех последовательностей нуклеиновой кислоты, которые образуют стабильные гибриды в 0,018 M NaCl при 65°C (т.е. если гибрид не стабилен в 0,018 M NaCl при 65°C, он не будет стабилен в условиях с высокой строгостью, как предусмотрено в настоящем описании). Условия с высокой строгостью можно обеспечивать, например, посредством гибридизации в условиях, эквивалентных 50% формамиду, 5× раствору Денхарта, 5× SSPE, 0,2% SDS при 42°C, после чего следует промывание в 0,1× SSPE и 0,1% SDS при 65°C. Другие условия высокой степени строгости представляют собой гибридизацию в условиях, эквивалентных гибридизации в 5× SSC, содержащем 0,1% (мас.:об.) SDS при 65°C и промыванию в 0,1× SSC, содержащем 0,1% SDS, при 65°C. Другие условия гибридизации высокой степени строгости, а также умеренно строгие условия, известны специалистам в данной области.

Как используют в настоящем описании, "кодирующая последовательность" относится к той части нуклеиновой кислоты (например, гену), которая кодирует аминокислотную последовательность белка.

Как используют в настоящем описании, "с оптимизацией кодонов" относится к изменениям в кодонах полинуклеотида, кодирующего белок, на те, которые предпочтительно использует конкретный организм, так что кодируемый белок эффективно экспрессирует в организме, представляющем интерес. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотида, кодирующие ферменты PGA, могут быть с оптимизацией кодонов для оптимального получения из организма-хозяина, выбранного для экспрессии. Несмотря на то, что генетический код является вырожденным в том отношении, что большинство аминокислоты представлены несколькими кодонами, называемыми "синонимами" или "синонимическими" кодонами, хорошо известно, что использование кодонов конкретными организмами является неслучайным и смещенным в направлении конкретных кодонных триплетов. Это предпочтение кодонов может быть выше в отношении заданного гена, генов с общей функцией или происхождением от общего предка, сильно экспрессируемых белков в сравнении с белками с низким числом копий и агрегатных кодирующих белки областей в геноме организма. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотида, кодирующие ферменты PGA, могут быть с оптимизацией кодонов для оптимального получения из организма-хозяина, выбранного для экспрессии.

Как используют в настоящем описании, "кодона с предпочтительным, оптимальным, высоким предпочтением кодонов" относится взаимозаменяемо к кодонам, которые используют с более высокой частотой в кодирующих белок областях, чем другие кодона, которые кодируют ту же аминокислоту. Предпочтительные кодона можно определять по отношению к использованию кодонов в одном гене, наборе генов с общей функцией или происхождением, высоко экспрессируемых генах, частоте кодонов в агрегатных кодирующих белок областях всего организма, частоте кодонов в агрегатных кодирующих белок областях родственных организмов или их сочетаний. Кодона, частота которых возрастает вместе с уровнем экспрессии гена, обычно представляют собой оптимальные кодона для экспрессии. Известны различные способы для определения частоты кодонов (например, использование кодонов, относительное использование синонимических кодонов) и кодонных предпочтений у конкретных организмов, включая многопараметрический анализ, например, с использованием кластерного анализа или анализа соответствий, и эффективное число кодонов, используемых в гене (см., например, GCG CodonPreference, Genetics Computer Group Wisconsin Package; CodonW, John Peden, University of Nottingham; McInerney, Bioinform., 14:372-73 [1998]; Stenico et al., *Nucleic Acids Res.*, 22:437-46 [1994]; and Wright, *Ген* 87:23-29 [1990]). Таблицы использования кодонов доступны для растущего списка организмов (см., например, Wada et al., *Nucleic Acids Res.*, 20:2111-2118 [1992]; Nakamura et al., *Nucl. Acids Res.*, 28:292 [2000]; Duret, et al., выше; Henaut and Danchin, "Escherichia coli and Salmonella", Neidhardt, et al. (ред.), ASM Press, Washington D.C., [1996], стр. 2047-2066. Источник данных для получения использования кодонов может полагаться на любую доступную нуклеотидную последовательность, способную кодировать белок. Эти наборы данных включают последовательности нуклеиновой кислоты, о которых известно, что они фактически кодируют экспрессируемые белки (например, полные кодирующие белок последовательности - CDS), метки экспрессируемой последовательности (ESTS) или предсказанные кодирующие области геномных последовательностей (см., например, Uberbacher, *Meth. Enzymol.*, 266:259-281 [1996]; Tiwari et al., *Comput. Appl. Biosci.*, 13:263-270 [1997]).

Как используют в настоящем описании, "управляющую последовательность" определяют в настоящем описании как включающую все компоненты, которые необходимы или благоприятны для экспрессии полинуклеотида и/или полипептида по настоящему изобретению, каждая управляющая последовательность может быть нативной или чужеродной для полинуклеотида, представляющего интерес. Такие управляющие последовательности включают, но не ограничиваясь этим, лидерную последовательность, последовательность полиаденилирования, пропептидную последовательность, промотор, последовательность сигнального пептида и терминатор транскрипции.

Как используют в настоящем описании, "функционально связанную" определяют в настоящем описании как конфигурацию, в которой управляющую последовательность надлежащим образом размещают (т.е. в функциональной связи) в положении относительно полинуклеотида, представляющего интерес, так что управляющая последовательность управляет или регулирует экспрессию полинуклеотида и/или полипептида, представляющего интерес.

Как используют в настоящем описании, "промоторная последовательность" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которую распознает клетка-хозяин для экспрессии полинуклеотида, представляющего интерес, такого как кодирующая последовательность. Управляющая последовательность может содержать подходящую промоторную последовательность. Промоторная последовательность содержит транскрипционные управляющие последовательности, которые опосредуют экспрессию полинуклеотида, представляющего интерес. Промотор может представлять собой любую последовательность нуклеиновой кислоты, которая демонстрирует транскрипционную активность в клетке-хозяине, предпочтительно включая мутантные, усеченные и гибридные промоторы, и которую можно получать из генов, кодирующих внеклеточные или внутриклеточные полипептиды, гомологичные или гетерологичные для клетки-хозяина.

Как используют в настоящем описании, "встречаемая в природе" или "дикого типа" относится к форме, которую находят в природе. Например, встречаемые в природе или дикого типа полипептид или полинуклеотидная последовательность представляет собой последовательность, присутствующую в организме, которую можно из источника в природе и которую человек не модифицировал целенаправленно с помощью манипуляций.

Как используют в настоящем описании, "не встречаемый в природе", "сконструированный" и "рекомбинантный", когда используют в настоящем раскрытии со ссылкой на (например, клетку, нуклеиновую кислоту или полипептид), относится к материалу, или материалу, соответствующему природной или нативной форме материала, который модифицирован таким образом, который иначе не существовал бы в природе. В некоторых вариантах осуществления материал является идентичным встречаемому в природе материалу, но его получают или создают из синтетических материалов и/или посредством манипуляции с использованием рекомбинантных способов. Неограничивающие примеры включают, среди прочих, рекомбинантные клетки, экспрессирующие гены, которые не встречаются в нативной (не рекомбинантной) форме клетки, или экспрессирующие нативные гены, которые иначе экспрессируются на другом уровне.

Как используют в настоящем описании, "процентная доля идентичности последовательностей", "процент идентичности" и "процент идентичных" относятся к сравнению между полинуклеотидными последовательностями или полипептидными последовательностями, и их определяют посредством сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, где часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. пропуски) по сравнению с эталонной последовательностью для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процентную долю вычисляют посредством определения числа положений, в которых встречаются идентичные основания нуклеиновых кислот или аминокислотные остатки в обеих последовательностях, или основание нуклеиновой кислоты или аминокислотный остаток выравнивают с пропуском, чтобы получить число совпадающих положений, и делят число совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножают результат на 100, чтобы получить процентную долю идентичности последовательностей. Определение оптимального выравнивания и процента идентичности последовательностей осуществляют с использованием алгоритмов BLAST и BLAST 2.0 (см., например, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 [1990]; и Altschul et al., *Nucl. Acids Res.* 3389-3402 [1977]). Программное обеспечение для осуществления анализа BLAST общедоступно через веб-сайт National Center for Biotechnology Information.

В кратком изложении, анализ BLAST включает сначала идентификацию пар последовательностей с высокими оценками (HSP) посредством идентификации коротких слов длины  $W$  в запросной последовательности, которые или совпадают или отвечают определенному порогу оценки с положительным значением  $T$ , когда выравнивают со словом той же длины в последовательности из базы данных.  $T$  обозначают как порог оценки соседних слов (Altschul et al., выше). Эти начальные совпадения соседних слов действуют в качестве затравок для инициации поиска для того, чтобы находить более длинные HSP, содержащие их. Затем совпадения слов расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока можно увеличивать кумулятивную оценку выравнивания. Кумулятивные оценки вычисляют с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров  $M$  (награда за пару совпа-

дающих остатков; всегда  $>0$ ) и  $N$  (штраф за несопадающие остатки; всегда  $<0$ ). Для аминокислотных последовательностей матрицу замен используют для того, чтобы вычислять кумулятивную оценку. Расширение совпадений слов в каждом направлении останавливают, когда: кумулятивная оценка выравнивания снижается на количество  $X$  от ее максимального достигнутого значения; кумулятивная оценка снижается до нуля или ниже, из-за накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательными оценками; или достигают конца любой из последовательностей. Параметры алгоритма BLAST  $W$ ,  $T$  и  $X$  определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используют по умолчанию длину слова ( $W$ ) 11, ожидание ( $E$ ) 10,  $M=5$ ,  $N=4$  и сравнение обеих нитей. Для аминокислотных последовательностей, в программе BLASTP используют по умолчанию длину слова ( $W$ ) 3, ожидание ( $E$ ) 10 и матрицу замен BLOSUM62 (см., например, Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 [1989]).

В данной области доступны и известны многие другие алгоритмы, которые функционируют аналогично BLAST, предоставляя процент идентичности для двух последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить с использованием любого подходящего известного в данной области способа (например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith и Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 [1981]; с помощью алгоритма выравнивания по гомологии Needleman и Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 [1970]; с помощью способа поиска сходства Pearson и Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 [1988]; и/или с помощью компьютерных реализаций этих алгоритмов [GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в GCG Wisconsin Software Package]), или путем визуального просмотра, используя способы, общеизвестные в данной области. Дополнительно, при определении выравнивания последовательностей и процента идентичности последовательностей можно использовать программы BESTFIT или GAP в GCG Wisconsin Software Package (Accelrys, Madison WI), используя предусмотренные параметры по умолчанию.

Как используют в настоящем описании, "существенная идентичность" относится к полинуклеотидной или полипептидной последовательности, которая обладает по меньшей мере 80% идентичности последовательностей, по меньшей мере 85% идентичности и 89-95% идентичности последовательностей, более обычно по меньшей мере 99% идентичности последовательностей по сравнению с эталонной последовательностью в окне сравнения по меньшей мере в 20 положений остатков, часто в окне по меньшей мере 30-50 остатков, где процентную долю идентичности последовательностей вычисляют посредством сравнения эталонной последовательности с последовательностью, которая содержит делеции или добавления, которые составляют 20% или меньше от эталонной последовательности в окне сравнения. В конкретных вариантах осуществления, применяемых к полипептидам, термин "существенная идентичность" обозначает, что две полипептидные последовательности, когда выровнены оптимально, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием весов пропусков по умолчанию, имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательностей, предпочтительно по меньшей мере 89% идентичности последовательностей, по меньшей мере 95% идентичности последовательностей или больше (например, 99% идентичности последовательностей). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления положения остатков, которые не идентичны, отличаются консервативными аминокислотными заменами.

Как используют в настоящем описании, "эталонная последовательность" относится к определенной последовательности, с которой сравнивают другую последовательность. Эталонная последовательность может представлять собой подмножество более крупной последовательности, например, сегмент полноразмерной последовательности гена или полипептида. В целом, эталонная последовательность составляет по меньшей мере 20 нуклеотидных или аминокислотных остатков в длину, по меньшей мере 25 остатков в длину, по меньшей мере 50 остатков в длину или полную длину нуклеиновой кислоты или полипептида. Поскольку каждый из двух полинуклеотидов или полипептидов может (1) содержать последовательность (т.е. часть полной последовательности), которая схожа между двумя последовательностями, и (2) дополнительно содержать последовательность, которая расходится между двумя последовательностями, сравнение последовательностей между двумя (или больше) полинуклеотидами или полипептидами обычно осуществляют посредством сравнения последовательностей двух полинуклеотидов в окне сравнения для того, чтобы идентифицировать и сравнивать локальные области сходства последовательностей. Термин "эталонная последовательность" не предназначен для ограничения последовательностями дикого типа, и может включать сконструированные или измененные последовательности. Например, в некоторых вариантах осуществления "эталонная последовательность" может представлять собой предварительно сконструированную или измененную аминокислотную последовательность.

Как используют в настоящем описании, "окно сравнения" относится к умозрительному сегменту из по меньшей мере приблизительно 20 непрерывных нуклеотидных положений или аминокислотных остатков, в котором последовательность можно сравнивать с эталонной последовательностью из по меньшей мере 20 непрерывных нуклеотидов или аминокислот и где часть последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. пропуски) в 20% или меньше по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавления или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Окно сравнения может быть длиннее 20 непрерывных остатков и необязательно

зательно включает 30, 40, 50, 100 или более длинные окна.

Как используют в настоящем описании, "соответствующий", "в отношении" и "относительно", когда используют в контексте нумерации данной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности, относятся к нумерации остатков конкретной эталонной последовательности, когда данную аминокислотную или полинуклеотидную последовательность сравнивают с эталонной последовательностью. Другими словами, номер остатка или положение остатка в данном полимере обозначают относительно эталонной последовательности, а не по фактическому нумерационному положению остатка в данной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности. Например, заданную аминокислотную последовательность, такую как ту, что у сконструированной PGA, можно выравнивать с эталонной последовательностью посредством введения пропусков для того, чтобы оптимизировать совпадения остатков между двумя последовательностями. В этих случаях, несмотря на то, что присутствуют пропуски, нумерацию остатка в заданной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности выполняют относительно эталонной последовательности, с которой ее выравнивали. Как используют в настоящем описании, упоминание о положении остатка, таком как "Xn", как дополнительно описано далее, следует толковать как указание на "соответствующий остаток", пока конкретно не указано иное. Таким образом, например, "X94" относится к любой аминокислоте в положении 94 в полипептидной последовательности.

Как используют в настоящем описании, "усовершенствованное свойство фермента" относится к PGA, которая проявляет усовершенствование любого свойства фермента по сравнению с эталонной PGA. Для сконструированных полипептидов PGA, описанных в настоящем описании, сравнение в целом выполняют с ферментом PGA дикого типа, несмотря на то, что в некоторых вариантах осуществления эталонной PGA может быть другая усовершенствованная сконструированная PGA. Свойства фермента, для которых усовершенствование желательно, включают, но не ограничиваясь этим, ферментативную активность (которую можно выражать в единицах процентов превращения субстрата за конкретное время реакции с использованием конкретного количества PGA), хемоселективность, тепловую стабильность, стабильность в растворителе, рН профиль активности, требования к кофакторам, стойкость к ингибиторам (например, ингибирование продуктом), стереоспецифичность и стереоселективность (включая энантиоселективность).

Как используют в настоящем описании, "увеличенная ферментативная активность" относится к усовершенствованному свойству сконструированных полипептидов PGA, которую может представлять увеличение удельной активности (например, получаемый продукт/время/масса белка) или увеличение процента превращения субстрата в продукт (например, процент превращения начального количества субстрата в продукт за конкретный период времени с использованием конкретного количества PGA) по сравнению с эталонным ферментом PGA. Образцовые способы определения активности фермента приведены в примерах. Можно влиять на любое свойство, относящееся к активности фермента, включая классические свойства фермента  $K_m$ ,  $V_{max}$  или  $k_{cat}$ , изменения которых могут вести к увеличенной ферментативной активности. Усовершенствование активности фермента может составлять приблизительно от 1,5 крат ферментативной активности соответствующего фермента PGA дикого типа, до 2 крат, 5 крат, 10 крат, 20 крат, 25 крат, 50 крат, 75 крат, 100 крат или больше ферментативной активности относительно встречаемой в природе PGA или другой сконструированной PGA, из которой получали полипептиды PGA. В конкретных вариантах осуществления, сконструированный фермент PGA проявляет усовершенствованную ферментативную активность в диапазоне от 1,5 до 50 раз, от 1,5 до 100 раз более чем та, что у родительского фермента PGA. Специалист в данной области поймет, что активность любого фермента ограничена диффузией так, что скорость каталитического оборота не может превышать скорости диффузии субстрата, включая любые необходимые кофакторы. Теоретический максимум предела диффузии, или  $k_{cat}/K_m$ , в целом составляет приблизительно от  $10^8$  до  $10^9$  ( $M^{-1} s^{-1}$ ). Таким образом, любые усовершенствования активности фермента PGA будут иметь верхний предел, связанный со скоростью диффузии субстратов, на которые действует фермент PGA. Активность PGA можно измерять с помощью любого одного из стандартных анализов, используемых для измерения высвобождения фенилуксусной кислоты при расщеплении пенициллина G, например, посредством титрования (см., например, Simons and Gibson, *Biotechnol. Tech.*, 13:365-367 [1999]). В некоторых вариантах осуществления активность PGA можно измерять с использованием 6-нитрофенилацетамидобензойной кислоты (NIPAB), продукт расщепления которой 5-амино-2-нитробензойная кислота поддается обнаружению спектрофотометрически ( $\lambda_{max}=405$  нм). Сравнение активностей ферментов выполняют с использованием определенного препарата фермента, определенного анализа при определенных условиях и одного или нескольких определенных субстратов, как дополнительно описано подробно в настоящем описании. В целом, когда сравнивают лизаты, определяют число клеток и количество анализируемого белка, а также использование идентичных экспрессирующих систем и идентичных клеток-хозяев для того, чтобы минимизировать вариации в количестве фермента, продуцируемого клетками-хозяевами и присутствующего в лизатах.

Как используют в настоящем описании, "увеличенная ферментативная активность" и "увеличенная активность" относятся к усовершенствованному свойству сконструированного фермента, которое может быть представлено увеличением удельной активности (например, получаемый продукт/время/масса бел-

ка) или увеличением процента превращения субстрата в продукт (например, процент превращения начального количества субстрата в продукт за конкретный период времени с использованием конкретного количества PGA) по сравнению с эталонным ферментом, как раскрыто в настоящем описании. Можно влиять на любое свойство, относящееся к активности фермента, включая классические свойства фермента  $K_m$ ,  $V_{max}$  или  $k_{cat}$ , изменения которых могут вести к увеличенной ферментативной активности. В некоторых вариантах осуществления ферменты PGA, предусмотренные в настоящем описании, высвобождают инсулин посредством удаления трифенилацетатных защитных групп с конкретных остатков в инсулине. Сравнение активностей ферментов выполняют с использованием определенного препарата фермента, определенного анализа при определенных условиях и одного или нескольких определенных субстратов, как дополнительно описано подробно в настоящем описании. В целом, когда сравнивают ферменты в клеточных лизатах, определяют число клеток и количество анализируемого белка, а также использование идентичных экспрессирующих систем и идентичных клеток-хозяев для того, чтобы минимизировать вариации в количестве фермента, продуцируемого клетками-хозяевами и присутствующего в лизатах.

Как используют в настоящем описании, "превращение" относится к ферментативному превращению субстрата в соответствующий продукт.

Как используют в настоящем описании, "процент превращения" относится к проценту субстрата, который превращают в продукт за определенный период времени в конкретных условиях. Таким образом, например, "ферментативную активность" или "активность" полипептида PGA можно выражать в виде "процента превращения" субстрата в продукт.

Как используют в настоящем описании, "хемоселективность" относится к предпочтительному образованию в химической или ферментативной реакции одного продукта относительно других.

Как используют в настоящем описании, "термостабильный" используют, чтобы отослать к полипептиду, который устойчив к инактивации под воздействием набора температурных условий (например, 40-80°C) в течение определенного периода времени (например, 0,5-24 ч), по сравнению с необработанным ферментом, таким образом сохраняя определенный уровень остаточной активности (например, более чем 60-80%) после воздействия повышенных температур.

Как используют в настоящем описании, "стабильный в растворителе" относится к способности полипептида поддерживать схожую активность (например, более чем, например, 60-80%) после воздействия различных концентраций (например, 5-99%) растворителя (например, изопропилового спирта, тетрагидрофурана, 2-метилтетрагидрофурана, ацетона, толуола, бутилацетата, трет-бутилметилового эфира и т.д.) в течение определенного периода времени (например, 0,5-24 ч) по сравнению с необработанным ферментом.

Как используют в настоящем описании, "pH стабильный" относится к полипептиду PGA, который сохраняет схожую активность (например, более чем 60-80%) после воздействия высокого или низкого pH (например, 4,5-6 или 8-12) в течение определенного периода времени (например, 0,5-24 ч) по сравнению с необработанным ферментом.

Как используют в настоящем описании, "термостабильный и стабильный в растворителе" относится к полипептиду PGA, который и термостабилен и стабилен в растворителе.

Как используют в настоящем описании, "гидрофильная аминокислота или остаток" относится к аминокислоте или остатку, имеющим боковую цепь, проявляющую гидрофобность меньше нуля в соответствии с нормализованной консенсусной шкалой гидрофобности по Eisenberg et al., (Eisenberg et al., J. Mol. Biol., 179:125-142 [1984]). Генетически кодируемые гидрофильные аминокислоты включают L-Thr (T), L-Ser (S), L-His (H), L-Glu (E), L-Asn (N), L-Gln (Q), L-Asp (D), L-Lys (K) и L-Arg (R).

Как используют в настоящем описании, "кислая аминокислота или остаток" относится к гидрофильной аминокислоте или остатку, имеющим боковую цепь, проявляющую значение pK меньше приблизительно 6, когда аминокислота входит в пептид или полипептид. Кислые аминокислоты обычно имеют отрицательно заряженные боковые цепи при физиологическом pH из-за утраты иона водорода. Генетически кодируемые кислые аминокислоты включают L-Glu (E) и L-Asp (D).

Как используют в настоящем описании, "основная аминокислота или остаток" относится к гидрофильным аминокислоте или остатку, имеющим боковую цепь, проявляющую значение pK более приблизительно 6, когда аминокислота входит в пептид или полипептид. Основные аминокислоты обычно имеют положительно заряженные боковые цепи при физиологическом pH из-за ассоциации с ионом гидрония. Генетически кодируемые основные аминокислоты включают L-Arg (R) и L-Lys (K).

Как используют в настоящем описании, "полярная аминокислота или остаток" относится к гидрофильным аминокислоте или остатку, имеющим боковую цепь, которая не заряжена при физиологическом pH, но которая имеет по меньшей мере одну связь, в которой пара электронов, общая для двух атомов, удерживается более близко одним из атомов. Генетически кодируемые полярные аминокислоты включают L-Asn (N), L-Gln (Q), L-Ser (S) и L-Thr (T).

Как используют в настоящем описании, "гидрофобная аминокислота или остаток" относится к аминокислоте или остатку, имеющим боковую цепь, проявляющую гидрофобность более нуля в соответствии с нормализованной консенсусной шкалой гидрофобности по Eisenberg et al., (Eisenberg et al., J. Mol. Biol.,

179:125-142 [1984]). Генетически кодируемые гидрофобные аминокислоты включают L-Pro (P), L-Ile (I), L-Phe (F), L-Val (V), L-Leu (L), L-Trp (W), L-Met (M), L-Ala (A) и L-Tyr (Y).

Как используют в настоящем описании, "ароматическая аминокислота или остаток" относится к гидрофильной или гидрофобной аминокислоте или остатку, имеющим боковую цепь, которая содержит по меньшей мере одно ароматическое или гетероароматическое кольцо. Генетически кодируемые ароматические аминокислоты включают L-Phe (F), L-Tyr (Y) и L-Trp (W). Несмотря на то, что вследствие рKa его гетероароматического атома азота, L-His (H) иногда классифицируют как основной остаток, или как ароматический остаток, поскольку его боковая цепь содержит гетероароматическое кольцо, в настоящем описании гистидин классифицируют как гидрофильный остаток или как "конформационно затрудненный остаток" (см. далее).

Как используют в настоящем описании, "конформационно затрудненная аминокислота или остаток" относится к аминокислоте или остатку, которые имеют конформационно затрудненную геометрию. в настоящем описании конформационно затрудненные остатки включают L-Pro (P) и L-His (H). Гистидин имеет конформационно затрудненную геометрию, поскольку он имеет относительно небольшое имидазольное кольцо. Пролин имеет конформационно затрудненную геометрию, поскольку он также имеет пятичленное кольцо.

Как используют в настоящем описании, "неполярная аминокислота или остаток" относится к гидрофобной аминокислоте или остатку, имеющим боковую цепь, которая не заряжена при физиологическом pH и которая имеет связи, в которых пара электронов, обычно общих для двух атомов, в целом удерживается в равной мере каждым из двух атомов (т.е. боковая цепь не является полярной). Генетически кодируемые неполярные аминокислоты включают L-Gly (G), L-Leu (L), L-Val (V), L-Ile (I), L-Met (M) и L-Ala (A).

Как используют в настоящем описании, "алифатическая аминокислота или остаток" относится к гидрофобной аминокислоте или остатку, имеющему алифатическую углеводородную боковую цепь.

Генетически кодируемые алифатические аминокислоты включают L-Ala (A), L-Val (V), L-Leu (L) и L-Ile (I).

Следует отметить, что цистеин (или "L-Cys" или "[C]") необычен в том отношении, что он может образовывать дисульфидные мостики с другими аминокислотами L-Cys (C) или другим сульфанил- или сульфгидрил-содержащими аминокислотами. "Цистеинподобные остатки" включают цистеин и другие аминокислоты, которые содержат сульфгидрильные фрагменты, которые доступны для формирования дисульфидных мостиков. Способность L-Cys (C) (и других аминокислот с SH-содержащими боковыми цепями) существовать в пептиде или в восстановленной форме со свободным SH или окисленной форме с дисульфидным мостиком, влияет на то, приносит ли L-Cys (C) суммарный гидрофобный или гидрофильный характер в пептид. Хотя L-Cys (C) проявляет гидрофобность 0,29 в соответствии с нормализованной консенсусной шкалой по Eisenberg (Eisenberg et al., 1984, выше), следует понимать, что для целей настоящего раскрытия L-Cys (C) относят к его собственной уникальной группе.

Как используют в настоящем описании, "небольшая аминокислота или остаток" относится к аминокислоте или остатку, имеющим боковую цепь, которая состоит из всего трех или меньше атомов углерода и/или гетероатомов (не включая  $\alpha$ -углерод и водороды). Малые аминокислоты или остатки дополнительно можно относить к алифатическим, неполярным, полярным или кислым небольшим аминокислотам или остатками, в соответствии с вышеприведенными определениями. Генетически кодируемые небольшие аминокислоты включают L-Ala (A), L-Val (V), L-Cys (C), L-Asn (N), L-Ser (S), L-Thr (T) и L-Asp (D).

Как используют в настоящем описании, "гидроксилсодержащая аминокислота или остаток" относится к аминокислоте, содержащей гидроксильный (-OH) фрагмент.

Генетически кодируемые гидроксилсодержащие аминокислоты включают L-Ser (S) L-Thr (T) и L-Tyr (Y).

Как используют в настоящем описании, "различие аминокислот" и "различие остатков" относится к различию аминокислотного остатка в определенном положении полипептидной последовательности относительно аминокислотного остатка в соответствующем положении в эталонной последовательности. Положения различных аминокислот в целом обозначают в настоящем описании как "X<sub>n</sub>", где n относится к соответствующему положению в эталонной последовательности, на которой основано отличие остатков. Например, "различие остатков в положении X<sub>40</sub> по сравнению с SEQ ID № 2" относится к отличию аминокислотного остатка в положении полипептида, соответствующем положению 40 в SEQ ID № 2. Таким образом, если эталонный полипептид из SEQ ID № 2 имеет гистидин в положении 40, то "различие остатков в положении X<sub>40</sub> по сравнению с SEQ ID № 2" относится к замене аминокислоты любым остатком, отличным от гистидина, в положении полипептида, соответствующем положению 40 в SEQ ID № 2. В большинстве случаев в настоящем описании, конкретное различие аминокислотных остатков в определенном положении указывают как "X<sub>n</sub>Y", где "X<sub>n</sub>" представляет собой конкретное соответствующее положение, как описано выше, и "Y" представляет собой однобуквенный идентификатор аминокислоты, встречающейся в сконструированном полипептиде (т.е. другой остаток, нежели в эталонном полипептиде). В некоторых случаях, настоящее раскрытие также предусматривает конкретные различия

аминокислот, обозначаемые стандартной записью "AnB", где A представляет собой однобуквенный идентификатор остатка в эталонной последовательности, "n" представляет собой номер положения остатка в эталонной последовательности и B представляет собой однобуквенный идентификатор замены остатка в последовательности сконструированного полипептида. В некоторых случаях, полипептид по настоящему раскрытию может содержать одно или несколько различных аминокислотных остатков относительно эталонной последовательности, которые показывает список конкретных положений, где присутствуют различия остатков относительно эталонной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, где можно использовать более чем одну аминокислоту в конкретном положении остатка полипептида, различные аминокислотные остатки, которые можно использовать, разделяют с помощью "/" (например, X192A/G). Настоящее раскрытие включает сконструированные полипептидные последовательности, содержащие одно или несколько различных аминокислот, которые включают консервативные и/или неконсервативные аминокислотные замены. Аминокислотные последовательности конкретных рекомбинантных полипептидов карбоангидразы, включенные в список последовательностей по настоящему раскрытию, содержат начальный остаток метионина (M) (т.е. M представляет положение остатка 1). Однако специалист в данной области поймет, что этот начальный остаток метионина можно удалять с помощью биологических механизмов процессинга, например, в системе трансляции в клетке-хозяине или *in vitro*, чтобы создавать зрелый белок, не содержащий начальный остаток метионина, но в остальном сохраняющий свойства фермента. Следовательно, термин "различия аминокислотных остатков относительно SEQ ID № 2 в положении Xn", как используют в настоящем описании, может относиться к положению "Xn" или соответствующему положению (например, положению (X-1)n) в эталонной последовательности, которая обработана с тем, чтобы начальный метионин отсутствовал.

Как используют в настоящем описании, фраза "консервативные аминокислотные замены" относится к взаимозаменяемости остатков, имеющих схожие боковые цепи, и, таким образом, обычно включает замену аминокислоты в полипептиде на аминокислоты в том же или сходно определяемом классе аминокислот. В качестве примера и не ограничения, в некоторых вариантах осуществления аминокислоту с алифатической боковой цепью заменяют на другую алифатическую аминокислоту (например, аланин, валин, лейцин и изолейцин); аминокислоту с гидроксильной боковой цепью заменяют на другую аминокислоту с гидроксильной боковой цепью (например, серин и треонин); аминокислоты, имеющие ароматические боковые цепи, заменяют на другую аминокислоту, имеющую ароматическую боковую цепь (например, фенилаланин, тирозин, триптофан и гистидин); аминокислоту с основной боковой цепью заменяют на другую аминокислоту с основной боковой цепью (например, лизин и аргинин); аминокислоту с кислой боковой цепью заменяют на другую аминокислоту с кислой боковой цепью (например, аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота); и/или гидрофобную или гидрофильную аминокислоту заменяют на другую гидрофобную или гидрофильную аминокислоту, соответственно. Образцовые консервативные замены приведены в табл. 1.

Таблица 1. Образцовые консервативные аминокислотные замены

Остаток	Возможные консервативные замены
A, L, V, I	Другая алифатическая (A, L, V, I) Другая неполярная (A, L, V, I, G, M)
G, M	Другая неполярная (A, L, V, I, G, M)
D, E	Другая кислая (D, E)
K, R	Другая основная (K, R)
N, Q, S, T	Другая полярная
H, Y, W, F	Другая ароматическая (H, Y, W, F)
C, P	Неполярная

Как используют в настоящем описании, фраза "неконсервативная замена" относится к замене аминокислоты в полипептиде на аминокислоту со значительно отличающимися свойствами боковой цепи. Неконсервативные замены позволяют использовать аминокислоты между определенными группами, а не внутри них, и влияют на (a) структуру пептидного остова в области замены (например, пролин вместо глицина) (b) заряд или гидрофобность или (c) объем боковой цепи. В качестве примера и не ограничения, образцовая неконсервативная замена может представлять собой кислую аминокислоту, заменяемую на основную или алифатическую аминокислоту; ароматическую аминокислоту, заменяемую на маленькую аминокислоту; и гидрофильную аминокислоту, заменяемую на гидрофобную аминокислоту.

Как используют в настоящем описании, "делеция" относится к модификации полипептида посредством удаления одной или нескольких аминокислот из эталонного полипептида. Делеции могут включать удаление 1 или больше аминокислот, 2 или больше аминокислот, 5 или больше аминокислот, 10 или больше аминокислот, 15 или больше аминокислот или 20 или больше аминокислот, вплоть до 10% от общего числа аминокислот или вплоть до 20% от общего числа аминокислот, образующих полипептид, при сохранении ферментативной активности и/или сохранении усовершенствованных свойств скон-

руированного фермента. Делеции могут быть направлены на внутренние части и/или концевые части полипептида. В различных вариантах осуществления делеция может содержать непрерывный сегмент или может быть прерывающейся.

Как используют в настоящем описании, "инсерция" относится к модификации полипептида посредством добавления одной или нескольких аминокислот в эталонный полипептид. В некоторых вариантах осуществления усовершенствованные сконструированные ферменты PGA содержат инсерции одной или нескольких аминокислот во встречаемом в природе полипептиде PGA, а также инсерции одной или нескольких аминокислот в сконструированных полипептидах PGA. Инсерции могут находиться во внутренних частях полипептида или на карбокси- или аминоконце. Инсерции, как используют в настоящем описании, включают слитые белки как они известны в данной области. Инсерция может представлять собой непрерывный сегмент аминокислот или может быть разделена одной или несколькими аминокислотами во встречаемом в природе полипептиде.

Термин "набор замен аминокислот" или "набор замен" относится к группе замен аминокислот в полипептидной последовательности, по сравнению с эталонной последовательностью. Набор замен может иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или больше замен аминокислот. В некоторых вариантах осуществления набор замен относится к набору замен аминокислот, который присутствует в любом из вариантов PGA, перечисленных в таблицах, приведенных в примерах.

Как используют в настоящем описании, "фрагмент" относится к полипептиду, который имеет аминоконцевую и/или карбоксиконцевую делецию, но где остальная аминокислотная последовательность идентична соответствующим положениям в последовательности. Фрагменты обычно имеют приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 98% или приблизительно 99% полноразмерного полипептида PGA, например, полипептида из SEQ ID № 2. В некоторых вариантах осуществления фрагмент является "биологически активным" (т.е. он проявляет ту же ферментативную активность, что и полноразмерная последовательность).

Как используют в настоящем описании, "выделенный полипептид" относится к полипептиду, который по существу отделяют от других контаминантов, которые в природе сопутствуют ему, например, белок, липиды и полинуклеотиды. Термин охватывает полипептиды, которые удалены из или очищены от встречаемого в природе окружения или экспрессирующей системы (например, клетка-хозяин или синтез *in vitro*). Усовершенствованные ферменты PGA могут присутствовать в клетке, присутствовать в клеточной среде или могут быть получены в различных формах, таких как лизаты или выделенные препараты. По существу, в некоторых вариантах осуществления сконструированные полипептиды PGA по настоящему раскрытию могут представлять собой выделенный полипептид.

Как используют в настоящем описании, "по существу чистый полипептид" относится к композиции, в которой частицы полипептида представляют собой преобладающие присутствующие частицы (т.е. на молярной или массовой основе, он является более многочисленным, чем любые другие индивидуальные макромолекулярные частицы в композиции), и в целом представляет собой в значительной степени очищенную композицию, когда рассматриваемые частицы составляют по меньшей мере приблизительно 50% присутствующих макромолекулярных частиц по молям или % массы. В целом, композиция по существу чистого сконструированного полипептида PGA содержит приблизительно 60% или больше, приблизительно 70% или больше, приблизительно 80% или больше, приблизительно 90% или больше, приблизительно 91% или больше, приблизительно 92% или больше, приблизительно 93% или больше, приблизительно 94% или больше, приблизительно 95% или больше, приблизительно 96% или больше, приблизительно 97% или больше, приблизительно 98% или больше или приблизительно 99% от всех макромолекулярных частиц по молям или % массы, присутствующих в композиции. Частицы растворителя, низкомолекулярные соединения (<500 Да) и частицы элементарных ионов не считают макромолекулярными частицами. В некоторых вариантах осуществления выделенный усовершенствованный полипептид PGA представляет собой композицию по существу чистого полипептида.

Как используют в настоящем описании, когда используют по отношению к нуклеиновой кислоте или полипептиду, термин "гетерологичный" относится к последовательности, которую обычно организм (например, организм дикого типа) не экспрессирует и не секретирует. В некоторых вариантах осуществления термин охватывает последовательность, которая содержит две или больше подпоследовательностей, которые не встречаются в той же связи друг с другом, как их обычно находят в природе, или является рекомбинантно сконструированной так, что ее уровень экспрессии или физическую связь с другими нуклеиновыми кислотами или другими молекулами в клетке или структуру обычно не встречаются в природе. Например, гетерологичную нуклеиновую кислоту обычно получают рекомбинантно, имея две или больше последовательностей из несвязанных генов, которые устроены таким образом, который не находят в природе (например, открытая рамка считывания (ORF) нуклеиновой кислоты по изобретению функционально связана с промоторной последовательностью, вставленной в экспрессирующую кассету, такую как вектор). В некоторых вариантах осуществления "гетерологичный полинуклеотид" относится к любому полинуклеотиду, который вводят в клетку-хозяина с помощью лабораторных приемов и который включает полинуклеотиды, которые удаляют из клетки-хозяина, подвергаемой лабораторной манипуляции, и затем повторно вводят в клетку-хозяина.

Как используют в настоящем описании, "подходящие условия реакции" относятся к тем условиям в растворе биокаталитической реакции (например, диапазонам загрузки фермента, загрузки субстрата, загрузки кофакторов, температуре, pH, буферам, сорастворителям и т. д.), при которых полипептид PGA по настоящему раскрытию способен высвободить свободный инсулин посредством удаления трифенилацетатных защитных групп. Образцовые "подходящие условия реакции" предусмотрены в настоящем раскрытии и проиллюстрированы примерами.

Как используют в настоящем описании, "загрузка", например, в "загрузке соединения", "загрузке фермента" или "загрузке кофактора" относится к концентрации или количеству компонента в реакционной смеси в начале реакции.

Как используют в настоящем описании, "субстрат" в контексте опосредованного биокатализатором процесса относится к соединению или молекуле, на которые действует биокатализатор.

Как используют в настоящем описании, "продукт" в контексте опосредованного биокатализатором процесса относится к соединению или молекуле, являющимся результатом действия биокатализатора.

Как используют в настоящем описании, "уравнивание", как используют в настоящем описании, относится к процессу, ведущему к равновесной концентрации химических частиц в химической или ферментативной реакции (например, взаимопревращение двух частиц А и В), включая взаимопревращение стереоизомеров, как определяют с помощью прямой константы скорости и обратной константы скорости химической или ферментативной реакции.

Как используют в настоящем описании, "ацилаза" и "ацилтрансферазы", используют взаимозаменяемо, чтобы отослать к ферментам, которые способны к переносу ацильной группы с донора на акцептор, чтобы формировать сложные эфиры или амиды. Опосредованная ацилазой обратная реакция ведет к гидролизу сложного эфира или амида.

Как используют в настоящем описании, "пенициллин G" и "бензилпенициллин" относятся к антибиотикам, также известному как (2S,5R,6R)-3,3-диметил-7-оксо-6-(2-фенилацетамидо)-4-гидро-1-азабензодиазепин-2-карбоновая кислота (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S). В первую очередь, он эффективен против грамположительных организмов, хотя некоторые грамотрицательные организмы также восприимчивы к нему.

Как используют в настоящем описании, "ацилазу пенициллина G" и "PGA" используют взаимозаменяемо, чтобы отослать к ферменту, обладающему способностью опосредовать расщепление пенициллина G (бензилпенициллина) до фенилуксусной кислоты (PHA) и 6-аминопенициллановой кислоты (6-APA). В некоторых вариантах осуществления активность PGA может быть основана на расщеплении модельных субстратов, например, на расщеплении 6-нитро-3-(фенилацетамид)бензойной кислоты до фенилуксусной кислоты и 5-амино-2-нитробензойной кислоты. PGA также способны осуществлять обратную реакцию переноса ацильной группы с донора ацила на акцептор ацила. PGA, как обозначают в настоящем описании, включают встречаемые в природе PGA (дикого типа), а также не встречаемые в природе ферменты PGA, включающие один или несколько сконструированных полипептидов, создаваемых путем манипуляции человека. Ген PGA дикого типа представляет собой гетеродимер, состоящий из альфа-субъединицы (23,8 кДа) и бета-субъединицы (62,2 кДа), связанных спейсерной областью в 54 аминокислоты. Из-за присутствия спейсерной области, необходима стадия аутопроцессинга для того, чтобы формировать активный белок.

Как используют в настоящем описании, "донор ацила" относится к той части субстрата ацилазы, которая дает ацильную группу акцептору ацила для того, чтобы формировать сложные эфиры или амиды.

Как используют в настоящем описании, "акцептор ацила" относится к той части субстрата ацилазы, которая принимает ацильную группу от донора ацила для того, чтобы формировать сложные эфиры или амиды.

Как используют в настоящем описании, "последовательность α-цепи" относится к аминокислотной последовательности, которая соответствует (например, обладает по меньшей мере 85% идентичностью) остаткам в положениях с 27 до 235 в SEQ ID № 2. Как используют в настоящем описании, одноцепочечный полипептид может содержать "последовательность отцепи" и дополнительную последовательность(и).

Как используют в настоящем описании, "последовательность β-цепи" относится к аминокислотной последовательности, которая соответствует (например, обладает по меньшей мере 85% идентичностью) остаткам в положениях с 290 до 846 в SEQ ID № 2. Как используют в настоящем описании, одноцепочечный полипептид может содержать "последовательность β-цепи" и дополнительную последовательность(и).

Как используют в настоящем описании, "получен из", когда используют в контексте сконструированных ферментов PGA, идентифицирует исходный фермент PGA и/или ген, кодирующий такой фермент PGA, на котором основано конструирование. Например, одноцепочечный сконструированный фермент PGA из SEQ ID № 60 получали посредством искусственного развития, на протяжении нескольких поколений, гена, кодирующего PGA из *K. citrophila*. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления сконструированные ферменты PGA получают из встречаемого в природе или PGA дикого типа с

SEQ ID № 2, хотя в некоторых дополнительных вариантах осуществления сконструированные ферменты PGA получают из других развитых ферментов PGA. В некоторых вариантах осуществления сконструированная PGA содержит последовательность  $\alpha$ -цепи и последовательность  $\beta$ -цепи, которые могут присутствовать в виде отдельных полипептидов в зрелом ферменте или могут присутствовать в качестве части одноцепочечного полипептида. В некоторых вариантах осуществления, когда присутствует в виде одноцепочечной формы, сконструированный полипептид PGA может содержать, от аминоконцу, структуру B-L-A в которой B представляет собой последовательность  $\beta$ -цепи (или единицу B); A представляет собой последовательность  $\alpha$ -цепи (или единицу A); и L представляет собой линкер, соединяющий последовательности  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи. В некоторых вариантах осуществления спейсер или линкер L содержит спейсер или линкер достаточной длины и гибкости, чтобы допускать надлежащую укладку и взаимодействие единиц A и B для того, чтобы формировать функциональный фермент PGA. Образцовый линкер/спейсер содержит аминокислотную последовательность Gln-Leu-Asp-Gln.

Будь в форме отдельных полипептидов или в виде одноцепочечного полипептида, последовательности  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей могут иметь одну или несколько различных остатков по сравнению со встречаемыми в природе последовательностями  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей из PGA *K. citrophila*.

Как используют в настоящем описании, "инсулин" относится к полипептидному гормону, продуцируемому бета-клетками поджелудочной железы у нормальных индивидуумов. Инсулин необходим для регуляции метаболизма углеводов, посредством снижения уровней глюкозы крови. Систематический недостаток инсулина ведет к диабету. Инсулин состоит из 51 аминокислоты и имеет молекулярную массу приблизительно 5800 Да. Инсулин состоит из двух пептидных цепей (обозначаемых "A" и "B"), содержащих одну внутрисубъединичную и две межсубъединичных дисульфидных связи. Цепь A состоит из 21 аминокислоты и цепь B состоит из 30 аминокислот. Две цепи образуют высокоупорядоченную структуру, с несколькими альфа-спиральными областями в обеих цепях A и B. Изолированные цепи неактивны. В растворе инсулин представляет собой мономер, димер или гексамер. Он является гексамером в высококонцентрированных препаратах, используемых для подкожной инъекции, но становится мономером по мере его разведения текучими веществами организма. Предусмотрено, что определение охватывает проинсулин и любой очищенный выделенный полипептид, имеющий частично или полностью первичную структурную конформацию и по меньшей мере одно из биологических свойств инсулина, встречаемого в природе. Кроме того, предусмотрено, что оно охватывает природный и получаемый синтетически инсулин, в том числе гликоформы, а также аналоги (например, полипептиды, имеющие делеции, инсерции и/или замены).

Инсулин содержит три нуклеофильных амина, которые потенциально могут вступать в реакцию с донором фенилацетата и быть защищенными с помощью PGA. Эти остатки включают Lys в B-цепи в положении 29 (B29) и два N-концевых свободных амина, Gly на A-цепи в положении 1 (A1) и Phe на B-цепи в положении 1 (B1). Тризащищенный инсулин (фенилацетат, химически прикрепленный к остаткам A1, B1, B29 в инсулине человека) предусмотрен в настоящем описании. Ранее сообщалось, что PGA катализирует гидролиз N-фенилацетат-защищенных пептидов и инсулина с исключительной избирательностью к фенилацетатной амидной связи, оставляя остальные пептидные связи белка интактными (Brtnik et al., Coll. Czech. Chem. Commun., 46 (8), 1983-1989 [1981] и Wang et al. Biopolym. 25 (Suppl.), S109-S114 [1986]).

Как используют в настоящем описании, "трифенилацетатная защитная группа" относится к молекуле инсулина, которая имеет три первичных амина в положениях B1, B29 и A1, которые защищают фенилацетатной группой.

Как используют в настоящем описании, "дифенилацетатная защитная группа" относится к молекуле инсулина, которая имеет два первичных амина в положениях B1, B29 и/или A1, которые защищены фенилацетатной группой.

Как используют в настоящем описании, "дифенилацетатная защитная группа" относится к молекуле инсулина, которая имеет один первичный амин в положениях B1, B29 или A1, которые защищены фенилацетатной группой.

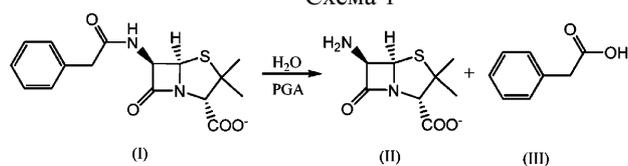
#### Ацилазы пенициллина G

Впервые была описана ацилаза пенициллина из *Penicillium chrysogenum* Wise. Q176 авторами Sakaguchi и Murao (Sakaguchi and Murao, J. Agr. Chem. Soc. Jpn., 23:411 [1950]). Ацилаза пенициллина G представляет собой гидролитический фермент, который действует на боковые цепи пенициллина G, цефалоспорины G и родственных антибиотиков с образованием промежуточных соединений  $\beta$ -лактамных антибиотиков 6-аминопенициллановой кислоты и 7-аминодезацетоксицефалоспориновой кислоты с фенилуксусной кислотой в качестве общего побочного продукта. Эти промежуточные соединения антибиотиков входят в потенциальные строительные блоки для полусинтетических антибиотиков, таких как ампициллин, амоксициллин, клоксациллин, цефалексин и цефатоксим.

Как указано выше, ацилазы пенициллина G (PGA) отличаются способностью катализировать гидролитическое расщепление пенициллина G, с сопряженным основанием структурной формулы (I), до 6-аминопенициллановой кислоты, с сопряженным основанием структурной формулы (II), и фенилуксусной

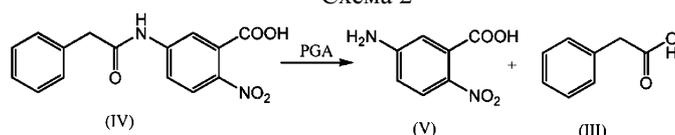
кислоты структурной формулы (III), как показано в схеме 1:

Схема 1



Без ограничения теорией, субстратная специфичность выглядит ассоциированной с распознаванием гидрофобной фенильной группы, тогда как нуклеофил, которым в некоторых PGA является остаток серина на N-конце бета-цепи, выполняет функцию акцептора бета-лактама и различных других групп, таких как бета-аминокислоты. PGA также могут отличаться способностью расщеплять модельные субстраты, аналогичные пенициллину G, например, расщепление 6-нитро-3-(фенилацетида)бензойной кислоты (NIPAB) структурной формулы (IV), как показано в схеме 2:

Схема 2



до фенилуксусной кислоты структурной формулы (III) и 5-амино-2-нитробензойной кислоты структурной формулы (V) (см., например, Alkema et al., *Anal. Biochem.*, 275:47-53 [1999]). Поскольку 5-амино-2-нитробензойная кислота является хромогенной, субстрат формулы (IV) предоставляет удобный способ измерения активности PGA. В дополнение к вышеуказанным реакциям, PGA также можно использовать при кинетическом разрешении DL-трет-лейцина для получения оптически чистого трет-лейцина (см., например, Liu et al., *Prer. Biochem. Biotechnol.*, 36:235-41 [2006]).

PGA по настоящему изобретению основаны на ферменте, полученном из организма *Kluuyvera citrophila* (*K. citrophila*). Как и в случае PGA от других организмов, PGA от *K. citrophila* представляет собой гетеродимерный фермент, состоящий из альфа-субъединицы и бета-субъединицы, которые возникают посредством протеолитического процессинга препрополипептида PGA. Удалением сигнального пептида и спейсерного пептида получают зрелый гетеродимер (см., например, Barbero et al., *Ген* 49:69-80 [1986]). Аминокислотная последовательность встречаемого в природе препрополипептида PGA из *K. citrophila* общедоступна (см., например, номер доступа GenBank P07941, [gi:129551]) и предоставлена в настоящем описании как SEQ ID № 2. Последовательность альфа-цепи встречаемой в природе PGA *K. citrophila* соответствует остаткам с 27 до 235 из SEQ ID № 2. Последовательность бета-цепи встречаемой в природе PGA *K. citrophila* соответствует остаткам с 290 до 846 из SEQ ID № 2.

Остатки с 1 до 26 из SEQ ID № 2 соответствуют сигнальному пептиду и остатки 236-289 из SEQ ID № 2 соответствуют связывающему пропептиду, оба их удаляют для того, чтобы создавать встречаемый в природе зрелый фермент PGA, который представляет собой гетеродимер, содержащий субъединицу  $\alpha$ -цепи и субъединицу  $\beta$ -цепи. В некоторых вариантах осуществления сконструированная PGA содержит последовательность  $\alpha$ -цепи и последовательность  $\beta$ -цепи, которые могут присутствовать в виде отдельных полипептидов в зрелом ферменте или могут присутствовать в качестве части одноцепочечного полипептида. В некоторых вариантах осуществления, которая присутствует в виде одноцепочечной формы, сконструированный полипептид PGA может содержать, от аминоконца к карбоксиконцу, структуру B-L-A в которой B представляет собой последовательность  $\beta$ -цепи (или единицу B); A представляет собой последовательность  $\alpha$ -цепи (или единицу A); и L представляет собой линкер, соединяющий последовательности  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи. В некоторых вариантах осуществления спейсер или линкер L содержит спейсер или линкер достаточной длины и гибкости, чтобы допускать надлежащую укладку и взаимодействие единиц A и B для того, чтобы формировать функциональный фермент PGA. Образцовый линкер/спейсер содержит аминокислотную последовательность Gln-Leu-Asp-Gln.

Будь в форме отдельных полипептидов или в виде одноцепочечного полипептида, последовательности  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей могут иметь одно или несколько различий остатков по сравнению со встречаемыми в природе последовательностями  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей из PGA *K. citrophila*.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает сконструированные полипептиды PGA с аминокислотными последовательностями, которые обладают по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или больше идентичностью последовательностей с SEQ ID №№ 12, 24, 40, 56, 70, 82, 100, 108, 110, 116, 136, 154 и/или 160.

Настоящее изобретение предусматривает инсулинспецифические биокатализаторы ацилирования, подходящие для использования в коммерческом масштабе. Направленную эволюцию использовали для разработки эффективных вариантов ацилаз, которые способны добавлять фенилацетатную защитную группу к инсулину в положениях A1, B1 и/или B29. Варианты PGA, предусмотренные в настоящем описании, способны принимать широкий диапазон ацильных групп, проявлять увеличенную стабильность в

растворителе и усовершенствованную термостабильность по сравнению с PGA дикого типа. Варианты PGA, предусмотренные в настоящем описании, не содержат спейсерную область. Таким образом, стадия аутопроцессинга не требуется для того, чтобы получать активные ферменты. Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим сконструированные полипептиды PGA. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды функционально связаны с одной или несколькими гетерологичными регуляторными последовательностями, которые управляют экспрессией гена, чтобы создавать рекомбинантный полинуклеотид, способный экспрессировать полипептид.

Экспрессионные конструкции, содержащие гетерологичный полинуклеотид, кодирующий сконструированные полипептиды PGA, можно вводить в подходящие клетки-хозяева для того, чтобы экспрессировать соответствующий полипептид PGA. По причине известности кодонов, соответствующих различным аминокислотам, доступность белковой последовательности предоставляет описание всех полинуклеотидов, способных кодировать рассматриваемое. Вырожденность генетического кода, где одни и те же аминокислоты кодируют посредством альтернативные или синонимические кодоны, допускает создание чрезвычайно большого числа нуклеиновых кислот, все из которых кодируют усовершенствованные ферменты PGA, раскрытые в настоящем описании. Таким образом, имея идентифицированную конкретную аминокислотную последовательность, специалисты в данной области могут создавать любое число различных нуклеиновых кислот путем простой модификации последовательности одного или нескольких кодонов таким образом, который не меняет аминокислотную последовательность белка. В связи с этим, настоящее раскрытие, в частности, предусматривает каждую и всякую возможную вариацию полинуклеотидов, которые можно получать, выбирая комбинации на основе выбора возможных кодонов, и все такие вариации следует рассматривать как конкретно раскрытые для любого полипептида, раскрытого в настоящем описании, включая аминокислотные последовательности, представленные в таблицах в примерах.

В различных вариантах осуществления, кодоны предпочтительно отбирают так, чтобы они подходил к клетке-хозяину, в которой получают белок. Например, предпочтительные кодоны, используемые в бактериях, используют для того, чтобы экспрессировать ген в бактериях; предпочтительные кодоны, используемые в дрожжах используют для экспрессии в дрожжа; и предпочтительные кодоны, используемые у млекопитающих, используют для экспрессии в клетках млекопитающих.

В определенных вариантах осуществления все кодоны не нужно заменять для того, чтобы оптимизировать использование кодонов для полипептидов PGA, поскольку природная последовательность содержит предпочтительные кодоны, а также поскольку использование предпочтительных кодонов может не требоваться для всех аминокислотных остатков. Следовательно, полинуклеотиды с оптимизацией кодонов, кодирующие ферменты PGA, могут содержать предпочтительные кодоны в приблизительно 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или более чем 90% положений кодонов полноразмерной кодирующей области.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид PGA с аминокислотной последовательностью, которая обладает по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или большей идентичностью последовательностей с любой альфа-цепью и/или бета-цепью эталонных сконструированных полипептидов PGA, описанных в настоящем описании. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична эталонным последовательностям альфа- и бета-цепей на основе SEQ ID № 12, 24, 40, 56, 70, 82, 100, 108, 110, 116, 136, 154 и/или 160. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует аминокислотную последовательность альфа- и/или бета-цепи из SEQ ID № 12, 24, 40, 56, 70, 82, 100, 108, 110, 116, 136, 154 и/или 160.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид PGA с аминокислотной последовательностью, которая обладает по меньшей мере приблизительно 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или большей идентичностью последовательностей с SEQ ID № 12, 24, 40, 56, 70, 82, 100, 108, 110, 116, 136, 154 и/или 160. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотид кодирует аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентична SEQ ID № 12, 24, 40, 56, 70, 82, 100, 108, 110, 116, 136, 154 и/или 160.

В некоторых вариантах осуществления выделенным полинуклеотидом, кодирующим усовершенствованный полипептид PGA, манипулировали различными способами для обеспечения усовершенствованной активности и/или экспрессии полипептида. Манипуляции с выделенным полинуклеотидом перед его встраиванием в вектор могут быть желательны или необходимы, в зависимости от экспрессирующего вектора. Приемы модификаций полинуклеотидов и последовательностей нуклеиновой кислоты с использованием способов рекомбинантных ДНК хорошо известны в данной области.

Например, способы мутагенеза и направленной эволюции можно легко применять к полинуклеотидам для того, чтобы создавать варианты библиотек, которые можно экспрессировать, осуществлять их скрининг и анализ. Способы мутагенеза и направленной эволюции хорошо известны в данной области

(см., например, патенты США №№ 5605793, 5830721, 6132970, 6420175, 6277638, 6365408, 6602986, 7288375, 6287861, 6297053, 6576467, 6444468, 5811238, 6117679, 6165793, 6180406, 6291242, 6995017, 6395547, 6506602, 6519065, 6506603, 6413774, 6573098, 6323030, 6344356, 6372497, 7868138, 5834252, 5928905, 6489146, 6096548, 6387702, 6391552, 6358742, 6482647, 6335160, 6653072, 6355484, 603344, 6319713, 6613514, 6455253, 6579678, 6586182, 6406855, 6946296, 7534564, 7776598, 5837458, 6391640, 6309883, 7105297, 7795030, 6326204, 6251674, 6716631, 6528311, 6287862, 6335198, 6352859, 6379964, 7148054, 7629170, 7620500, 6365377, 6358740, 6406910, 6413745, 6436675, 6961664, 7430477, 7873499, 7702464, 7783428, 7747391, 7747393, 7751986, 6376246, 6426224, 6423542, 6479652, 6319714, 6521453, 6368861, 7421347, 7058515, 7024312, 7620502, 7853410, 7957912, 7904249 и все связанные эквиваленты не для 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., *Gen.*, 34:315-323 [1985]; Minshull et al., *Curr. Op. Chem. Biol.*, 3:284-290 [1999]; Christians et al., *Nat. Biotechnol.*, 17:259-264 [1999]; Cramer et al., *Nature*, 391:288-291 [1998]; Cramer, et al., *Nat. Biotechnol.*, 15:436-438 [1997]; Zhang et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:4504-4509 [1997]; Cramer 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 и WO 2009/152336, все они включены в настоящее описание посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления варианты ацилаз PGA по настоящему изобретению дополнительно содержат дополнительные последовательности, которые не изменяют кодируемую активность фермента. Например, в некоторых вариантах осуществления варианты ацилаз PGA связывают с эпитопной меткой или другой последовательностью, которую можно использовать при очистке.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды вариантов ацилаз PGA по настоящему изобретению секретирует клетка-хозяин, в которой их экспрессируют (например, клетка-хозяин дрожжей или нитчатых грибов) и экспрессируют в виде препротейна, содержащего сигнальный пептид (т.е. аминокислотную последовательность, которая связана с аминоконцом полипептида и которая направляет кодируемый полипептид по клеточному секреторному пути).

В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой эндогенный сигнальный пептид ацилазы PGA *K. citrophila*. В некоторых других вариантах осуществления используют сигнальные пептиды из других секретируемых белков *K. citrophila*.

В некоторых вариантах осуществления другие сигнальные пептиды находят использование, в зависимости от клетки-хозяина и других факторов. Области, кодирующие эффективные сигнальные пептиды, для клеток-хозяев нитчатых грибов включают, но не ограничиваясь этим, кодирующие сигнальные пептиды области, получаемые из ТАКА амилазы *Aspergillus oryzae*, нейтральной амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei*, целлюлазы *Humicola insolens*, липазы *Humicola lanuginosa* и целлюлогидролазы *P. reesei*. Кодирующие сигнальные пептиды области для бактериальных клеток-хозяев включают, но не ограничиваясь этим, кодирующие сигнальные пептиды области, получаемые из генов мальтогенной амилазы *Bacillus NCIB 11837*, альфа-амилазы *Bacillus stearothermophilus*, субтилизина *Bacillus licheniformis*, β-лактамазы *Bacillus licheniformis*, нейтральной протеазы (*nprT*, *nprS*, *nprM*) *Bacillus stearothermophilus* и *prsA Bacillus subtilis*. В некоторых дополнительных вариантах осуществления другие сигнальные пептиды находят использование в настоящем изобретении (см., например, Simonen and Palva, *Microbiol. Rev.*, 57: 109-137 [1993], включено в настоящее описание посредством ссылки). Дополнительные эффективные сигнальные пептиды для дрожжевых клеток-хозяев включают таковые из генов альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae*, инвертазы *SUC2Saccharomyces cerevisiae* (см., например, Taussig and Carlson, *Nucl. Acids Res.*, 11:1943-54 [1983]; № доступа SwissProt P00724; и Romanos et al., *Yeast* 8:423-488 [1992]). В некоторых вариантах осуществления находят применение варианты этих сигнальных пептидов и других сигнальных пептидов. В действительности, не предусмотрено, что настоящее изобретение ограничено каким-либо конкретным сигнальным пептидом, поскольку любой подходящий сигнальный пептид, известный в данной области, находит использование в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает полинуклеотиды, кодирующие полипептиды вариантов ацилаз PGA и/или их биологически активные фрагменты, как раскрыто в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид функционально связан с одной или несколькими гетерологичными регуляторными или управляющими последовательностями, которые управляют экспрессией гена для того, чтобы создавать рекомбинантный полинуклеотид, способный экспрессировать полипептид. В некоторых вариантах осуществления экспрессионные конструкции, содержащие гетерологичный полинуклеотид, кодирующий вариант ацилазы PGA, вводят в подходящие клетки-хозяева для того, чтобы экспрессировать вариант ацилазы PGA.

Средние специалисты в данной области поймут, что из-за вырожденности генетического кода существует множество нуклеотидных последовательностей, кодирующих полипептиды вариантов ацилаз PGA по настоящему изобретению. Например, все кодоны AGA, AGG, CGA, CGC, CGG и CGU кодируют аминокислоту аргинин. Таким образом, в каждом положении в нуклеиновых кислотах по изобретению,

где аргинин определен кодоном, кодон можно изменять на любой из соответствующих кодонов, описанных выше, без изменения кодируемого полипептида. Понятно, что "U" в последовательности РНК соответствует "Т" в последовательности ДНК. Изобретение относится к и предусматривает каждую и всякую возможную вариацию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид по изобретению, которую можно выполнять, выбирая комбинации на основе возможных альтернатив кодонов.

Как указано выше, также можно разрабатывать последовательность ДНК, кодирующую PGA, с кодонами с высоким предпочтением кодонов (кодонов, которые используют с более высокой частотой в кодирующих белок областях, чем другие кодоны, которые кодируют ту же аминокислоту). Предпочтительные кодоны можно определять по отношению к использованию кодонов в одном гене, наборе генов с общей функцией или происхождением, высоко экспрессируемых генах, частоте кодонов в агрегатных кодирующих белок областях целого организма, частоте кодонов в агрегатных кодирующих белок областях родственных организмов или их сочетаний. Кодон, частота которого возрастает вместе с уровнем экспрессии гена, обычно является оптимальным кодоном для экспрессии. В частности, последовательность ДНК можно оптимизировать для экспрессии в конкретном организме-хозяине. Различные способы хорошо известны в данной области для определения частоты кодонов (например, использование кодонов, относительное использование синонимических кодонов) и кодонные предпочтения в конкретных организмах, включая многопараметрический анализ (например, с использованием кластерного анализа или анализа соответствий) и эффективное число кодонов, используемых в гене. Источник данных для получения использования кодонов может полагаться на любую доступную нуклеотидную последовательность, способную кодировать белок.

Эти наборы данных включают последовательности нуклеиновой кислоты, которые доподлинно кодируют экспрессируемые белки (например, полные кодирующие белок последовательности -CDS), метки экспрессируемой последовательности (EST) или предсказанные кодирующие области геномных последовательностей, как хорошо известно в данной области. Полинуклеотиды, кодирующие варианты PGA, можно получать с использованием любых подходящих известных в данной области способов. Обычно олигонуклеотиды синтезируют индивидуально, затем соединяют (например, способами ферментативного или химического лигирования или опосредованными полимеразой способами) для того, чтобы формировать по существу любую желаемую непрерывную последовательность. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по настоящему изобретению получают посредством химического синтеза с использованием любых подходящих известных в данной области способов, включая в качестве неограничивающих примеров автоматизированные способы синтеза. Например, в фосфорамидитном способе олигонуклеотиды синтезируют (например, в автоматическом синтезаторе ДНК), очищают, отжигают, лигируют и клонируют в подходящие векторы. В некоторых вариантах осуществления после этого получают фрагменты двухцепочечной ДНК или посредством синтеза комплементарной нити и отжига нитей вместе при подходящих условиях или посредством добавления комплементарной нити с использованием ДНК-полимеразы и подходящей последовательности праймера. Существует множество общих и стандартных текстов, в которых предоставлены способы, которые можно использовать в настоящем изобретении и которые хорошо известны специалистам в данной области.

Сконструированные PGA можно получать, подвергая полинуклеотид, кодирующий встречаемую в природе PGA, способам мутагенеза и/или направленной эволюции, как рассмотрено выше. Мутагенез можно осуществлять в соответствии с любыми из приемов, известных в данной области, включая случайный и сайт-специфический мутагенез. Направленную эволюцию можно осуществлять с использованием любых из приемов, известных в данной области для скрининга усовершенствованных вариантов, включая перетасовку. Другие процедуры направленной эволюции, которые находят применение, включают, но не ограничиваясь этим, процесс (стадию) ступенчатой достройки, рекомбинацию *in vitro*, мутагенную ПЦР, кассетный мутагенез, сплайсинг посредством достраивания перекрытий (SOE), способы направленной эволюции ProSAR™ и т.д., а также любые другие подходящие способы.

Осуществляют скрининг клонов, получаемых после мутагенетической обработки, по сконструированным PGA, имеющим желаемое усовершенствованное свойство фермента. Измерение активности фермента из экспрессионных библиотек можно осуществлять с использованием стандартных биохимических приемов мониторинга скорости образования продукта. Когда желаемым усовершенствованным свойством фермента является тепловая стабильность, активность фермента можно измерять после воздействия на препараты фермента определенными температурами и измерения количества активности фермента, остающейся после тепловой обработки. Затем клоны, содержащие полинуклеотид, кодирующий PGA, выделяют, секвенируют для того, чтобы идентифицировать изменения в нуклеотидной последовательности (если уместно), и используют для того, чтобы экспрессировать фермент в клетке-хозяине.

Когда последовательность сконструированного полипептида известна, полинуклеотиды, кодирующие фермент, можно получать стандартными твердофазными способами, в соответствии с известными способами синтеза. В некоторых вариантах осуществления фрагменты приблизительно до 100 оснований можно синтезировать индивидуально, затем соединять (например, способами ферментативного или химического лигирования или опосредованными полимеразой способами) для того, чтобы формировать любую желаемую непрерывную последовательность. Например, полинуклеотиды и олигонуклеотиды по

изобретению можно получать посредством химического синтеза (например, с использованием классического фосфорамидитного способа, описанного в Beaucage et al., Tet. Lett., 22:1859-69 [1981], или способа, описанного в Matthes et al., EMBO J., 3:801-05 [1984], как его обычно практикуют в автоматизированных способах синтеза). В соответствии с фосфорамидитным способом олигонуклеотиды синтезируют (например, в автоматическом синтезаторе ДНК), очищают, отжигают, лигируют и клонируют в подходящие векторы. Кроме того, по существу любую нуклеиновую кислоту можно получать из любого из различных коммерческих источников (например, Midland Certified Reagent Company, Midland, TX, The Great American Gen Company, Ramona, CA, ExpressGen Inc. Chicago, IL, Operon Technologies Inc., Alameda, CA и многие другие).

Настоящее изобретение также относится к рекомбинантным конструкциям, содержащим последовательность, кодирующую по меньшей мере один вариант PGA, как предусмотрено в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид варианта PGA, функционально связанный с гетерологичным промотором. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие векторы по настоящему изобретению используют для того, чтобы трансформировать подходящие клетки-хозяева, чтобы позволять клеткам-хозяевам экспрессировать белок варианта PGA. Способы рекомбинантной экспрессии белков в грибах и других организмах хорошо известны в данной области, и множество экспрессирующих векторов доступно или можно сконструировать с использованием стандартных способов. В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению содержат вектор, такой как, плазида, космида, фаг, вирус, бактериальная искусственная хромосома (BAC), искусственная хромосома дрожжей (YAC) и т.п., в который встроена последовательность нуклеиновой кислоты по изобретению. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по настоящему изобретению встраивают в любой один из различных экспрессирующих векторов, подходящих для экспрессии полипептида(ов) варианта PGA. Подходящие векторы включают, но не ограничиваясь этим хромосомные, нехромосомные и синтетические последовательности ДНК (например, производные SV40), а также бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирусные, дрожжевые плазмиды, векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговой ДНК, вирусную ДНК, например, вируса осповакцины, аденовируса, вируса оспы птиц, псевдобешенства, аденовируса, аденоассоциированного вируса, ретровирусов и многих других. Любой подходящий вектор, который трансдуцирует генетический материал в клетку и, если репликация желательна, который является реплицируемым и жизнеспособным в релевантном хозяине, находит использование в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления конструкция дополнительно содержит регуляторные последовательности, включая в качестве неограничивающих примеров промотор, функционально связанный с кодирующей последовательностью белка. Большое число подходящих векторов и промоторов известно специалистам в данной области. В действительности, в некоторых вариантах осуществления, чтобы достичь высоких уровней экспрессии у конкретного хозяина, часто полезно экспрессировать варианты PGA по настоящему изобретению под управлением гетерологичного промотора. В некоторых вариантах осуществления промоторную последовательность функционально связывают с 5'-областью кодирующей вариант PGA последовательности с использованием любого подходящего известного в данной области способа. Примеры эффективных промоторов для экспрессии вариантов PGA включают, но не ограничиваясь этим, промоторы грибов. В некоторых вариантах осуществления находит применение промоторная последовательность, которая управляет экспрессией гена, отличного от гена PGA, в штамме грибов. В качестве неограничивающего примера, можно использовать промотор грибов из гена, кодирующего эндоглюканазу. В некоторых вариантах осуществления находит применение промоторная последовательность, которая управляет экспрессией гена PGA в штамме грибов, отличном от штамма грибов, у которого получали PGA. Примеры других подходящих промоторов, которые можно использовать для того, чтобы управлять транскрипцией нуклеотидных конструкций по настоящему изобретению в клетках-хозяевах нитчатых грибов, включают, но не ограничиваясь этим, промоторы, получаемые из генов ТАКА амилазы *Aspergillus oryzae*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei*, нейтральной альфа-амилазы *Aspergillus niger*, кислой стабильной альфа-амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы *Aspergillus niger* или *Aspergillus awamori* (*glaA*), липазы *Rhizomucor miehei*, щелочной протеазы *Aspergillus oryzae*, триозофосфатизомеразы *Aspergillus oryzae*, ацетамидазы *Aspergillus nidulans* и трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum* (см., например, WO 96/00787, включенную в настоящее описание посредством ссылки), а также промотор NA2-tri (гибрид промоторов из генов нейтральной альфа-амилазы *Aspergillus niger* и триозофосфатизомеразы *Aspergillus oryzae*), промоторы, такие как *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2*, *pepA*, *hfb1*, *hfb2*, *xyn1*, *amy* и *glaA* (см., например, Nunberg et al., Mol. Cell Biol., 4:2306-2315 [1984]; Boel et al., EMBO J., 3:1581-85 [1984]; и европейскую патентную заявку 137280, все они включены в настоящее описание посредством ссылки), и их мутантные, усеченные и гибридные промоторы.

В дрожжевых клетках-хозяевах эффективные промоторы включают, но не ограничиваясь этим, те, что из генов енoлазы *Saccharomyces cerevisiae* (*eno-1*), галактокиназы *Saccharomyces cerevisiae* (*gal1*), алкогольдегидрогеназы/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae* (*ADH2/GAP*) и 3-фосфоглицераткиназы *S. cerevisiae*. Дополнительные эффективные промоторы, которые можно исполь-

зовать для дрожжевых клеток-хозяев, известны в данной области (см., например, Romanos et al., *Yeast* 8:423-488 [1992], включенную в настоящее описание посредством ссылки). Кроме того, промоторы, ассоциированные с получением хитиназы в грибах, находят применение в настоящем изобретении (см., например, Blaiseau and Lafay, *Gene* 120243-248 [1992]; и Limon et al., *Curr. Genet.*, 28:478-83 [1995], обе они включены в настоящее описание посредством ссылки).

Для бактериальных клеток-хозяев подходящие промоторы для управления транскрипцией конструкций нуклеиновой кислоты по настоящему раскрытию включают, но не ограничиваясь этим, промоторы, получаемые из *lac*-оперона *E. coli*, *trp*-оперона *E. coli*, бактериофага  $\lambda$ , 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 промотора *tac* (см., например, DeBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21-25 [1983]).

В некоторых вариантах осуществления клонированные варианты PGA по настоящему изобретению также имеют подходящую последовательность терминатора транскрипции, последовательность, распознаваемую клеткой-хозяином для того, чтобы терминировать транскрипцию. Последовательность терминатора функционально связывают с 3'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Любой терминатор, который функционален в клетке-хозяине, предпочтительно находит применение в настоящем изобретении. Образцовые терминаторы транскрипции для клеток-хозяев нитчатых грибов включают, но не ограничиваясь этим, те, которые получают из генов ТАКА амилазы *Aspergillus oryzae*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, антранилатсинтазы *Aspergillus nidulans*, альфа-глюкозидазы *Aspergillus niger* и трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum* (также см. патент США № 7399627, включенный в настоящее описание посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления образцовые терминаторы для дрожжевых клеток-хозяев включают те, которые получают из генов енолазы *Saccharomyces cerevisiae*, цитохрома C *Saccharomyces cerevisiae* (*CYC1*) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae*. Другие эффективные терминаторы для дрожжевых клеток-хозяев общеизвестны специалистам в данной области (см., например, Romanos et al., *Yeast* 8:423-88 [1992]).

В некоторых вариантах осуществления подходящая лидерная последовательность, являющаяся частью клонируемой последовательности варианта PGA, представляет собой нетранслируемую область мРНК, которая важна для трансляции в клетке-хозяине. Лидерную последовательность функционально связывают с 5'-концом последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид. Любая лидерная последовательность, которая функциональна в клетке-хозяине, предпочтительно находит применение в настоящем изобретении. Образцовые лидеры для клеток-хозяев нитчатых грибов включают, но не ограничиваясь этим, те, которые получают из генов ТАКА амилазы *Aspergillus oryzae* и триозофосфатизомеразы *Aspergillus nidulans*. Подходящие лидеры для дрожжевых клеток-хозяев включают, но не ограничиваясь этим, те, которые получают из генов енолазы *Saccharomyces cerevisiae* (*ENO-1*), 3-фосфоглицераткиназы *Saccharomyces cerevisiae*, альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и алкогольдегидрогеназы/глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *Saccharomyces cerevisiae* (*ADH2/GAP*).

В некоторых вариантах осуществления последовательности по настоящему изобретению также содержат последовательность полиаденилирования, которая представляет собой последовательность, функционально связанную с 3'-концом последовательности нуклеиновой кислоты и которую, при транскрипции, распознает клетка-хозяин в качестве сигнала для добавления остатков полиаденозина к транскрибируемой мРНК. Любая последовательность полиаденилирования, которая функциональна в клетке-хозяине, предпочтительно находит применение в настоящем изобретении. Образцовые последовательности полиаденилирования для клеток-хозяев нитчатых грибов включают, но не ограничиваясь этим, те, которые получают из генов ТАКА амилазы *Aspergillus oryzae*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, антранилатсинтазы *Aspergillus nidulans*, трипсиноподобной протеазы *Fusarium oxysporum* и альфа-глюкозидазы *Aspergillus niger*. Эффективные последовательности полиаденилирования для дрожжевых клеток-хозяев известны в данной области (см., например, Guo and Sherman, *Mol. Cell. Biol.*, 15:5983-5990 [1995]).

В некоторых вариантах осуществления управляющая последовательность содержит кодирующую сигнальный пептид область, кодирующую аминокислотную последовательность, связываемую с аминоконцом полипептида и направляющую кодируемый полипептид по секреторному пути клетки. 5'-конец кодирующей последовательности в последовательности нуклеиновой кислоты может неотъемлемо содержать кодирующую сигнальный пептид область, в природе связанную с сохранением трансляционной рамки считывания с сегментом кодирующей области, который кодирует секреторируемый полипептид. Альтернативно, 5'-конец кодирующей последовательности может содержать кодирующую сигнальный пептид область, которая чужеродна для кодирующей последовательности. Когда кодирующая последовательность в природе не содержит кодирующую сигнальный пептид область, может потребоваться чужеродная кодирующая сигнальный пептид область.

Альтернативно, чужеродной кодирующей сигнальный пептид областью можно просто замещать ес-

тественную кодирующую сигнальный пептид область для того, чтобы усилить секрецию полипептида. Однако любую кодирующую сигнальный пептид область, которая направляет экспрессируемый полипептид по секреторному пути клетки-хозяина, предпочтительно можно использовать в настоящем изобретении.

Эффективные кодирующие сигнальные пептиды области для бактериальных клеток-хозяев включают, но не ограничиваясь этим, кодирующие сигнальные пептиды области, получаемые из генов мальтогенной амилазы *Bacillus NC1B 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]).

Эффективные кодирующие сигнальные пептиды области для клеток-хозяев нитчатых грибов включают, но не ограничиваясь этим, кодирующие сигнальные пептиды области, получаемые из генов ТАКА амилазы *Aspergillus oryzae*, нейтральной амилазы *Aspergillus niger*, глюкоамилазы *Aspergillus niger*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei*, целлюлазы *Humicola insolens* и липазы *Humicola lanuginosa*.

Эффективные сигнальные пептиды для дрожжевых клеток-хозяев включают, но не ограничиваясь этим, гены альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и инвертазы *Saccharomyces cerevisiae*. Другие эффективные кодирующие сигнальные пептиды области известны в данной области (см., например, Romanos et al., [1992], выше).

В некоторых вариантах осуществления управляющая последовательность содержит кодирующую пропептид область, которая кодирует аминокислотную последовательность, расположенную на аминоконце полипептида. Получаемый полипептид известен как профермент или прополипептид (или зимоген, в некоторых случаях). Пропептид в целом неактивен и может быть превращен в зрелый активный полипептид PGA посредством каталитического или аутокаталитического отщепления пропептида от прополипептида. Кодирующую пропептид область можно получать из генов щелочной протеазы *Bacillus subtilis* (aprE), нейтральной протеазы *Bacillus subtilis* (nprT), альфа-фактора *Saccharomyces cerevisiae*, аспарагиновой протеиназы *Rhizomucor miehei* и лактазы *Muceliophthora thermophila* (см., например, WO 95/33836).

Когда обе области сигнального пептида и пропептида присутствуют на аминоконце полипептида, область пропептида располагают рядом с аминоконцом полипептида, а область сигнального пептида располагают рядом с аминоконцом области пропептида.

В некоторых вариантах осуществления регуляторные последовательности также используют для того, чтобы сделать возможной регуляцию экспрессии полипептида относительно роста клетки-хозяина. Примеры регуляторных систем представляют собой те, которые обеспечивают экспрессию гена, подлежащего включению или выключению в ответ на химический или физический стимул, включая присутствие регуляторного соединения. В прокариотических клетках-хозяевах подходящие регуляторные последовательности включают, но не ограничиваясь этим, системы операторов lac, tac и trp. В дрожжевых клетках-хозяевах подходящие регуляторные системы включают, например, систему ADH2 или систему GAL1. У нитчатых грибов подходящие регуляторные последовательности включают промотор ТАКА альфа-амилазы, промотор глюкоамилазы *Aspergillus niger* и промотор глюкоамилазы *Aspergillus oryzae*.

Другими примерами регуляторных последовательностей являются те, которые допускают амплификацию гена. В эукариотических системах они включают ген дигидрофолатредуктазы, который амплифицируется в присутствии метотрексата, и гены металлотioneина, которые амплифицируются в присутствии тяжелых металлов. В этих случаях последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид PGA по настоящему изобретению, следует функционально связывать с регуляторной последовательностью.

Таким образом, в дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает рекомбинантные экспрессирующие векторы, содержащие полинуклеотид, кодирующий сконструированный полипептид PGA или его вариант, и одну или несколько регулирующих экспрессию областей, таких как промотор и терминатор, сайт начала репликации и т.д., в зависимости от типа хозяев, в которые их следует вводить. В некоторых вариантах осуществления различные последовательности нуклеиновой кислоты и управляющие последовательности, описанные выше, соединяют вместе для получения рекомбинантного экспрессирующего вектора, который может содержать один или несколько удобных участков рестрикции для того, чтобы сделать возможной инсерцию или замену последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, в таких участках. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления последовательности нуклеиновой кислоты экспрессируют посредством встраивания последовательности нуклеиновой кислоты или конструкции нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, в подходящий вектор для экспрессии. При создании экспрессирующего вектора, кодирующую последовательность располагают в векторе с тем, чтобы функционально связывать кодирующую последовательность с подходящими управляющими последовательностями для экспрессии.

Рекомбинантный экспрессирующий вектор включает любой подходящий вектор (например, плазмиду или вирус), который можно в целях удобства подвергать процедурам с рекомбинантной ДНК и мо-

жет обеспечивать экспрессию полинуклеотидной последовательности. Выбор вектора обычно зависит от совместимости вектора с клеткой-хозяином, в которую вектор следует вводить. В некоторых вариантах осуществления векторы представляют собой линейные или замкнутые кольцевые плазмиды.

В некоторых вариантах осуществления экспрессирующий вектор представляет собой автономно реплицирующийся вектор (т. е. вектор, который существует в виде внехромосомного объекта, репликация которого не зависит от хромосомной репликации, такого как плазида, внехромосомный элемент, минихромосома или искусственная хромосома). В некоторых вариантах осуществления вектор содержит любые средства для обеспечения саморепликации. Альтернативно, в некоторых других вариантах осуществления, при введении в клетку-хозяина, вектор встраивают в геном и реплицируют вместе с хромосомой(ами), в которую он встроен. Кроме того, в дополнительных вариантах осуществления находят применение один вектор или плазида или два или больше вектора или плазмид, которые вместе содержат полную ДНК, подлежащую введению в геном клетки-хозяина, или транспозон.

В некоторых вариантах осуществления экспрессирующий вектор по настоящему изобретению содержит один или несколько селективных маркеров, которые допускают простой отбор трансформированных клеток. "Селективный маркер" представляет собой ген, продукт которого обеспечивает устойчивость к биоциду или вирусу, устойчивость к противомикробным средствам или тяжелым металлам, прототрофность для ауксотрофов и т.п. Любые подходящие селективные маркеры для использования в клетках-хозяевах нитчатых грибов находят использование в настоящем изобретении, включая, но не ограничиваясь этим, *amdS* (ацетамидаза), *argB* (орнитинкарбамоилтрансфераза), *bar* (фосфинотрицинацетилтрансфераза), *hph* (гигромицинфосфотрансфераза), *niaD* (нитратредуктаза), *pyrG* (оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза), *sC* (сульфатаденилтрансфераза) и *trpC* (антранилатсинтаза), а также их эквиваленты. Дополнительные маркеры, которые можно использовать в клетках-хозяевах, таких как *Aspergillus*, включают, но не ограничиваясь этим, гены *amdS* и *pyrG* *Aspergillus nidulans* или *Aspergillus oryzae*, и ген *bar* *Streptomyces hygrosopicus*. Подходящие маркеры для дрожжевых клеток-хозяев включают, но не ограничиваясь этим, *ADE2*, *HIS3*, *LEU2*, *LYS2*, *MET3*, *TRP1* и *URA3*. Примеры бактериальных селективных маркеров включают, но не ограничиваясь этим, гены *dal* из *Bacillus subtilis* или *Bacillus licheniformis* или маркеры, которые придают устойчивость к антибиотикам, такую как устойчивость к ампициллину, канамицину, хлорамфениколу и/или тетрациклину.

В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие векторы по настоящему изобретению содержат элемент(ы), который допускает встраивание вектора в геном клетки-хозяина или автономную репликацию вектора в клетке независимо от генома. В некоторых вариантах осуществления, включающих встраивание в геном клетки-хозяина, векторы основаны на последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид или любой другой элемент вектора для встраивания вектора в геном посредством гомологичной или негомологичной рекомбинации.

В некоторых альтернативных вариантах осуществления, экспрессирующие векторы содержат дополнительные последовательности нуклеиновой кислоты для того, чтобы направлять встраивание посредством гомологичной рекомбинации в геном клетки-хозяина. Дополнительные последовательности нуклеиновой кислоты делают возможным встраивание вектора в геном клетки-хозяина в точном местоположении(ях) в хромосоме(ах). Чтобы увеличивать вероятность встраивания в точном местоположении, интеграционные элементы предпочтительно содержат достаточное число нуклеотидов, такое как от 100 до 10000 пар оснований, предпочтительно от 400 до 10000 пар оснований и наиболее предпочтительно от 800 до 10000 пар оснований, которые высоко гомологичны с соответствующей целевой последовательностью, чтобы увеличивать вероятность гомологичной рекомбинации. Интеграционные элементы могут представлять собой любую последовательность, которая гомологична с целевой последовательностью в геноме клетки-хозяина. Кроме того, интеграционные элементы могут представлять собой некодирующие или кодирующие последовательности нуклеиновой кислоты. С другой стороны, вектор можно встраивать в геном клетки-хозяина посредством негомологичной рекомбинации.

Для автономной репликации вектор дополнительно может содержать участок начала репликации, который делает возможной автономную репликацию вектора в рассматриваемой клетке-хозяине. Примеры бактериальных участков начала репликации представляют собой *ori P15A* или участки начала репликации плазмид *pBR322*, *pUC19*, *pACYC177* (эта плазида имеет *ori P15A*) или *pACYC184*, которые допускают репликацию в *E. coli*, и *pUB110*, *pE194*, *pTA1060* или *pAMβ1*, которые допускают репликацию в *Bacillus*. Примеры участков начала репликации для использования в дрожжевых клетках-хозяевах представляет собой 2 мкм участок начала репликации, *ARS1*, *ARS4*, комбинацию *ARS1* и *CEN3* и комбинацию *ARS4* и *CEN6*. Участком начала репликации может быть тот, который имеет мутацию, которая делает его функционирование чувствительным к температуре в клетке-хозяине (см., например, Ehrlich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1433 [1978]).

В некоторых вариантах осуществления более чем одну копию последовательности нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению вставляют в клетку-хозяина для увеличения продуцирования продукта гена. Увеличение числа копий последовательности нуклеиновой кислоты можно получать посредством встраивания по меньшей мере одной дополнительной копии последовательности в геном клетки-хозяина или посредством включения амплифицируемого гена селективного маркера с последовательно-

стью нуклеиновой кислоты, где клетки, содержащие амплифицированные копии гена селективного маркера и, тем самым, дополнительные копии последовательности нуклеиновой кислоты, можно выбирать посредством культивирования клеток в присутствии подходящего средства для отбора.

Многие экспрессирующие векторы для использования в настоящем изобретении коммерчески доступны. Подходящие коммерческие экспрессирующие векторы включают, но не ограничиваясь этим, экспрессирующие векторы p3xFLAGMTM (Sigma-Aldrich Chemicals), которые содержат промотор CMV и сайт полиаденилирования hGH для экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих и участок начала репликации pBR322 и маркеры устойчивости к ампициллину для амплификации в *E. coli*. Другие подходящие экспрессирующие векторы включают, но не ограничиваясь этим, pBluescriptII SK(-) и pBK-CMV (Stratagene), и плазмиды, полученные из pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pREP4, pCEP4 (Invitrogen) или pPoly (см., например, Lathe et al., *Gene* 57:193-201 [1987]).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления вектор, содержащий последовательность, кодирующую по меньшей мере один вариант PGA, трансформируют в клетку-хозяина для того, чтобы сделать возможным размножение вектора и экспрессию варианта(ов) PGA. В некоторых вариантах осуществления варианты PGA являются посттрансляционно модифицированными для того, чтобы удалять сигнальный пептид, и в некоторых случаях могут расщепляться после секреции. В некоторых вариантах осуществления описанную выше трансформированную клетку-хозяина культивируют в подходящей питательной среде в условиях, допускающих экспрессию варианта(ов) PGA. Любая подходящая среда, которую можно использовать для культивирования клеток-хозяев, находит применение в настоящем изобретении, включая в качестве неограничивающих примеров минимальные или комплексные среды, содержащие подходящие добавки. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева растут в средах НТР. Подходящие среды доступны у различных коммерческих поставщиков, или их можно получать в соответствии с опубликованными прописями (например, в каталогах American Type Culture Collection).

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий усовершенствованный полипептид PGA, предусмотренный в настоящем описании, полинуклеотид функционально связывают с одной или несколькими управляющими последовательностями для экспрессии фермента PGA в клетке-хозяине. Клетки-хозяева для использования в экспрессии полипептидов PGA, кодируемых экспрессирующими векторами по настоящему изобретению, хорошо известны в данной области и включают, но не ограничиваясь этим, бактериальные клетки, такие как клетки *E. coli*, *Bacillus megaterium*, *Lactobacillus kefir*, *Streptomyces* и *Salmonella typhimurium*; клетки грибов, такие как дрожжевые клетки (например, *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris* (№ доступа ATCC 201178)); клетки насекомого, такие как клетки *Drosophila S2* и *Spodoptera Sf9*; клетки животного, такие как клетки CHO, COS, ВНК, 293 и меланомы Боуэса; и клетки растения. Подходящие среды для культивирования и условия роста для описанных выше клеток-хозяев хорошо известны в данной области.

Полинуклеотиды для экспрессии PGA можно вводить в клетки с помощью различных известных в данной области способов. Приемы включают, среди прочих, электропорацию, бомбардировку библистическими частицами, опосредованную липосомами трансфекцию, трансфекцию с хлоридом кальция и слияние протопластов. Различные способы введения полинуклеотидов в клетки известны специалистам в данной области.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. Подходящие эукариотические клетки-хозяева включают, но не ограничиваясь этим, клетки грибов, клетки водорослей, клетки насекомого и клетки растения. Подходящие клетки-хозяева грибов включают, но не ограничиваясь этим, Ascomycota, Basidiomycota, Deuteromycota, Zygomycota, Fungi imperfecti. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева грибов представляют собой клетки дрожжей и клетки нитчатых грибов. Клетки-хозяева нитчатых грибов по настоящему изобретению включают все нитчатые формы подотдела Eumycotina и Oomycota. Нитчатые грибы отличаются вегетативным мицелием с клеточной стенкой, состоящей из хитина, целлюлозы и других сложных полисахаридов. Клетки-хозяева нитчатых грибов по настоящему изобретению морфологически отличны от дрожжей.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетки-хозяева нитчатых грибов относятся к любому подходящему роду и виду, включая в качестве неограничивающих примеров *Achlya*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Cephalosporium*, *Chrysosporium*, *Cochliobolus*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Diplodia*, *Endothia*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Gliocladium*, *Humicola*, *Hypocrea*, *Myceliophthora*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Podospora*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pyricularia*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Sporotrichum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Trametes*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Verticillium* и/или *Volvariella* и/или телеоморфы или анаморфы, а также их синонимы, базииномы или таксономические эквиваленты.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, клетка-хозяин представляет собой клетку дрожжей, включая в качестве неограничивающих примеров клетки видов *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluveromyces* или *Yarrowia*. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка дрожжей представляет собой *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces*

*kluuyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia kodamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia quercuum*, *Pichia piperi*, *Pichia stipitis*, *Pichia methanolica*, *Pichia angusta*, *Kluuyveromyces lactis*, *Candida albicans* или *Yarrowia lipolytica*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку водоросли, например, *Chlamydomonas* (например, *C. reinhardtii*) и *Phormidium* (*P. sp.* ATCC29409).

В некоторых других вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку. Подходящие прокариотические клетки включают, но не ограничиваясь этим, грамположительные, грамотрицательные и грамвариабельные бактериальные клетки. Любой подходящий бактериальный организм находит применение в настоящем изобретении, включая в качестве неограничивающих примеров *Agrobacterium*, *Alicyclobacillus*, *Anabaena*, *Anacystis*, *Acinetobacter*, *Acidothermus*, *Arthrobacter*, *Azobacter*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Butyrivibrio*, *Buchnera*, *Campestris*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Chromatium*, *Coprococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Fusobacterium*, *Faecalibacterium*, *Francisella*, *Flavobacterium*, *Geobacillus*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lyobacter*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Methylobacterium*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Prochlorococcus*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Roseburia*, *Rhodospirillum*, *Rhodococcus*, *Scenedesmus*, *Streptomyces*, *Streptococcus*, *Synecoccus*, *Saccharomonospora*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Thermoanaerobacterium*, *Tropheryma*, *Tularensis*, *Temecula*, *Thermosynechococcus*, *Thermococcus*, *Ureaplasma*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Yersinia* и *Zymomonas*. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой вид *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, *Azobacter*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Buchnera*, *Geobacillus*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Streptomyces* или *Zymomonas*. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм-хозяин не патогенен для человека. В некоторых вариантах осуществления бактериальный штамм-хозяин представляет собой промышленный штамм. Многие бактериальные промышленные штаммы известны и подходят для настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, бактериальная клетка-хозяин относится к виду *Agrobacterium* (например, *A. radiobacter*, *A. rhizogenes* и *A. rubi*). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, бактериальная клетка-хозяин относится к виду *Arthrobacter* (например, *A. aureus*, *A. citreus*, *A. globiformis*, *A. hydrocarboglutamicus*, *A. mysorens*, *A. nicotiana*, *A. paraffineus*, *A. protophonniae*, *A. roseoparaffinus*, *A. sulfureus* и *A. ureafaciens*). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения бактериальная клетка-хозяин относится к виду *Bacillus* (например, *B. thuringensis*, *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. lentus*, *B. circulans*, *B. pumilus*, *B. lautus*, *B. coagulans*, *B. brevis*, *B. firmus*, *B. alkaophilus*, *B. licheniformis*, *B. clausii*, *B. stearothermophilus*, *B. halodurans* и *B. amyloliquefaciens*). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой промышленный штамм *Bacillus*, включая в качестве неограничивающих примеров *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. clausii*, *B. stearothermophilus* или *B. amyloliquefaciens*. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева *Bacillus* представляют собой *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. stearothermophilus* и/или *B. amyloliquefaciens*. В некоторых вариантах осуществления бактериальная клетка-хозяин относится к виду *Clostridium* (например, *C. acetobutylicum*, *C. tetani* E88, *C. lituseburense*, *C. saccharobutylicum*, *C. perfringens* и *C. beijerinckii*). В некоторых вариантах осуществления бактериальная клетка-хозяин относится к виду *Corynebacterium* (например, *C. glutamicum* и *C. acetoacidophilum*). В некоторых вариантах осуществления бактериальная клетка-хозяин относится к виду *Escherichia* (например, *E. coli*). В некоторых вариантах осуществления бактериальная клетка-хозяин относится к виду *Erwinia* (например, *E. uredovora*, *E. carotovora*, *E. ananas*, *E. herbicola*, *E. punctata* и *E. terreus*). В некоторых вариантах осуществления бактериальная клетка-хозяин относится к виду *Pantoea* (например, *P. citrea* и *P. agglomerans*). В некоторых вариантах осуществления бактериальная клетка-хозяин относится к виду *Pseudomonas* (например, *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. Mevalonii* и *P. sp.* D-01 10). В некоторых вариантах осуществления бактериальная клетка-хозяин относится к виду *Streptococcus* (например, *S. equisimilis*, *S. Pyogenes* и *S. uberis*). В некоторых вариантах осуществления бактериальная клетка-хозяин относится к виду *Streptomyces* (например, *S. ambofaciens*, *S. achromogenes*, *S. avermitilis*, *S. coelicolor*, *S. aureofaciens*, *S. aureus*, *S. fungicidicus*, *S. Griseus* и *S. lividans*). В некоторых вариантах осуществления бактериальная клетка-хозяин относится к виду *Zymomonas* (например, *Z. mobilis* и *Z. lipolytica*).

Образцовой клеткой-хозяином является *Escherichia coli* W3110. Экспрессирующий вектор создавали, функционально связывая полинуклеотид, кодирующий усовершенствованную PGA, в плазмиду pСК110900, функционально связанную с промотор *lac* под управлением репрессора *lad*. Экспрессирующий вектор также содержал участок начала репликации P15a и ген устойчивости к хлорамфениколу. Клетки, содержащие рассматриваемый полинуклеотид в *Escherichia coli* W3110, выделяли через отбор клеток с использованием хлорамфеникола.

Многие прокариотические и эукариотические штаммы, которые находят использование в настоящем изобретении, легко доступны для публики во многих коллекциях культур, таких как American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Cen-

traalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) и Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева генетически модифицируют, чтобы они имели характеристики, которые усовершенствуют секрецию белка, стабильность белка и/или другие свойства, желательные для экспрессии и/или секреции белка. Генетическую модификацию можно осуществлять с помощью приемов генетической инженерии и/или классических микробиологических приемов (например, химический или УФ мутагенез и последующий отбор). В действительности, в некоторых вариантах осуществления комбинации приемов рекомбинантной модификации и классического отбора используют для получения клеток-хозяев. Используя рекомбинантную технологию, молекулы нуклеиновой кислоты можно вводить, удалять, ингибировать или модифицировать таким образом, который ведет к увеличенному выходу варианта(ов) PGA в клетке-хозяине и/или в среде для культивирования. Например, нокаут функции *Alp1* ведет к клетке с протеазной недостаточностью, а нокаут функции *pur5* ведет к клетке с фенотипом дефицита пиримидина. В одном подходе генетической инженерии гомологичную рекомбинацию используют для того, чтобы индуцировать модификации целевого гена посредством конкретного направленного воздействия на ген *in vivo*, чтобы подавлять экспрессию кодируемого белка. В альтернативных подходах находят использование миРНК, антисмысловая и/или рибозимная технология при ингибировании экспрессии гена. В данной области известны различные способы для снижения экспрессии белка в клетках, включая в качестве неограничивающих примеров делецию целиком или частично гена, кодирующего белок, и сайт-специфический мутагенез для нарушения экспрессии или активности продукта гена. (см., например, Chaveroche et al., *Nucl. Acids Res.*, 28:22 e97 [2000]; Cho et al., *Molec. Plant Microbe Interact.*, 19:7-15 [2006]; Maruyama and Kitamoto, *Biotechnol Lett.*, 30:1811-1817 [2008]; Takahashi et al., *Mol. Gen. Genom.*, 272: 344-352 [2004]; и You et al., *Arch. Microbiol.*, 191:615-622 [2009], все они включены по ссылке в настоящее описание). Также находят применение случайный мутагенез, за которым следует скрининг желаемых мутаций (см., например, Combier et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 220:141-8 [2003]; и Firon et al., *Eukary. Cell* 2:247-55 [2003], обе включены по ссылке).

Введение вектора или конструкции ДНК в клетку-хозяина можно выполнять с использованием любого подходящего известного в данной области способа, включая в качестве неограничивающих примеров трансфекцию с фосфатом кальция, опосредованную DEAE-декстраном трансфекцию, PEG-опосредованную трансформацию, электропорацию или другие обычные приемы, известные в данной области.

В некоторых вариантах осуществления сконструированные клетки-хозяева (т.е. "рекомбинантные клетки-хозяева") по настоящему изобретению культивируют в стандартных питательных средах модифицированных по ситуации для активации промоторов, отбора трансформантов или амплификации полинуклеотида PGA. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., представляют собой то, что использовали ранее для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и они общеизвестны специалистам в данной области. Как отмечено, многие стандартные источники и тексты доступны для культивирования и получения многих клеток, включая клетки, происходящие от бактерий, растений, животных (в частности, млекопитающих) и археобактерий.

В некоторых вариантах осуществления клетки, экспрессирующие полипептиды вариантов PGA по изобретению, растут в условиях порционной или непрерывной ферментации. Классическая "порционная ферментация" представляет собой закрытую систему, в которой композиции среды задают в начале ферментации и не подвергают искусственным изменениям в ходе ферментации. Вариацией порционной системы является "порционная ферментация с подпиткой", которая также находит применение в настоящем изобретении. В этой вариации субстрат добавляют частями по мере протекания ферментации. Порционные системы с подпиткой можно использовать, когда катаболитная репрессия вероятно ингибирует метаболизм клеток и когда желательно иметь ограниченные количества субстрата в среде. Порционная ферментация и порционная ферментация с подпиткой являются обычными и хорошо известными в данной области. "Непрерывная ферментация" представляет собой открытую систему, где определенную среду для ферментации непрерывно добавляют в биореактор и одновременно равное количество кондиционированной среды удаляют для обработки. Непрерывная ферментация в целом поддерживает культуры при постоянной высокой плотности, где клетки прежде всего находятся в логарифмической фазе роста. Системы непрерывной ферментации стремятся поддерживать условия устойчивого роста. Способы с модулирующими питательными веществами и факторами роста для непрерывного процесса ферментации, а также приемы максимизации скорости образования продукта, хорошо известны в области промышленной микробиологии.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, бесклеточные системы транскрипции/трансляции находят использование при получении варианта(ов) PGA. Несколько систем коммерчески доступны, и способы общеизвестны специалистам в данной области.

Настоящее изобретение предусматривает способы получения полипептидов вариантов PGA или их биологически активных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления способ включает: предоставление клетки-хозяина, трансформированной полинуклеотидом, кодирующим аминокислотную последовательность, которая обладает по меньшей мере приблизительно 70% (или по меньшей мере прибли-

зительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99%) идентичностью последовательностей с SEQ ID № 12, 24, 40, 56, 70, 82, 100, 108, 110, 116, 136, 154 и/или 160, и содержит по меньшей мере одну мутацию, как предусмотрено в настоящем описании; культивирование трансформированной клетки-хозяина в среде для культивирования в условиях, в которых клетка-хозяин экспрессирует кодируемый полипептид варианта PGA; и необязательно извлечение или выделение экспрессируемого полипептида варианта PGA и/или извлечение или выделение среды для культивирования, содержащей экспрессируемый полипептид варианта PGA. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно предусматривают необязательный лизис трансформированных клеток-хозяев после экспрессии кодируемого полипептида PGA и необязательно извлечение и/или выделение экспрессируемого полипептида варианта PGA из клеточного лизата. Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способы получения полипептида варианта PGA, включающие культивирование клетки-хозяина, трансформированной полипептидом варианта PGA, в условиях, подходящих для продуцирования полипептида варианта PGA, и извлечение полипептида варианта PGA. Обычно, извлечение или выделение полипептида PGA происходит из культуральной среды клетки-хозяина, клетки-хозяина или обеих с использованием приемов извлечения белка, которые хорошо известны в данной области, включая те, что описаны в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева собирают посредством центрифугирования, разрушают физическими или химическими средствами и получаемый неочищенный экстракт сохраняют для дальнейшей очистки. Микробные клетки, используемые при экспрессии белков, можно разрушать любым удобным способом, включая в качестве неограничивающих примеров циклическое замораживание-оттаивание, обработку звуком, механическое разрушение и/или использование средств для лизиса клеток, а также многими другими подходящими способами, хорошо известными специалистам в данной области.

Сконструированные ферменты PGA, экспрессируемые в клетке-хозяине, можно извлекать из клеток и/или среда для культивирования с использованием любого одного или нескольких общеизвестных приемов для очистки белка, включая, среди прочего, обработку лизоцимом, обработку звуком, фильтрование, высаливание, ультрацентрифугирование и хроматографию. Подходящие растворы для лизирования и высокоэффективного экстрагирования белков из бактерий, таких как *E. coli*, коммерчески доступны под торговым названием CellLytic B™ (Sigma-Aldrich).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления получаемый полипептид извлекают/выделяют и необязательно очищают любыми из многих известных в данной области способов. Например, в некоторых вариантах осуществления полипептид выделяют из питательной среды с помощью стандартных процедур, включая в качестве неограничивающих примеров центрифугирование, фильтрование, экстрагирование, распылительную сушку, испарение, хроматографию (например, ионообменную, аффинную, гидрофобного взаимодействия, хроматофокусирование и эксклюзионную) или преципитацию. В некоторых вариантах осуществления стадии повторной укладки белка используют, по желанию, по завершению конфигурация зрелого белка. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC) используют на конечных стадиях очистки. Например, в некоторых вариантах осуществления известные в данной области способы находят использование в настоящем изобретении (см., например, Parry et al., *Biochem. J.*, 353:117 [2001]; и Hong et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73:1331 [2007], обе включены в настоящее описание посредством ссылки). В действительности, любые подходящие способы очистки, известные в данной области, находят использование в настоящем изобретении.

Хроматографические приемы для выделения полипептида PGA включают, но не ограничиваясь этим, хроматографию с обращенной фазой высокоэффективную жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, электрофорез в геле и аффинную хроматографию. Условия для очистки конкретного фермента зависят отчасти от таких факторов, как суммарный заряд, гидрофобность, гидрофильность, молекулярная масса, молекулярная форма и т.д., которые известны специалистам в данной области.

В некоторых вариантах осуществления аффинные приемы находят использование при выделении усовершенствованных ферментов PGA. Для очистки аффинной хроматографией можно использовать любое антитело, которое специфически связывает полипептид PGA. Для получения антител различных животных-хозяев, включая в качестве неограничивающих примеров кроликов, мышей, крыс и т.д., можно иммунизировать посредством инъекции PGA. Полипептид PGA можно прикреплять к подходящему носителю, такому как BSA, через функциональную группу боковой цепи или линкеры, прикрепленные к функциональной группе боковой цепи. Различные адъюванты можно использовать для увеличения иммунологического ответа, в зависимости от биологического вида хозяина, в том числе, в качестве неограничивающих примеров, Фрейнда (полный и неполный), минеральные гели, такие как гидроксид алюминия, поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, полиолы Pluronic, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, гемоцианин морского блюдца, динитрофенол и потенциально эффективные адъюванты человека, такие как VCG (бацилла Кальмета-Герена) и *Corynebacterium parvum*.

В некоторых вариантах осуществления варианты PGA получают и используют в форме клеток, экспрессирующих ферменты, в виде неочищенных экстрактов или в виде выделенных или очищенных препаратов. В некоторых вариантах осуществления варианты PGA получают в виде лиофилизатов, в порошкообразной форме (например, ацетоновые порошки) или получают в виде растворов фермента. В некоторых вариантах осуществления варианты PGA находятся в форме по существу чистых препаратов.

В некоторых вариантах осуществления полипептиды PGA прикрепляют к любой подходящей твердой подложке. Твердые подложки включают, но не ограничиваясь этим, твердую фазу, поверхность и/или мембрану. Твердые носители включают, но не ограничиваясь этим, органические полимеры, такие как полистирол, полиэтилен, полипропилен, полифторэтилен, полиэтиленокси и полиакриламид, а также их сополимеры и привитые полимеры. Твердый носитель также может быть неорганическим, например, стеклом, диоксидом кремния, стеклом с контролируемым размером пор (CPG), диоксидом кремния обращенной фазы или металлом, таким как золото или платина. Конфигурация субстрата может быть в форме бусин, сфер, частиц, гранул, геля, мембраны или поверхности. Поверхности могут быть плоскими, по существу плоскими или не плоскими. Твердые носители могут быть пористыми или не пористыми и могут иметь набухающие или не набухающие характеристики. Твердый носитель можно выполнять в форме лунки, впадины или другого контейнера, сосуда, признака или местоположения. Множество опор можно выполнять в массиве в различных местоположениях, с возможностью обращения для роботизированной доставки реактивов или с помощью способов и/или инструментов обнаружения.

В некоторых вариантах осуществления иммунологические способы используют для того, чтобы очищать варианты PGA. В одном подходе антитело, образованное против полипептида варианта PGA (например, против полипептида, содержащего любую из SEQ ID №№ 2, 4, 12, 24, 40, 56, 70, 82, 100, 108, 110, 116, 136, 154 и/или 160, и/или его иммуногенного фрагмента), с использованием стандартных способов иммобилизуют на бусах, смешивают с клеточными культуральными средами в условиях, в которых связывают вариант PGA, и осаждают. В связанном подходе применение находит иммунохроматография.

В некоторых вариантах осуществления варианты PGA экспрессируют в виде слитого белка, содержащего неферментативную часть. В некоторых вариантах осуществления последовательность варианта PGA сливают с облегчающим очистку доменом. Как используют в настоящем описании, термин "облегчающий очистку домен" относится к домену, который опосредует очистку полипептида, с которым его сливают. Подходящие домены для очистки включают, но не ограничиваясь этим, металл-хелатирующие пептиды, гистидин-триптофановые модули, которые допускают очистку на иммобилизованных металлах, последовательность, которая связывает глутатион (например, GST), гемагглютининовую метку (HA) (соответствующую эпитопу, получаемому из белка гемагглютинина гриппа; см., например, Wilson et al., Cell 37:767 [1984]), последовательности мальтозусвязывающего белка, эпитоп FLAG, используемый в системе удлинения/аффинной очистки FLAGS (например, системе, доступной в Immunex Corp), и т.п. Один экспрессирующий вектор, рассматриваемый для использования в композициях и способах, описанных в настоящем описании, обеспечивает экспрессию слитого белка, содержащего полипептид по изобретению, слитый с полигистидиновой областью, отделенной сайтом расщепления энтерокиназы. Гистидиновые остатки облегчают очистку на IMIAC (аффинная хроматография на иммобилизованных ионах металла; см., например, Porath et al., Prot. Exp. Purif., 3:263-281 [1992]) тогда как сайт расщепления энтерокиназы предоставляет средство для отделения полипептида варианта PGA от слитого белка. Векторы pGEX (Promega) также можно использовать для того, чтобы экспрессировать чужеродные полипептиды в виде слитых белков с глутатион-S-трансферазой (GST). В целом, такие слитые белки растворимы и могут быть легко очищены от лизированных клеток посредством адсорбции на лиганд-агарозных бусах (например, глутатион-агарозных в случае слияния с GST), после чего следует элюирование в присутствии свободного лиганда.

### Экспериментальная часть

Различные признаки и варианты осуществления раскрытия проиллюстрированы в следующих презентативных примерах, которые предусмотрены в качестве иллюстрации и не ограничения.

Далее в раскрытии экспериментов применяют следующие сокращения: м.д. (миллионная доля); М (молярный); мМ (миллимолярный), мкМ (микромольный); нМ (наномольный); моль (моли); г (грамм); мг (миллиграмм); мкг (микрограмм); л (литр); мл (миллилитр); см (сантиметр); мм (миллиметр); мкм (микрометр); с (секунда); мин (минута); ч (час); Ед (единица); MW (молекулярная масса); об./мин (обороты в минуту); °С (градус Цельсия); RT (комнатная температура); CDS (кодирующая последовательность); ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота); РНК (рибонуклеиновая кислота); а.к. (аминокислота); ТВ (среда ТВ; 12 г/л бактотриптона, 24 г/л дрожжевого экстракта, 4 мл/л глицерина, 65 мМ фосфат калия, рН 7,0, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>); САМ (хлорамфеникол); РМБС (сульфат полимиксина В); IPTG (изопропил-β-D-тиогалактозид); ТФА (трифторуксусная кислота); СНЕС (2-циклогексиламино)этансульфоновая кислота; НРЛС (высокоэффективная жидкостная хроматография); FIOPC (кратность ускорения отношения относительно положительного контроля); НТР (высокая пропускная способность); LB (бульон Лурия); Codexis (Codexis, Inc., Redwood City, CA); Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); Millipore (Millipore, Corp., Billerica MA); Difco (Difco Laboratories, BD Diagnostic Systems, Detroit, MI); Daicel (Daicel, West

Chester, PA); Genetix (Genetix USA, Inc., Beaverton, OR); Molecular Devices (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA); Applied Biosystems (Applied Biosystems, часть Life Technologies, Corp., Grand Island, NY), Agilent (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA); Thermo Scientific (часть Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA); (Infors; Infors-HT, Bottmingen/Basel, Switzerland); Corning (Corning, Inc., Palo Alto, CA); и Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA); Microfluidics (Microfluidics Corp., Newton, MA).

Пример 1. Экспрессионные хозяева *E.coli*, содержащие гены рекомбинантных PGA.

Исходные ферменты PGA, используемые для получения вариантов по настоящему изобретению, получали или из панели ацилаз Codex® ("планшет панели PGA"; Codexis) или вариантов, раскрытых в публикации заявки на патент США совместного владения № 2016/0326508. Планшет панели PGA содержит совокупность сконструированных полипептидов PGA, которые имеют усовершенствованные свойства, по сравнению с PGA дикого типа *Kluuyvera citrophila*. Ген PGA дикого типа представляет собой гетеродимер, состоящий из альфа-субъединицы (23,8 кДа) и бета-субъединицы (62,2 кДа), которые связаны с помощью спейсерной области из 54 а.к. Из-за отсутствия спейсерной области, стадия аутопроцессинга необходима для того, чтобы формировать активный белок. В ходе разработки настоящего изобретения, ген дикого типа модифицировали для устранения спейсерной области, таким образом устраняя стадию аутопроцессинга. Планшет панели PGA (Codexis) содержит варианты PGA, которые не содержат спейсерную область (см., например, публикацию заявки на патент США 2010/0143968 A1). Кодированные PGA гены клонировали в экспрессирующий вектор pСК110900 (см. фиг. 3 в публикации заявки на патент США № 2006/0195947), функционально связанный с промотором *lac* под управлением репрессора *lacI*. Экспрессирующий вектор также содержит участок начала репликации P15a и ген устойчивости к хлорамфениколу. Получаемые плазмиды трансформировали в *E.coli* W3110 с использованием стандартных известных в данной области способов. Трансформанты выделяли, подвергая клетки отбору с хлорамфениколом, как известно в данной области (см., например, патент США № 8383346 и WO2010/144103).

Пример 2. Получение НТР PGA-содержащих влажных клеточных осадков

Клетки *E.coli*, содержащие кодирующие рекомбинантную PGA гены из моноклональных колоний, инокулировали в 180 мкл LB, содержащего 1% глюкозу и 30 мкг/мл хлорамфеникола в лунках 96-луночных микротитровальных планшетов с мелкими лунками. Планшеты закупоривали O<sub>2</sub>-проницаемыми уплотнениями и культуры выращивали в течение ночи при 30°C, 200 об./мин и 85% влажности. Затем 10 мкл каждой клеточной культуры переносили в лунки 96-луночных планшетов с глубокими лунками, содержащих 390 мкл ТВ и 30 мкг/мл САМ. Планшеты с глубокими лунками закупоривали O<sub>2</sub>-проницаемыми уплотнениями и инкубировали при 30°C, 250 об./мин и 85% влажности, пока не достигали OD6000,6-0,8. Затем клеточные культуры индуцировали с использованием IPTG до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали в течение ночи при тех же условиях как исходно использовали. Затем клетки осаждали с использованием центрифугирования на 4000 об./мин в течение 10 мин. Супернатанты выбрасывали, а осадки замораживали при -80°C перед лизисом.

Пример 3. Получение НТР PGA-содержащих клеточных лизатов

Сначала 200 мкл лизирующего буфера, содержащего 10 мМ буфера Tris-HCl, pH 7,5, 1 мг/мл лизоцима и 0,5 мг/мл PMBS, добавляли к клеточной массе в каждой лунке, полученной, как описано в примере 2. Клетки лизировали при комнатной температуре в течение 2 ч при встряхивании на настольном встряхивателе. Затем планшет центрифугировали в течение 15 мин на 4000 об./мин и при 4°C. Затем прозрачные супернатанты использовали в биокаталитических реакциях для того, чтобы определять уровни их активности.

Пример 4. Получение лиофилизированных лизатов из культур во встряхиваемых колбах (SF).

Выбранные НТР культуры, которые растили как описано выше, высевали на планшеты с LB агаром с 1% глюкозы и 30 мкг/мл САМ и растили в течение ночи при 37°C. Одну колонию из каждой культуры переносили в 6 мл LB с 1% глюкозы и 30 мкг/мл САМ.

Культуры выращивали в течение 18 ч при 30°C, 250 об./мин и пересевали приблизительно 1:50 в 250 мл ТВ, содержащей 30 мкг/мл САМ, до конечной OD600 0,05. Культуры выращивали в течение приблизительно 195 минут при 30°C, 250 об./мин, до OD600 0,6-0,8 и индуцировали с использованием 1 мМ IPTG. Затем культуры выращивали в течение 20 ч при 30°C, 250 об./мин. Культуры центрифугировали 4000 об./мин×20 мин. Супернатант выбрасывали и осадки ресуспендировали в 30 мл 20 мМ TRIS-HCl, pH 7,5. Клетки осаждали (4000 об./мин×20 мин) и замораживали при -80°C на 120 мин. Замороженные осадки ресуспендировали в 30 мл 20 мМ TRIS-HCl, pH 7,5 и лизировали с использованием обрабатывающей системы Microfluidizer® (Microfluidics) при 18000 фунтов/дюйм<sup>2</sup>. Лизаты осаждали (10000 об./мин×60 мин) и супернатанты замораживали и лиофилизировали для того, чтобы создавать ферменты встряхиваемых колб (SF).

Пример 5. Усовершенствования в ацилировании инсулина в положениях A1, B1 и B29 относительно SEQ ID № 4

SEQ ID № 4 выбирали в качестве родительского фермента на основе результатов скрининга вариантов, раскрытых в публикации заявки на патент США совместного владения № 2016/0326508, для получения B29-деацилированного продукта. Библиотеки сконструированных генов получали с использованием

луночных приемов (например, насыщающий мутагенез и рекомбинация предварительно идентифицированных полезных мутаций).

Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в НТР, как описано в примере 2, а растворимые лизаты создавали, как описано в примере 3.

Каждая реакционная лунка содержала 200 мкл 0,1 М CHES, pH 10, 10 г/л инсулина, 17 г/л метилфенилацетата и 20 мкл НТР супернатанта. НТР планшеты инкубировали во встряхивателе Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 300 об./мин, в течение 20 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в течение 5 минут с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 мин и загружали в HPLC для анализа.

Активность относительно SEQ ID № 4 (активность FIOP) вычисляли как процент превращения продукта, образуемого вариантом, относительно процента превращения, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 4. Результаты показаны в табл. 5.1. Процент превращения вычисляли посредством деления площади пика продукта на сумму площадей пиков субстрата, продукта и примесей/побочного продукта как наблюдали по HPLC анализу. В табл. 5.2 приведены результаты, показывающие избирательность вариантов относительно SEQ ID № 4.

Таблица 5.1. Активность вариантов относительно SEQ ID № 4

№ варианта	SEQ ID № (н./а . к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 4)	Процент превращения ацилированием FIOP <sup>1</sup> в обозначенных участках (относительно SEQ ID № 4)					
			A1	B29	B1	A1/B2 9	A1/B 1	B1/B2 9
4	11/12	F71G;G74D	+++	+++	++++	++++	++++	++++
5	17/18	F24Y;V28A;F71C;F701W	+			++++		

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 4 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 2,5 раза увеличенная активность; "++" > чем в 2,5 раза, но меньше чем в 5 раз увеличенная активность; "+++" > чем в 5 раз увеличенная активность, но меньше чем в 10 раз; "++++" > чем в 10 раз.

Таблица 5.2. Избирательность вариантов относительно SEQ ID № 4

№ варианта	SEQ ID № (н./а . к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 4)	Процент избирательности ацилирования (FIOP) <sup>1</sup> в обозначенных участках (относительно SEQ ID № 4)					
			A1	B29	B1	A1/B 29	A1/B 1	B1/B 29
3	85/86	F71R	+					
4	11/12	F71G;G74D		+	+++ +	++++	++++	++++
5	17/18	F24Y;V28A;F71C;F701W				++++		

<sup>1</sup> Уровни увеличенной избирательности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 4 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 2,5 раза увеличенная избирательность; "+ + " > чем в 2,5 раза, но меньше чем в 5 раз увеличенная избирательность; "+++" > чем в 5 раз увеличенная избирательность, но меньше чем в 10 раз; "++++" > чем в 10 раз.

Пример 6. Усовершенствование ацилирования инсулина в положениях A1, B1 и B29 по сравнению с SEQ ID № 12 в высокопропускном скрининге

SEQ ID № 12 выбирали в качестве следующего родительского фермента на основе результатов, описанных в примере 5, (т.е., наилучший фермент, идентифицированный при ацилировании инсулина в положении B29). Библиотеки сконструированных генов получали с использованием луночных приемов (например, насыщающий мутагенез и рекомбинация предварительно идентифицированных полезных мутаций).

Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в НТР, как описано в примере 2, а растворимые лизаты создавали, как описано в примере 3.

Скрининг каждого варианта осуществляли в 200 мкл реакции, состоящей из 10 г/л инсулина, 0,1 М TRIS буфера pH 9,25, 20% ацетонитрила, 17 г/л метилфенилацетата и 10 мкл осветленного лизата, в течение 5 ч при 30°C. 96-луночные планшеты закупоривали теплом и инкубировали во встряхивателе

Thermotron® на 100 об./мин. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 мин и загружали в HPLC для анализа.

Процент превращения относительно SEQ ID № 12 (процент превращения FIOР) вычисляли как процент превращения продукта, образуемого вариантом, относительно процента превращения, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 12. Эти результаты представлены в табл. 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6 и 6.7. Процент превращения вычисляли посредством деления площади пика продукта на сумму площадей пиков субстрата, продукта и примесей/побочного продукта как наблюдали по HPLC анализу.

Процент избирательности относительно SEQ ID № 12 (процент избирательности FIOР) вычисляли как процент избирательности продукта, образуемого вариантом, относительно процента избирательности, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 12. Результаты представлены в табл. 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6 и 6.7. Процент избирательности вычисляли посредством деления площади пика продукта на сумму площадей пиков продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Таблица 6.1. Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участку A1, относительно SEQ ID № 12

№ варианта	SEQ ID № (н./а . к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 12)	Процент превращения ацилированным (FIOР) <sup>1</sup> по участку A1 (относительно SEQ ID № 12)	Процент избирательности ацилирования (FIOР) <sup>1</sup> для участка A1 (относительно SEQ ID № 12)
6		Y27T;A255G;W370I;	+++	
7		D623N;	+	
8		T384R;	++	+
9		L253S;	+	+
10		T705S;	+	
11		A373Y;	+	+
12		Y27T;F254W;A470V;	++	
13		Y27T;L253V;A255G;N348R;	+	
14		Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R;K369C;T384P;	+	+
15		Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;K369C;T384P;	++	+
16		L253M;	+	+
17		N457T;	+	+
18		R317S;Q380P;	+	+
19	69/70	K128W;	+	+

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности или избирательности определяли относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 12 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,0 раза, но меньше чем в 1,5 раза увеличены; "++" > чем в 1,5 раза, но меньше чем в 2,0 раза; "+++" > чем в 2,0 раза.

Таблица 6.2. Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участку B29, относительно SEQ ID № 12

№ варианта	SEQ ID № (н./а.к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 12)	Процент превращения ацилированных (FIOP) <sup>1</sup> по участку B29 (относительно SEQ ID № 12)	Процент избирательности ацилированных (FIOP) <sup>2</sup> для участка B29 (относительно SEQ ID № 12)
20		Y27T;N348R;D381K;	+	+
21		Y27T;D74S;A255G;N348R; K369C;D381K;		+
22	15/16	Y27T;D74S;A255G;N348R; D381K;T384P;	+	+
23		Y27T;N348R;K369C;W370I; D381K;T384P;		+
24		Y27T;D74G;F254W;A255G; N348R;K369C;W370I;D381K;		+
25		Y27T;F254W;A255G;N348R; W370I;D381K;		+
26	13/14	Y27T;A255G;N348R;W370I; D381K;T384P;		+
27		D381F;	+	+
28		Q134M;	+	+

29		D623W;	++	+
30		L253R;	+	+
31		N627M;	+	+
32		N627R;	+	+
33		D623N;	++	+
34		K615V;	+	+
35		D381L;	+	+
36		D381R;	+	++
37		A132G;	+	+
38		A467S;	+	+
39		F256Y;	+	+
40		D623V;	+	+
41		K615H;		+
42		D623A;	+	+
43		D381Q;	+	+
44		K615C;		+
45		T384R;	+	+
46		F256H;	+	+
47		T453C;		+
48		D381V;		+
49		D381K;	+	+
50		D381F;Q672K;		+
51		D623Y;	+	+
53		D623R;	+++	++
54		D623F;	+	+
55		D623K;	+++	++
56		D381I;		+
57		A373K;	+++	++
58		S706K;	+	++
59		N348K;A467T;	+	+
60		D709G;	+	+
61		D709A;	+	+
62		F620R;	+	+
63		D709N;	+	++
64		D709H;	+	+
65		E377A;		+
66		F620K;	+	+
67		S706R;		+
68	21/22	D709R;	+	++++
69		N20S;D709Q;		+
70		D709S;	+	+
71		V618C;	+	+
72		A69M;		+
73		F254K;	+	+
74		A84V;		+
75		F701H;		+
76		P383K;		+
77		A69L;		++
78		I708V;		+
79		A255K;	++	++
80		A255R;	++	++
81		A69V;		+
82		P383R;		++++

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 12 и определяли следующим образом: "+" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 4,0 раза увеличены; "++" > чем в 4,0 раза, но меньше чем в 6,0 раза; "+++ " > чем в 6,0 раза.

<sup>2</sup> Уровни увеличенной избирательности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 12 и определяли следующим образом: "+" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 5,0 раза увеличе-

ны; "++ " > чем в 5,0 раза, но меньше чем в 10,0 раза; "+++ " > чем в 10,0 раза, но меньше чем в 15 раз; "++++ " > чем в 15 раз.

Таблица 6.3. Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участкам A1 и B29, относительно SEQ ID № 12

№ варианта	SEQ ID № (н./а . к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 12)	Процент превращения ацилированием (FIOF) <sup>1</sup> по участкам A1 и B29	Процент избирательности ацилирования (FIOF) <sup>2</sup> для участков A1 и B29
			(относительно SEQ ID № 12)	(относительно SEQ ID № 12)
198		Y27T;D74S;F254W;N348R;D381W;	+	+
199		Y27T;A255G;N348R;W370I;	+	
200		Y27T;N348R;T384P;	+	+
201		Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R;D381W;	+	+
202		Y27T;D74S;N348R;	+	
203		Y27T;A255G;N348R;	+	+
204		Y27T;L253V;N348R;D381F;T384P;	+	+
205		Y27T;L253V;F254W;N348R;T384P;	+	
206		Y27T;D74P;F254W;A255G;N348R;D381K;T384P;	+	+
207		Y27T;N348R;	+	+
208		Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I;D381W;T384P;	+	
22	15/16	Y27T;D74S;A255G;N348R;D381K;T384P;	+	+
209		Y27T;D74G;F254W;N348R;D381W;T384P;	+	+
210		Y27T;F254W;A255G;D381K;T384P;	+	+
211		Y27T;D74S;F254W;N348R;D381F;	+	+
212		Y27T;A255G;N348R;D381W;T384P;	+	+
213		Y27T;F254W;N348R;D381W;T384P;	+	+
214		Y27T;D74G;N348R;	+	+
181		Y27T;F254W;A255G;T384P;	++	+
182		Y27T;F254W;A255G;	++	+
215		Y27T;D74S;L253V;N348R;	+++	++
183		Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R;D381F;T384P;	+	+
184		Y27T;F254W;A255G;N348R;	+	+
185		Y27T;D74N;F254W;T384P;	+++	+

186		Y27T;L253V;N348R;	+	
187		Y27T;D74G;A255G;N348R;	++	++
12		Y27T;F254W;A470V;	+	
13		Y27T;L253V;A255G;N348R;	+	+
189		Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R; D381F;	++	+
6		Y27T;A255G;W370I;	++	+
190		Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R;	+++	++
216		Y27T;D74N;L253V;F254W;	+	
191	9/10	Y27T;D74S;L253V;F254W;N348R; D381W;T384P;	++	++
192		Y27T;D74N;F254W;A255G;N348R;	+++	++
217	5/6	Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G; N348R;	+++	+
194		Y27T;L253V;N348R;W370I;D381F ;T384P;	+	+
26	13/14	Y27T;A255G;N348R;W370I;D381K ;T384P;	+	+
195		Y27T;D74S;A255G;W370I;	++	+
29		D623W;	+	+
30		L253R;	+	+
42		D623A;	+	+
218		D623N;	+	+
46		F256H;	+	+
219		A616R;	+	
220		D623L;	+	+
51		D623Y;	+	+
54		D623F;	+	+
55		D623K;	+	+
221		D381Q;	+	+
222		T384R;	++	++
223	19/20	D623R;	++	+++
57		A373K;	+	+
224		H472R;	+	
225		F620R;	+	+
197		A255P;	+	
73		F254K;	+	+
80		A255R;	+	+

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 12 и определяли следующим образом: "+" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 5,0 раза увеличены; "++" > чем в 5,0 раза, но меньше чем в 10,0 раза; "+++" > чем в 10,0 раза.

<sup>2</sup> Уровни увеличенной избирательности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 12 и определяли следующим образом: "+" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 5,0 раза увеличены; "++" > чем в 5,0 раза, но меньше чем в 7,0 раза; "+++" > чем в 7,0 раза.

Таблица 6.4. Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участкам A1 и B1, относительно SEQ ID № 12

№ варианта	SEQ ID № (н./а.к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 12)	Процент превращения ацилирование м (FIOP) <sup>1</sup> по участкам A1 и B1 (относительно SEQ ID № 12)	Процент избирательности ацилирования (FIOP) <sup>2</sup> для участков A1 и B1 (относительно SEQ ID № 12)
226		Y27T;L253V;A255G;N348R;T384P;	+	+
83		Y27T;L253V;	+	+
84		Y27T;D74G;L253V;F254W;	+	+
85		Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;W370I;T384P;	+	+
86		Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I;D381K;T384P;	+	+
87		Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;	+	+
199		Y27T;A255G;N348R;W370I;	+	+

## 043748

227		Y27T;D74P;L253V;F254W; A255G;N348R;K369C;W370 I;	+	+
88		Y27T;D74G;L253V;N348R; K369C;W370I;D381F;T384 P;	+	+
89		Y27T;L253V;F254W;N348R ;	+	+
90		Y27T;D74P;L253V;F254W; A255G;N348R;	+	+
228		Y27T;	+	
229		Y27T;D74G;L253V;N348R; K369C;W370I;	+	+
91		Y27T;D74G;L253V;F254W; A255G;W370I;	++	+
92		Y27T;L253V;F254W;A255G ;	+	+
93		Y27T;D74G;L253V;F254W; T384P;	+	+
94		Y27T;D74N;F254W;N348R; W370I;	+	+
95		Y27T;D74S;L253V;N348R; W370I;D381K;T384P;	+	+
96		Y27T;L253V;A255G;W370I ;	+	+
97		Y27T;D74G;F254W;A255G; D381F;	+	+
98		Y27T;L253V;K369C;W370I ;	+	+
230		Y27T;D74P;F254W;A255G; N348R;	+	+
99		Y27T;L253V;F254W;N348R ;D381F;	+	+
101		Y27T;D74S;L253V;A255G; T384P;	+	+

## 043748

231		Y27T;D74G;A255G;W370I;	+	+
232		Y27T;D74S;N348R;	+	
102		Y27T;D74N;L253V;N348R; W370I;D381W;T384P;	+	+
233		Y27T;D74G;L253V;F254W; N348R;	+	+
103		Y27T;D74P;L253V;N348R;	+	+
234		Y27T;L253V;F254W;A255G ;N348R;	+	+
235		Y27T;D74S;L253V;F254W; A255G;N348R;	+	+
104		Y27T;D74G;F254W;A255G; N348R;K369C;W370I;D381 F;	+	+
105		Y27T;D74P;F254W;A255G; N348R;K369C;W370I;	+	+
106	65/6 6	Y27T;D74N;L253V;F254W; W370I;D381K;	++	+
236		Y27T;D74G;F254W;K369C; W370I;	+	+
237		Y27T;D74G;L253V;N348R; W370I;	+	+
107		Y27T;D74G;L253V;T384P;	+	+
108		Y27T;D74S;N348R;W370I;	+	+
109		Y27T;D74S;L253V;F254W; A255G;K369C;W370I;	+	+
238		Y27T;D74G;F254W;A255G; N348R;	+	+
239		Y27T;L253V;N348R;W370I ;T384P;	+	+
111		Y27T;D74N;L253V;F254W; A255G;	+	+
240		Y27T;L253V;F254W;	+	+
241		Y27T;D74G;K369C;W370I;	+	+
242		Y27T;F254W;A449V;	+	+

## 043748

114		Y27T;D74G;L253V;A255G; N348R;D381W;	+	+
115		Y27T;D74P;L253V;W370I;	+	+
117		Y27T;D74G;L253V;F254W; A255G;W370I;D381K;T384 P;	++	+
118		Y27T;D74N;F254W;A255G; N348R;W370I;D381K;	+	+
119		Y27T;D74S;L253V;N348R; K369C;W370I;T384P;	+	+
243		Y27T;D74N;L253V;N348R;	+	+
120		Y27T;D74N;L253V;F254W; N348R;W370I;D381F;	+	+
121		Y27T;D74S;F254W;A255G; N348R;W370I;D381F;T384 P;	+	+
122		Y27T;D74G;L253V;F254W; A255G;D381K;	+	+
123		Y27T;D74S;F254W;K369L; W370I;	+	+
124		Y27T;L253V;F254W;D381F ;T384P;	+	+
125		Y27T;D74G;L253V;F254W; A255G;K369C;W370I;	+	+
126		Y27T;D74G;F254W;A255G; N348R;W370I;	+	+
127		Y27T;D74G;L253V;F254W; A255G;N348R;W370I;T384 P;	+	+
128		L253V;N348R;W370I;	+	+
244		Y27T;F254W;N348R;W370I ;	+	+
129		Y27T;D74N;L253V;F254W; K369C;	+	+
131		Y27T;D74S;L253V;N348R;	+	+

		D381W;		
245		Y27T;D74S;A255G;	+	+
134		Y27T;D74S;L253V;A255G; N348R;W370I;D381K;	+	+
136		Y27T;D74N;L253V;F254W; A255G;N348R;W370I;T384 P;	+	+
137		Y27T;D74S;F254W;A255G; W370I;	++	+
138		Y27T;F254W;A255G;K369C ;W370I;D381F;T384P;	+	+
139		Y27T;L253V;F254W;D381F ;	+	+
140		Y27T;D74N;F254W;N348R;	+	+
141	67/6 8	Y27T;F254W;A255G;W370I ;	++	+
142		Y27T;D74N;A107V;A255G; N348R;K369C;W370I;	+	+
143		Y27T;F254W;A255G;N348R ;W370I;	+	+
144		Y27T;D74N;F254W;	+	+
246		Y27T;D74S;F254W;K369C; T384P;	+	+
145		Y27T;D74G;L253V;D381F; T384P;	+	+
146		Y27T;D74P;L253V;A255G;	+	+
247		Y27T;D74G;A255G;N348R; K369C;W370I;	+	+
148		Y27T;D74S;F254W;A255G; N348R;K369C;W370I;	+	+
248		Y27T;F254W;A255G;N348R ;K369C;W370I;	+	+
149		Y27T;D74P;W370I;	+	+
249		Y27T;D74P;L253V;F254W; N348R;K369C;W370I;	+	+

## 043748

150		Y27T;L253V;F254W;T384P ;	+	+
205		Y27T;L253V;F254W;N348R ;T384P;	+	+
151		Y27T;D74N;L253V;F254W; A255G;W370I;	+	+
250		Y27T;F254W;A255G;N348R ;	+	+
251		Y27T;D74S;F254W;N348R;	+	+
153		Y27T;F254W;A255G;N348R ;W370I;T384P;	+	+
252		D74N;L253V;F254W;K369C ;W370I;	+	+
253		Y27T;D74S;K369C;W370I; D381K;T384P;	+	+
155		Y27T;L253V;A255G;W370I ;D381F;T384P;	++	+
157		Y27T;L253V;F254W;N348R ;W370I;T384P;	+	+
158		Y27T;D74N;F254W;N348R; W370I;D381K;	+	+
159		Y27T;D74N;L253V;A255G; N348R;K369C;W370I;	+	+
160		Y27T;L253V;F254W;N348R ;D381W;T384P;	+	+
161		Y27T;L253V;F254W;A255G ;G260C;N348R;D381F;T38 4P;	+	
162		Y27T;D74P;L253V;F254W; N348R;D381F;T384P;	+	+
165		Y27T;D74G;L253V;A255G; N348R;T384P;	+	+
166		Y27T;D74N;L253V;A255G; W370I;	+	+
167		Y27T;D74N;A255G;N348R;	+	+

## 043748

		W370I;		
208		Y27T;F254W;A255G;N348R ;W370I;D381W;T384P;	+	+
254		Y27T;L253V;A255G;N348R ;K369C;W370I;	+	+
169		Y27T;L253V;D381F;T384P ;	+	+
170		Y27T;D74P;L253V;F254W; N348R;W370I;D381W;T384 P;	+	+
171		Y27T;L253V;F254W;A255G ;N348R;W370I;T384P;	+	+
255		A255G;N348R;W370I;	+	+
209		Y27T;D74G;F254W;N348R; D381W;T384P;	+	
210		Y27T;F254W;A255G;D381K ;T384P;	+	+
256		Y27T;D74N;F254W;A255G; K369C;	+	+
257		Y27T;D74P;L253V;F254W; N348R;	+	+
173		Y27T;L253V;F254W;N348R ;W370I;D381F;	+	+
174		Y27T;D74G;L253V;A255G;	+	+
175		Y27T;D74N;L253V;F254W; N348R;W370I;	+	+
177		Y27T;D74G;L253V;F254W; A255G;N348R;K369C;W370 I;D381F;	+	+
178		Y27T;D74G;L253V;F254W; N348R;K369C;W370I;	+	+
258		Y27T;L253V;F254W;A255G ;N348R;W370I;	++	+
179		Y27T;D74N;L253V;	+	+
181		Y27T;F254W;A255G;T384P	++	++

## 043748

		;		
182		Y27T;F254W;A255G;	++	++
215		Y27T;D74S;L253V;N348R;	++	++
183		Y27T;L253V;F254W;A255G ;N348R;D381F;T384P;	+	+
185		Y27T;D74N;F254W;T384P;	+++	++
186		Y27T;L253V;N348R;	+	+
187		Y27T;D74G;A255G;N348R;	+	+
12		Y27T;F254W;A470V;	+	+
13		Y27T;L253V;A255G;N348R ;	+	+
189		Y27T;D74G;L253V;A255G; N348R;D381F;	+	+
6		Y27T;A255G;W370I;	++	++
190		Y27T;D74S;F254W;A255G; N348R;	++	+
216		Y27T;D74N;L253V;F254W;	++++	++
191	9/10	Y27T;D74S;L253V;F254W; N348R;D381W;T384P;	++	++
192		Y27T;D74N;F254W;A255G; N348R;	++	+
193		Y27T;D74P;L253V;F254W; A255G;	+++	++
217	5/6	Y27T;D74G;L253V;F254W; A255G;N348R;	++	++
14		Y27T;D74S;F254W;A255G; N348R;K369C;T384P;	+	
15		Y27T;D74N;L253V;F254W; N348R;K369C;T384P;	+	+
194		Y27T;L253V;N348R;W370I ;D381F;T384P;	+	+
195		Y27T;D74S;A255G;W370I;	+++	++
27		D381F;	+	+
259		A132S;	+	+
28		Q134M;	+	+
29		D623W;	+	+
260		T131L;	+	+
35		D381L;	+	+
37		A132G;	+	+
262		W370V;	+	+
263		D381R;	+	+
264		T384R;	+	+
265		D623Y;	+	+
7		D623N;	+	+
266		D623R;	+	+
267		S619I;	+	
268		L253V;	+	+
269		T133K;	+	
197		A255P;	+	+
270		I708M;	+	
271		F254T;	+	+
272		T705S;	+	

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 12 и определяли следующим образом: "+" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 10,0 раза увеличены; "++" > чем в 10,0 раза, но меньше чем в 50,0 раза; "+++" > чем в 50,0 раза, но меньше чем в 100 раз; "++++" > чем 100.

<sup>2</sup> Уровни увеличенной избирательности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 12 и определяли следующим образом: "+" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 10,0 раза увеличены; "++" > чем в 10,0 раза, но меньше чем в 50,0 раза; "+++" > чем в 50,0 раза, но меньше чем в 100 раз; "++++" > чем 100.

Таблица 6.5. Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участкам A1 и B29, относительно SEQ ID № 12

№ варианта	SEQ ID № (н./а.	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 12)	Процент превращения ацилирован	Процент избирательности ацилирова
	к.)		и ем (FIOP) <sup>1</sup> по участкам A1 и B29 (относительно SEQ ID № 12)	ния (FIOP) <sup>2</sup> для участков A1 и B29 (относительно SEQ ID № 12)
85		Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;W370I;T384P;	+	+
86		Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I;D381K;T384P;	+	+
87		Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;	+	+
91		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;W370I;	+	
93		Y27T;D74G;L253V;F254W;T384P;	+	
95		Y27T;D74S;L253V;N348R;W370I;D381K;T384P;	+	+
102		Y27T;D74N;L253V;N348R;W370I;D381W;T384P;	++	+
233		Y27T;D74G;L253V;F254W;N348R;	+	
273		Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I;D381W;T384P;	+	+
235		Y27T;D74S;L253V;F254W;A255G;N348R;	+	+
106	65/66	Y27T;D74N;L253V;F254W;W370I;D381K;	+	+
108		Y27T;D74S;N348R;W370I;	+	+
111		Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;	+	
113		Y27T;D74G;A255G;W370I;	+	+
114		Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R	+	+

## 043748

		;D381W;		
115		Y27T;D74P;L253V;W370I;	+	+
117		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G ;W370I;D381K;T384P;	++	+
274		Y27T;L253V;F254W;A255G;N348 R;K369C;T384P;	+	+
118		Y27T;D74N;F254W;A255G;N348R ;W370I;D381K;	+	+
120		Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R ;W370I;D381F;	+	+
121		Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R ;W370I;D381F;T384P;	+	+
122		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G ;D381K;	+	+
126		Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R ;W370I;	+	+
127		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G ;N348R;W370I;T384P;	+	+
131		Y27T;D74S;L253V;N348R;D381W ;	+	+
245		Y27T;D74S;A255G;	+	
134		Y27T;D74S;L253V;A255G;N348R ;W370I;D381K;	+	+
136		Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G ;N348R;W370I;T384P;	+	+
137		Y27T;D74S;F254W;A255G;W370I ;	+	+
140		Y27T;D74N;F254W;N348R;	+	
141	67/6 8	Y27T;F254W;A255G;W370I;	+	
143		Y27T;F254W;A255G;N348R;W370 I;	+	
145		Y27T;D74G;L253V;D381F;T384P ;	+	+
149		Y27T;D74P;W370I;	+	

## 043748

151		Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G ;W370I;	+	+
152		Y27T;D74G;L253V;N348R;W370I ;	+	+
157		Y27T;L253V;F254W;N348R;W370 I;T384P;	+	+
160		Y27T;L253V;F254W;N348R;D381 W;T384P;	+	+
161		Y27T;L253V;F254W;A255G;G260 C;N348R;D381F;T384P;	+	+
162		Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R ;D381F;T384P;	+	+
275		Y27T;D74G;L253V;F254W;	+	+
164		Y27T;D74N;L253V;N348R;	+	+
165		Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R ;T384P;	+	+
166		Y27T;D74N;L253V;A255G;W370I ;	+	+
167		Y27T;D74N;A255G;N348R;W370I ;	+	+
276		Y27T;D74P;F254W;A255G;N348R ;D381K;T384P;	+	+
208		Y27T;F254W;A255G;N348R;W370 I;D381W;T384P;	+	+
254		Y27T;L253V;A255G;N348R;K369 C;W370I;	+	
22	15/1 6	Y27T;D74S;A255G;N348R;D381K ;T384P;	+	+
170		Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R ;W370I;D381W;T384P;	+	+
171		Y27T;L253V;F254W;A255G;N348 R;W370I;T384P;	+	+
209		Y27T;D74G;F254W;N348R;D381W ;T384P;	+	+
277		Y27T;D74N;F254W;N348R;W370I	+	+

		;		
278		Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R ;K369C;	+	+
257		Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R ;	+	
279		Y27T;F254W;K369C;D381F;T384 P;	+	+
173		Y27T;L253V;F254W;N348R;W370 I;D381F;	+	+
175		Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R ;W370I;	+	+
280		Y27T;F254W;N348R;K369C;W370 I;D381N;T384P;	+	+
180		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G ;N348R;	+	
281		D623N;	+	+
264		T384R;	+	+
220		D623L;	+	+
62		F620R;	++	+++
63		D709N;	+++	+++
19	69/7 0	K128W;	++	++
282		T705E;	++	++
283		A255E;	++	++
284		F254T;	++	++

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 12 и определяли следующим образом: "+" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 10,0 раза увеличены; "++" > чем в 10,0 раза, но меньше чем в 50,0 раза; "+++" > чем в 50,0 раза, но меньше чем в 100 раз; "++++" > чем 100.

<sup>2</sup> Уровни увеличенной избирательности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 12 и определяли следующим образом: "+" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 10,0 раза увеличены; "++" > чем в 10,0 раза, но меньше чем в 50,0 раза; "+++" > чем в 50,0 раза, но меньше чем в 100 раз; "++++" > чем 100.

Таблица 6.6. Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участкам A1, B1 и B29, относительно SEQ ID № 12

№ варианта	SEQ ID № (н./а.к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 12)	Процент превращения ацилированием (FIOP) <sup>1</sup> по участкам A1, B1 и B29 (относительно SEQ ID № 12)	Процент избирательности ацилирования (FIOP) <sup>2</sup> для участков A1, B1 и B29 (относительно SEQ ID № 12)
226		Y27T;L253V;A255G;N348R;T384P;	+	+
83		Y27T;L253V;	+	+
84		Y27T;D74G;L253V;F254W;	+	+
198		Y27T;D74S;F254W;N348R;D381W;	+	+
285		Y27T;D74G;A255G;N348R;K369C;D381F;T384P;	+	+
85		Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;W370I;T384P;	+	+
86		Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I;D381K;T384P;	++	++
87		Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;	+	+
199		Y27T;A255G;N348R;W370I;	++	+
200		Y27T;N348R;T384P;	+	+
88		Y27T;D74G;L253V;N348R;K369C;W370I;D381F;T384P;	+	+

## 043748

90		Y27T;D74P;L253V;F254W;A255G; N348R;	+	+
228		Y27T;	+	+
91		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G; W370I;	+	+
92		Y27T;L253V;F254W;A255G;	+	+
93		Y27T;D74G;L253V;F254W;T384P;	+	+
94		Y27T;D74N;F254W;N348R;W370I;	+	+
95		Y27T;D74S;L253V;N348R;W370I; D381K;T384P;	++	++
286		Y27T;L253V;N348R;	+	+
96		Y27T;L253V;A255G;W370I;	+	+
97		Y27T;D74G;F254W;A255G;D381F;	+	+
287		Y27T;F254W;N348R;T384P;	+	
201		Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R; D381W;	+	+
288		D74N;F254W;A255G;N348R;T384P ;	+	+
289		Y27T;F254W;A255G;	+	+
202		Y27T;D74S;N348R;	+	+
230		Y27T;D74P;F254W;A255G;N348R;	+	+
99		Y27T;L253V;F254W;N348R;D381F ;	+	+
101		Y27T;D74S;L253V;A255G;T384P;	+	+
231		Y27T;D74G;A255G;W370I;	++	+
102		Y27T;D74N;L253V;N348R;W370I; D381W;T384P;	++	++
233		Y27T;D74G;L253V;F254W;N348R;	++	+
103		Y27T;D74P;L253V;N348R;	+	+
234		Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R ;	+	+
235		Y27T;D74S;L253V;F254W;A255G; N348R;	+	+
104		Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R; K369C;W370I;D381F;	+	+

## 043748

105		Y27T;D74P;F254W;A255G;N348R; K369C;W370I;	+	+
106	65/6 6	Y27T;D74N;L253V;F254W;W370I; D381K;	++	++
236		Y27T;D74G;F254W;K369C;W370I;	+	+
237		Y27T;D74G;L253V;N348R;W370I;	++	+
107		Y27T;D74G;L253V;T384P;	+	+
108		Y27T;D74S;N348R;W370I;	++	+
290		Y27T;D74G;A255G;N348R;	+	+
238		Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R;	+	+
239		Y27T;L253V;N348R;W370I;T384P ;	++	+
111		Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;	+	+
242		Y27T;F254W;A449V;	+	+
114		Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R; D381W;	+	+
115		Y27T;D74P;L253V;W370I;	+	+
117		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G; W370I;D381K;T384P;	++	++
118		Y27T;D74N;F254W;A255G;N348R; W370I;D381K;	+	+
120		Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R; W370I;D381F;	++	++
121		Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R; W370I;D381F;T384P;	++	++
122		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G; D381K;	++	+
123		Y27T;D74S;F254W;K369L;W370I;	+	+
291		Y27T;D74N;F254W;A255G;N348R; K369C;D381F;	+	+
124		Y27T;L253V;F254W;D381F;T384P ;	++	+
126		Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R; W370I;	++	++
127		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;	+	+

		N348R;W370I;T384P;		
128		L253V;N348R;W370I;	+	+
244		Y27T;F254W;N348R;W370I;	+	+
131		Y27T;D74S;L253V;N348R;D381W;	++	++
132		Y27T;D74S;L253V;N348R;	+	+
245		Y27T;D74S;A255G;	+	+
292		Y27T;L253V;A255G;N348R;	+	+
134		Y27T;D74S;L253V;A255G;N348R; W370I;D381K;	+	+
136		Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G; N348R;W370I;T384P;	+	+
137		Y27T;D74S;F254W;A255G;W370I;	++	+
138		Y27T;F254W;A255G;K369C;W370I ;D381F;T384P;	+	+
203		Y27T;A255G;N348R;	+	+
139		Y27T;L253V;F254W;D381F;	+	+
140		Y27T;D74N;F254W;N348R;	+	+
141	67/6 8	Y27T;F254W;A255G;W370I;	++	++
204		Y27T;L253V;N348R;D381F;T384P ;	+	+
143		Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I ;	++	++
293		Y27T;L253V;F254W;N348R;	+	+
144		Y27T;D74N;F254W;	+	+
294		Y27T;D74N;F254W;N348R;K369C; D381F;T384P;	+	+
145		Y27T;D74G;L253V;D381F;T384P;	++	++
146		Y27T;D74P;L253V;A255G;	+	+
148		Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R; K369C;W370I;	+	+
149		Y27T;D74P;W370I;	++	+
150		Y27T;L253V;F254W;T384P;	+	+
295		Y27T;D74N;N348R;	+	+
205		Y27T;L253V;F254W;N348R;T384P	+	+

## 043748

		;		
151		Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G; W370I;	+	+
250		Y27T;F254W;A255G;N348R;	+	+
251		Y27T;D74S;F254W;N348R;	+	+
206		Y27T;D74P;F254W;A255G;N348R; D381K;T384P;	+	+
153		Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I ;T384P;	++	++
296	7/8	Y27T;D74N;N348R;T384P;	+	+
253		Y27T;D74S;K369C;W370I;D381K; T384P;	+	+
155		Y27T;L253V;A255G;W370I;D381F ;T384P;	++	++
157		Y27T;L253V;F254W;N348R;W370I ;T384P;	++	+
158		Y27T;D74N;F254W;N348R;W370I; D381K;	+	+
160		Y27T;L253V;F254W;N348R;D381W ;T384P;	++	+
297		Y27T;L253V;F254W;	+	+
161		Y27T;L253V;F254W;A255G;G260C ;N348R;D381F;T384P;	+	+
162		Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R; D381F;T384P;	++	++
164		Y27T;D74N;L253V;N348R;	+	+
165		Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R; T384P;	+	+
166		Y27T;D74N;L253V;A255G;W370I;	+	+
167		Y27T;D74N;A255G;N348R;W370I;	+	+
207		Y27T;N348R;	+	+
208		Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I ;D381W;T384P;	++	++
169		Y27T;L253V;D381F;T384P;	+	+
22	15/1	Y27T;D74S;A255G;N348R;D381K;	+	+

	6	T384P;		
170		Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R; W370I;D381W;T384P;	++	++
171		Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R ;W370I;T384P;	++	+
255		A255G;N348R;W370I;	+	+
209		Y27T;D74G;F254W;N348R;D381W; T384P;	++	++
210		Y27T;F254W;A255G;D381K;T384P ;	++	++
211		Y27T;D74S;F254W;N348R;D381F;	+	+
257		Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R;	+	+
173		Y27T;L253V;F254W;N348R;W370I ;D381F;	+	+
174		Y27T;D74G;L253V;A255G;	+	+
175		Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R; W370I;	+	+
177		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G; N348R;K369C;W370I;D381F;	+	+
178		Y27T;D74G;L253V;F254W;N348R; K369C;W370I;	+	+
212		Y27T;A255G;N348R;D381W;T384P ;	+	+
258		Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R ;W370I;	++	+
213		Y27T;F254W;N348R;D381W;T384P ;	+	+
214		Y27T;D74G;N348R;	+	+
179		Y27T;D74N;L253V;	+	+
180		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G; N348R;	+	+
29		D623W;	+	+
40		D623V;	+	+
42		D623A;	+	+
43		D381Q;	+	+
220		D623L;	+	+
298		D623N;	+	+
8		T384R;	++	+
57		A373K;	+	+
299		F620R;	+	+
300		F254T;	+	+
197		A255P;	+	+

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 12 и определяли следующим образом: "+" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 10,0 раза увеличены; "++" > чем в 10,0 раза, но меньше чем в 50,0 раза; "+++" > чем в 50,0 раза, но меньше чем в 100 раз; "++++" > чем 100.

<sup>2</sup> Уровни увеличенной избирательности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 12 и определяли следующим образом: "+" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 10,0 раза увеличены; "++" > чем в 10,0 раза, но меньше чем в 50,0 раза; "+++" > чем в 50,0 раза, но меньше чем в 100 раз; "++++" > чем 100.

Таблица 6.7. Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участку В1, относительно SEQ ID № 12

№ варианта	SEQ ID № (н./к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 12)	Процент превращения ацилированным (FIOP) <sup>1</sup> по участку В1 (относительно SEQ ID № 12)	Процент избирательности ацилированным (FIOP) <sup>2</sup> для участка В1 (относительно SEQ ID № 12)
83		Y27T;L253V;	+	
84		Y27T;D74G;L253V;F254W;	++	+
85		Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;W370I;T384P;	++	+
86		Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I;D381K;T384P;	++	++
87		Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;	++	++
88		Y27T;D74G;L253V;N348R;K369C;W370I;D381F;T384P;	+	+
89		Y27T;L253V;F254W;N348R;	+	
90		Y27T;D74P;L253V;F254W;A255G;N348R;	+	+
91		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;W370I;	++	++
92		Y27T;L253V;F254W;A255G;	+	
93		Y27T;D74G;L253V;F254W;T384P;	++	+
94		Y27T;D74N;F254W;N348R;W370I;	+	+
95		Y27T;D74S;L253V;N348R;W370I;D381K;T384P;	++	+
96		Y27T;L253V;A255G;W370I;	+	+
97		Y27T;D74G;F254W;A255G;D381F;	+	+
98		Y27T;L253V;K369C;W370I;	+	
99		Y27T;L253V;F254W;N348R;D381F;	+	+
100		Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;	+	+
101		Y27T;D74S;L253V;A255G;T384P;	+	+
102		Y27T;D74N;L253V;N348R;W370I;D381W;T384P;	++	+
103		Y27T;D74P;L253V;N348R;	+	+
104		Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I;D381F;	+	+
105		Y27T;D74P;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I;	+	+

## 043748

106	65/6 6	Y27T;D74N;L253V;F254W;W370I;D381K;	++	++
107		Y27T;D74G;L253V;T384P;	+	+
108		Y27T;D74S;N348R;W370I;	+	+
109		Y27T;D74S;L253V;F254W;A255G;K369C;W370I;	+	+
110		Y27T;D74G;L253V;N348R;K369C;W370I;	+	
111		Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;	++	+
112		Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R;	+	+
113		Y27T;D74G;A255G;W370I;	+	+
114		Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;D381W;	+	+
115		Y27T;D74P;L253V;W370I;	++	+
116		Y27T;L253V;N348R;W370I;T384P;	+	
117		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;W370I;D381K;T384P;	++	+
118		Y27T;D74N;F254W;A255G;N348R;W370I;D381K;	+	+
119		Y27T;D74S;L253V;N348R;K369C;W370I;T384P;	+	+
120		Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I;D381F;	++	++
121		Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R;W370I;D381F;T384P;	+	+
122		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;D381K;	++	++
123		Y27T;D74S;F254W;K369L;W370I;	+	+
124		Y27T;L253V;F254W;D381F;T384P;	+	+
125		Y27T;D74G;L253V;F254W;A25	+	

## 043748

		5G;K369C;W370I;		
126		Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R;W370I;	++	+
127		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P;	++	++
128		L253V;N348R;W370I;	+	
129		Y27T;D74N;L253V;F254W;K369C;	+	+
130		Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R;	+	
131		Y27T;D74S;L253V;N348R;D381W;	+	+
132		Y27T;D74S;L253V;N348R;	+	+
133		Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R;	+	
134		Y27T;D74S;L253V;A255G;N348R;W370I;D381K;	++	++
135		Y27T;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I;	+	+
136		Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P;	++	+++
137		Y27T;D74S;F254W;A255G;W370I;	++	++
138		Y27T;F254W;A255G;K369C;W370I;D381F;T384P;	+	
139		Y27T;L253V;F254W;D381F;	++	+
140		Y27T;D74N;F254W;N348R;	+	
141	67/68	Y27T;F254W;A255G;W370I;	+	
142		Y27T;D74N;A107V;A255G;N348R;K369C;W370I;	+	
143		Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I;	+	
144		Y27T;D74N;F254W;	+	+
145		Y27T;D74G;L253V;D381F;T384P;	+	+

## 043748

		4P;		
146		Y27T;D74P;L253V;A255G;	+	+
147		Y27T;D74S;L253V;F254W;A255G;N348R;	+	+
148		Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I;	+	
149		Y27T;D74P;W370I;	+	
150		Y27T;L253V;F254W;T384P;	+	+
151		Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;W370I;	+++	+++
152		Y27T;D74G;L253V;N348R;W370I;	++	+
153		Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P;	+	
154		Y27T;D74G;L253V;F254W;N348R;	+	+
155		Y27T;L253V;A255G;W370I;D381F;T384P;	+	
156		Y27T;L253V;A255G;N348R;D381K;	+	+
157		Y27T;L253V;F254W;N348R;W370I;T384P;	+	+
158		Y27T;D74N;F254W;N348R;W370I;D381K;	+	+
159		Y27T;D74N;L253V;A255G;N348R;K369C;W370I;	+	+
160		Y27T;L253V;F254W;N348R;D381W;T384P;	+	+
161		Y27T;L253V;F254W;A255G;G260C;N348R;D381F;T384P;	+	+
162		Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R;D381F;T384P;	+	+
163		Y27T;D74G;L253V;N348R;K369C;W370I;D381F;	+	+
164		Y27T;D74N;L253V;N348R;	+	+

## 043748

165		Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;T384P;	+	+
166		Y27T;D74N;L253V;A255G;W370I;	++	++
167		Y27T;D74N;A255G;N348R;W370I;	+	+
168		Y27T;L253V;N348R;D381F;T384P;	+	
169		Y27T;L253V;D381F;T384P;	+	
170		Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R;W370I;D381W;T384P;	++	+
171		Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;T384P;	+	
172		Y27T;L253V;F254W;	+	+
173		Y27T;L253V;F254W;N348R;W370I;D381F;	++	++
174		Y27T;D74G;L253V;A255G;	+	+
175		Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I;	+++	+++
176		Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;K369C;W370I;D381K;	+	+
177		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;N348R;K369C;W370I;D381F;	+	+
178		Y27T;D74G;L253V;F254W;N348R;K369C;W370I;	+	+
179		Y27T;D74N;L253V;	+	+
180		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;N348R;	+	+
181		Y27T;F254W;A255G;T384P;	+	
182		Y27T;F254W;A255G;	++	+
183		Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R;D381F;T384P;	+	+
184		Y27T;F254W;A255G;N348R;	+	+
185		Y27T;D74N;F254W;T384P;	+	

186		Y27T;L253V;N348R;	+	+
187		Y27T;D74G;A255G;N348R;	+	
12		Y27T;F254W;A470V;	+	
13		Y27T;L253V;A255G;N348R;	+	
188		Y27T;D74N;L253V;K369C;D381K;T384P;	+	+
189		Y27T;D74G;L253V;A255G;N348R;D381F;	++	+
6		Y27T;A255G;W370I;	+	
190		Y27T;D74S;F254W;A255G;N348R;	+	
191	9/10	Y27T;D74S;L253V;F254W;N348R;D381W;T384P;	+++	++
192		Y27T;D74N;F254W;A255G;N348R;	+	
193		Y27T;D74P;L253V;F254W;A255G;	++	+
194		Y27T;L253V;N348R;W370I;D381F;T384P;	++	++
195		Y27T;D74S;A255G;W370I;	+	
196		N388E;	+	++
197		A255P;	+	

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 12 и определяли следующим образом: "+" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 5,0 раза увеличены; "++" > чем в 5,0 раза, но меньше чем в 10,0 раза; "+++" > чем в 10,0 раза.

<sup>2</sup> Уровни увеличенной избирательности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 12 и определяли следующим образом: "+" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 5,0 раза увеличены; "++" > чем в 5,0 раза, но меньше чем в 7,0 раза; "+++" > чем в 7,0 раза.

Пример 7. Усовершенствование ацилирования инсулина в положении B29 по сравнению с SEQ ID № 12

Ацилирование по B29 четырьмя вариантами, перечисленными в табл. 7.1, тестировали в масштабе встряхиваемой колбы. Порошки встряхиваемых колб получали, как описано в примере 4. Реакции осуществляли в 96-луночных планшетах с глубокими лунками, каждая содержит 200 мкл 0,2 М TRIS, pH 9,25, 20% ацетонитрила, 10 г/л инсулина, 17 г/л метилфенилацетата и 0,9 г/л лиофилизированного порошка фермента, восстановленного в 10 мМ TRIS, pH 7,5. НТР планшеты закупоривали теплом и инкубировали во встряхивателях Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 100 об./мин, в течение 5 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 мин и загружали в HPLC для анализа.

Процент превращения относительно SEQ ID № 12 (процент превращения FOP) вычисляли как процент превращения продукта, образуемого вариантом, относительно процента превращения, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 12. Результаты представлены в табл. 7.1. Процент превращения количественно определяли делением площади пика продукта на сумму площадей пиков субстрата, продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Процент избирательности относительно SEQ ID № 12 (процент избирательности FOP) вычисляли как процент избирательности продукта, образуемого вариантом, относительно процента избирательности, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 12. Процент избирательности вычисляли посредством деления площади пика продукта на сумму площадей пиков продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Таблица 7.1. Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участку В29, относительно SEQ ID № 12

№ варианта	SEQ ID № (н./а.к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 12)	Процент превращения ацилирован	Процент избирательности ацилировани
			ием (FIOP) <sup>1</sup> по участку В29 (относительно SEQ ID № 12)	я (FIOP) <sup>2</sup> для участка В29 (относительно SEQ ID № 12)
638	101/102	D623R;	+	+
68	21/22	D709R;	+	+++
639	105/106	D709K;	+	++
640	107/108	Y27T;V28A;G71H;D74G;K103E;W119Y;L253Y;F256R;N348H;T352K;A373R;S374T;S390K;G444N;A451K;N494D;Q547K;A616Y;S646D;	+	+++

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 12 и определяли следующим образом: "+" > чем в 10,0 раза, но меньше чем в 50,0 раза увеличены; "++" > чем в 50,0 раза, но меньше чем в 100,0 раза; "+++" > чем в 100,0 раза.

<sup>2</sup> Уровни увеличенной избирательности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 12 и определяли следующим образом: "+" > чем в 10,0 раза, но меньше чем в 50,0 раза увеличены; "++" > чем в 50,0 раза, но меньше чем в 100,0 раза; "+++" > чем в 100,0 раза.

Пример 8. Усовершенствование ацилирования инсулина в положении В29 по сравнению с SEQ ID № 108 в высокопропускном скрининге

SEQ ID № 108 выбирали в качестве следующего родительского фермента на основе результатов, описанных в примере 7. Библиотеки сконструированных генов получали с использованием луночных приемов (например, насыщающий мутагенез и рекомбинация предварительно идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в НТР, как описано в примере 2, а растворимые лизаты создавали, как описано в примере 3.

НТР реакции осуществляли в 96-луночных планшетах с глубокими лунками. Каждая реакционная лунка содержала 200 мкл 0,1 М TRIS, pH 9,25, 20% ацетонитрила, 25 г/л инсулина, 17 г/л метилфенил-ацетата и 10 мкл НТР супернатанта. НТР планшеты инкубировали во встряхивателях Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 100 об./мин, в течение 3 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем добавляли 400 мкл воды и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 мин и загружали в HPLC для анализа.

Процент превращения относительно SEQ ID № 108 (процент превращения FIOP) вычисляли как процент превращения продукта, образуемого вариантом, относительно процента превращения, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 108. Результаты представлены в табл. 8.1. Процент превращения количественно определяли делением площади пика продукта на сумму площадей пиков субстрата, продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Таблица 8.1. Активность вариантов, ацилирующих по участку B29, относительно SEQ ID № 108

№ варианта	SEQ ID № (н./а. к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 108)	Процент превращения ацилированием (FIOP) <sup>1</sup> по участку A1 (относительно SEQ ID № 108)
301	25/26	R256V;	++++
302	23/24	H71M;	++++
303	27/28	K390A;	++++
304	33/34	H71L;	++++
305	31/32	R256L;	+++
306	35/36	R256K;	+++
307	29/30	K390R;	+++
308		K390L;	+++
309		K390P;	++
310		K390C;	++
311		H71Q;	++
312		H71D;	++
313		K390H;	++
314		E707K;	++
315		D623W;	+
316		F50V;S619W;	+
317		D252C;	+
318		T705P;	+
319		K369S;	+
320		K369R;S619M;	+
321		N185D;G415H;N444L;K723D ;	+
322		N185D;N444L;K723D;R748G ;	+
323		N9D;G415H;N444L;N457Q;K 723D;R748E;	+
324		N185D;K723D;R748E;	+
325		K128H;K369R;	+
326		N9D;T443D;N444K;K723D;R 748G;A764E;	+
327		S619F;	+
328		N9D;N185D;G415H;K723D;R 748E;	+
329		S619M;	+
330		N185D;R256H;T560G;R748E ;	+
331		N9D;K723D;R748S;	+

## 043748

332		K436G;	+
333		N185D;N444K;N457Q;K668E ;K723D;R748G;	+
334		K128H;	+
335		K723D;	+
336		N185D;G415H;T443D;N444R ;K723D;R748S;	+
337		N444S;K723D;R748D;	+
338		N185D;T560G;K723D;	+
339		K128Q;	+
340		N185D;R748D;	+
341		N9D;N185D;	+
342		T129W;N185D;N444L;K723D ;R748E;	+
343		N185D;N444K;R748S;	+
344		N185D;G415H;N444S;R748E ;	+
345		A467V;	+
346		F620L;	+
347		N185D;T443D;N444S;K723D ;R748E;	+
348		N9D;G415H;T443D;N444L;K 723D;R748E;	+
349		Q626E;	+
350		K723D;R748E;	+
351		Q626M;	+
352		N9D;T443D;N444S;K723D;R 748E;	+
353		D709E;	+
354		K369W;	+
355		G415H;N444S;T560G;K723D ;R748S;	+
356		G415H;K723D;	+
357		T384E;	+
358		N185D;N444K;K723D;	+

359		N444L;K723D;	+
360		K369R;T384Y;S619M;	+
361		N9D;N185D;N444L;K723D;R748D;	+
362		N457Q;K723D;R748D;	+
363		K369R;H546P;	+
364		N9D;N185D;G415H;N444L;R748E;	+
365		K369Q;	+
366		D623H;	+
367		N9D;G415H;T443D;N444L;K723D;	+
368		F254W;	+
369		K369R;	+
370		N185D;G415H;T443D;N444S;N457Q;R748E;	+
371		N185D;G415H;N444S;K723D;R748S;	+
372		N9D;N185D;N444S;K723D;R748E;	+
373		N9D;N185D;T560G;K723D;R748E;	+
374		K723D;R748D;	+
375		T379N;	+
376		N185D;G415H;N444L;T560G;K723D;	+
377		N444K;K723D;R748E;	+
378		N185D;T443D;N457Q;T560G;R748S;	+
379		N185D;N457Q;R748S;	+
380		N9D;N185D;K723D;R748S;	+
381		N9D;G415H;T443D;N444L;R748S;	+
382		N9D;N185D;G415H;T443D;	+

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 108 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 2,0 раза увеличены; "++" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 4,0 раза; "+++" > чем в 4,0 раза, но меньше чем в 8,0 раза; "++++" > чем в 8,0 раза.

Пример 9. Усовершенствование ацилирования инсулина в положении B29 по сравнению с SEQ ID № 24 в высокопропускном скрининге

SEQ ID № 24 выбирали в качестве следующего родительского фермента на основе результатов, описанных в примере 8. Библиотеки сконструированных генов получали с использованием луночных приемов (например, насыщающий мутагенез и рекомбинация предварительно идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в НТР, как описано в примере 2, а растворимые лизаты создавали, как описано в примере 3.

НТР реакции осуществляли в 96-луночных планшетах с глубокими лунками. Каждая реакционная лунка содержала 200 мкл 0,2 М TRIS, 20% ацетонитрила, 25 г/л инсулина, 17 г/л метилфенилацетата и 10 мкл НТР супернатанта (начальный рН перед добавлением лизата составлял 9,4). НТР планшеты инкубировали во встряхивателях Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 100 об./мин, в течение 3 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем добавляли 400 мкл воды и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 минут и загружали в HPLC для анализа.

Процент превращения относительно SEQ ID № 24 (процент превращения FIOP) вычисляли как процент превращения продукта, образуемого вариантом, относительно процента превращения, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 24. Результаты представлены в табл. 9.1. Процент превращения количественно определяли делением площади пика продукта на сумму площадей пиков субстрата, продукта и

примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Таблица 9.1. Активность вариантов, ацилирующих по участку B29, относительно SEQ ID № 24

№ варианта	SEQ ID № (н./а.к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 24)	Процент превращения ацилированием (FIOP) <sup>1</sup> по участку A1 (относительно SEQ ID № 24)
383	71/72	S67A;M71Q;N185D;R256L;T443D;Q626M;	+++
384		S67A;N185D;K390A;N444S;	+++
385	81/82	S67A;M71Q;R256L;T443D;S619W;	+++
386		S67A;N185D;K390A;T443D;Q626E;	+++
387	83/84	S67A;M71Q;N185D;R256L;S619W;	+++
388	75/76	S67A;M71Q;N185D;R256L;T443D;E707K;K723D;	+++
389	73/74	S67A;M71Q;R256L;K436G;T443D;S619W;Q626M;	+++
390	79/80	S67A;K390A;K436G;T443D;S619W;Q626E;	+++
391	77/78	M71Q;N185D;R256L;T443D;	+++
392		S67A;M71Q;N185D;R256L;	+++
393		S67A;M71F;K390A;S619W;	++
394		S67A;K390A;N444S;S619F;	++
395		S67A;K390A;	++
396		M71Q;N185D;R256L;T443D;Q626E;K723D;	++
397		S67A;M71F;N185D;K390A;S619W;	++
398		N185D;K390A;T443D;	++
399		S67A;M71Q;N185D;R256K;	++
400		M71Q;R256L;T443D;	++

## 043748

401		M71Q;N185D;R256L;T443D;Q626M; E707K;	++
402		S67A;M71F;K390A;T443D;S619F;Q 626M;	++
403		S67A;M71Q;N185D;R256L;Q626M;K 723D;	++
404		S67A;K390A;T443D;S619W;Q626E;	++
405		M71Q;N185D;R256L;T443D;Q626E; E707K;	++
406		M71L;V184Q;D252C;K369S;K390P; G415H;R748E;	++
407		S67A;K390A;S619W;	++
408		M71F;K390A;S619W;	++
409		M71Q;R256L;K436G;E707K;	++
410		S67A;K390A;K723D;	++
411		S67A;M71Q;N185D;R256K;T384E;N 444S;S619W;	++
412		M71Q;N185D;R256K;S619F;	++
413		S67A;M71Q;R256L;K436G;Q626M;	++
414		K390A;	++
415		N185D;K390A;K436G;Q626M;	++
416		K390A;N444S;K723D;	++
417		N185D;K390A;S619F;	++
418		K369S;G415H;F620L;T705P;	++
419		N185D;K390A;Q626M;	++
420		M71Q;R256L;T443D;S619W;Q626E;	++
421		M71Q;R256L;S619W;E707K;	++
422		V184Q;D252C;K369S;K390P;R748E ;	++
423		M71Q;N185D;R256L;T384E;	++
424		M71L;F254W;A638Q;D709E;R748S;	++
425		S67A;M71L;D252C;K369S;K390P;	++
426		K390A;T443D;S619W;	++
427		M71Q;R256K;T443D;Q626M;	++
428		K390A;N444S;S619W;	++

## 043748

429		S67A;M71Q;N185D;K390A;N444S;S619W;	++
430		N185D;K390A;S619W;	++
431		S67A;M71Q;N185D;K390A;S619W;E707K;	++
432		N185D;K390A;Q626M;K723D;	++
433		K128Q;K369S;T705P;R748E;	++
434		M71Q;R256L;Q626M;E707K;	++
435		K390A;K436G;S619W;K723D;	++
436		K390A;K723D;	++
437		K128Q;D252C;K369S;K390P;	++
438		M71Q;N185D;R256L;T384E;S619W;	++
439		M71Q;N185D;R256K;K390A;K436G;E707K;	++
440		S67A;M71F;N185D;N444S;S619W;K723D;	++
441		N185D;K436G;T443D;S619W;Q626M;E707K;K723D;	++
442		M71Q;R256K;	++
443		M71Q;R256L;K390L;T443D;	++
444		S67A;M71F;K390L;T443D;Q626M;	+
445		M71Q;R256L;K390L;T443D;Q626M;	+
446		M71Q;N185D;K390A;T443D;S619W;Q626E;	+
447		K128Q;K369S;G415H;	+
448		K128H;F620L;T705P;R748E;	+
449		M71L;T379N;D709E;R748G;	+
450		T384E;P418G;N444S;A638Q;D709E;R748S;	+
451		M71Q;N185D;K390A;N444S;	+
452		M71F;N185D;K390L;N444S;S619W;K723D;	+
453		M71L;D709E;	+
454		N185D;R256K;S619W;E707K;	+
455		K369S;K390P;F620L;	+

456		M71Q;R256L;Q626E;E707K;	+
457		S67A;M71F;N185D;N444S;S619W;	+
458		K128Q;V184Q;D252C;K369S;G415H ;	+
459		F254W;T384E;A638Q;D709E;R748S ;	+
460		S67A;M71Q;Q134H;R256L;K390L;T 443D;Q626M;E707K;	+
461		K128Q;T705P;	+
462		M71Q;N185D;R256L;K390L;	+
463		S67A;T443D;S619R;	+
464		M71Q;R256K;K390A;E707K;	+
465		S67A;M71Q;T384E;K390A;N444S;S 619W;	+
466		M71L;F254W;N309T;N444S;	+
467		M71L;P418G;R748S;	+
468		M71Q;N185D;R256L;K390L;Q626M;	+
469		M71L;	+
470		S67A;M71Q;N185D;R256K;K390L;S 619W;	+
471		S67A;M71F;N185D;K390L;S619W;	+
472		M71Q;N185D;K390A;K436G;T443D; Q626M;	+
473		G415H;F620L;	+
474		M71L;V184Q;K369S;G415H;T705P;	+

Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 24 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 2,0 раза увеличены; "++" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 4,0 раза; "+++" > чем в 4,0 раза.

Пример 10. Эффект добавления гистидиновой метки в SEQ ID № 82

Ацилирование по B29 для SEQ ID № 82, как описано в примере 9, и SEQ ID № 110, которая содержит метку из шести гистидинов на С-конце, сравнивали в масштабе встряхиваемой колбы. Порошки встряхиваемых колб получали, как описано в примере 4. Реакции осуществляли в 96-луночных планшетах с глубокими лунками, каждая содержала 200 мкл, состоящих из 0,2 М TRIS, pH 9,25, 20% ацетонитрила, 25 г/л инсулина, 17 г/л метилфенилацетата и 0,3-10 г/л лиофилизированного порошка фермента, восстановленного в 10 мМ TRIS, pH 7,5. НТР планшеты закупоривали теплом и инкубировали во встряхивателях Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 100 об./мин, в течение 3 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем добавляли 400 мкл воды и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 мин и загружали в HPLC для анализа. На фиг. 2 приведен график, показывающий результаты. Как показано, добавление гистидиновой метки оказывало минимальный эффект на фермент относительно версии без гистидиновой метки.

Пример 11. Усовершенствование ацилирования инсулина в положении B29 по сравнению с SEQ ID № 110 в высокопропускном скрининге

SEQ ID № 110 выбирали в качестве родительского фермента после того, как было показано, что гистидиновая метка оказывает минимальное влияние на активность SEQ ID № 82. Библиотеки сконструированных генов получали с использованием луночных приемов (например, насыщающий мутагенез и рекомбинация предварительно идентифицированных полезных мутаций).

Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в НТР, как описано в примере 2, а растворимые лизаты создавали, как описано в примере 3, но с использованием 400 мкл лизирующего буфера вместо 200 мкл.

НТР реакции осуществляли в 96-луночных планшетах с глубокими лунками. Каждая реакционная лунка содержала 200 мкл 0,2 М TRIS, 20% ацетонитрила, 25 г/л инсулина, 17 г/л метилфенилацетата и 10 мкл НТР супернатанта (начальный pH перед добавлением лизата составлял 9,4). НТР планшеты инкубировали во встряхивателях Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 100 об./мин, в течение 2 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в течение 5 мин с

использованием настольного встряхивателя. Затем добавляли 400 мкл воды и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 мин и загружали в HPLC для анализа.

Процент превращения относительно SEQ ID № 110 (процент превращения FIOR) вычисляли как процент превращения продукта, образуемого вариантом, относительно процента превращения, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 110. Результаты представлены в табл. 9.1. Процент превращения количественно определяли делением площади пика продукта на сумму площадей пиков субстрата, продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Таблица 11.1. Активность вариантов, ацилирующих по участку B29, относительно SEQ ID № 110

№ варианта	SEQ ID № (н./а. к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 110)	Процент превращения ацилированием (FIOR) <sup>1</sup> по участку A1 (относительно SEQ ID № 110)
475		E482Q;	++
476		E482M;	++
477		E482Y;	++
478	37/38	E482I;	++
479		E482T;	++
480		G54A;	+
481	39/40	S386G;	+
482		D484T;	+
483		E482L;	+
484		T32V;	+
485		N444S;D709E;R748S;	+

486		G54S;	+
487		G415H;D709E;	+
488		Q556G;	+
489		Y616D;	+
490		K128Q;D252C;G415H;N444S ;D709E;R748S;	+
491		N185D;D709E;	+
492		Y616N;	+
493		Y616G;	+
494		L557F;	+
495		S704T;	+
496		Y616A;	+
497	47/48	L557S;	+
498	43/44	P496A;	+
499		P496T;	+
500	45/46	L557Q;	+
501		L557R;	+
502		S639G;	+
503	49/50	S704A;	+
504		Q233A;	+
505		D334P;	+
506		Q233D;	+
507		P496R;	+
508		S639A;	+
509		T131D;	+
510		T131E;	+
511		Q112D;	+
512		S639E;	+
513		L557V;	+
514		S639D;	+
515		P496N;	+
516		S740A;	+
517		L225T;	+
518		T131N;	+
519		L557M;	+
520		D484L;	+

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 110 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,0 раза, но меньше чем в 2,0 раза увеличены; "++" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 4,0 раза; "+++" > чем в 4,0 раза, но меньше чем в 8,0 раза; "++++" > чем в 8,0 раза.

Пример 12. Усовершенствование ацилирования инсулина в положении В29 по сравнению с SEQ ID № 40 в высокопропускном скрининге

SEQ ID № 40 выбирали в качестве следующего родительского фермента на основе результатов, описанных в примере 11. Библиотеки сконструированных генов получали с использованием луночных приемов (например, насыщающий мутагенез и рекомбинация предварительно идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в НТР, как описано в примере 2, а растворимые лизаты создавали, как описано в примере 3, но с использованием 400 мкл лизирующего буфера, вместо 200 мкл.

НТР реакции осуществляли в 96-луночных планшетах с глубокими лунками. Каждая реакционная лунка содержала 200 мкл 0,2 М TRIS, 20% ацетонитрила, 25 г/л инсулина, 17 г/л метилфенилацетата и 80 мкл НТР супернатанта (начальный pH перед добавлением лизата составлял 9,4). НТР планшеты инкубировали во встряхивателях Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 100 об./мин, в течение 2 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в течение 5 мин с

использованием настольного встряхивателя. Затем добавляли 400 мкл воды и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 мин и загружали в HPLC для анализа.

Процент превращения относительно SEQ ID № 40 (процент превращения (FIOP)) вычисляли как процент превращения продукта, образуемого вариантом, относительно процента превращения, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 40. Результаты представлены в табл. 12.1. Процент превращения количественно определяли делением площади пика продукта на сумму площадей пиков субстрата, продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Процент избирательности относительно SEQ ID № 40 (процент избирательности FIOP) вычисляли как процент избирательности продукта, образуемого вариантом, относительно процента избирательности, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 40. Процент избирательности вычисляли посредством деления площади пика продукта на сумму площадей пиков продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Таблица 12.1. Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участку B29, относительно SEQ ID № 40

№ варианта	SEQ ID № (н./а.к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 40)	Процент превращения ацилированием (FIOP) <sup>1</sup> по участку B29 (относительно SEQ ID № 40)	Процент избирательности ацилирования (FIOP) <sup>2</sup> для участка B29 (относительно SEQ ID № 40)
524	53/54	W370K;	+	+
525	57/58	D623V;	+	+
526	51/52	A28V; Y52L; L55I; T131E; L175H; Q233R; G415H; N444G; P513S;	+	+
527	55/56	D623L;	+	+
528	59/60	P366G;	+	+
529		A28V; G74D; T374S; S704A;	+	+
530		A28V; L175H; P513S; W619S;	+	+
531		P366S;	+	+
532		L175H; G415H; K723D;	+	+
533		H472A;	+	+
534		H348N; N444G; S704A;	+	+
535		T374S; Y616A; S704A;	+	+
536		T27Y; A28V; G74D; N185D; T374S; N444G; S704A;	+	+
537		A28R;	+	+
538		N185D; T374S;	+	+
539		Y52L; L55I; Q112D; T374S; N444G;		+
540		H348N;		+
541		Q380F;		+
542		S150A;		+
543		A362R;		+
544		T374S; G415H; K547Q;		+

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 40 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,0 раза, но меньше чем в 2,0 раза увеличен; "++" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 4,0 раза; "+++" > чем в 4,0 раза, но меньше чем в 8,0 раза; "++++" > чем в 8,0 раза.

<sup>2</sup> Уровни увеличенной избирательности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 40 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,0 раза, но меньше чем в 2,0 раза увеличе-

ны; "++" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 4,0 раза; "+++" > чем в 4,0 раза, но меньше чем в 8,0 раза; "++++" > чем в 8,0 раза.

Пример 13. Усовершенствование ацилирования инсулина в положении B29 по сравнению с SEQ ID № 56 в высокопропускном скрининге

SEQ ID № 56 выбирали в качестве следующего родительского фермента на основе результатов, описанных в примере 12. Библиотеки сконструированных генов получали с использованием луночных приемов (например, насыщающий мутагенез и рекомбинация предварительно идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в НТР, как описано в примере 2, а растворимые лизаты создавали, как описано в примере 3, но с использованием 400 мкл лизирующего буфера, вместо 200 мкл.

НТР реакции осуществляли в 96-луночных планшетах с глубокими лунками. Каждая реакционная лунка содержала 200 мкл 0,2 М TRIS, 10% ацетонитрила, 50 г/л инсулина, 17 г/л метилфенилацетата и 10 мкл НТР супернатанта (начальный pH перед добавлением лизата составлял 9,4). НТР планшеты инкубировали во встряхивателях Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 100 об./мин, в течение 3 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем добавляли 400 мкл воды и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 мин и разводили еще 2 раза в воде перед загрузкой в HPLC для анализа.

Процент превращения относительно SEQ ID № 56 (процент превращения FIOP) вычисляли как процент превращения продукта, образуемого вариантом, относительно процента превращения, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 56, и представлен далее в таблице. Процент превращения количественно определяли делением площади пика продукта на сумму площадей пиков субстрата, продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Процент избирательности относительно SEQ ID № 56 (процент избирательности FIOP) вычисляли как процент избирательности продукта, образуемого вариантом, относительно процента избирательности, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 56. Результаты представлены в табл. 13.1. Процент избирательности вычисляли посредством деления площади пика продукта на сумму площадей пиков продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Таблица 13.1. Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участку В29, относительно SEQ ID № 56

№ варианта	SEQ ID № (н./а.к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 56)	Процент превращения ацилированием (FIOP) <sup>1</sup> по участку В29 (относительно SEQ ID № 56)	Процент избирательности ацилирования (FIOP) <sup>2</sup> для участка В29 (относительно SEQ ID № 56)
561		Q112D;W619S;	+	
562	87/88	P366S;D484T;W619S;I708V;	+	
563		P366Q;D484T;K547H;W619S;	+	
564		W619S;	+	
565		P366G;D484T;W619S;F620L;	+	
566	95/96	K390Q;	+	
567		K390A;	+	
568		K390S;	+	
569		W619S;S740A;	+	
570		E103K;Q112D;A361G;P366G;D484T;W619S;	+	
571		Q157S;K723D;	+	
572		E103K;W619S;	+	
573		A361G;P366Q;D484T;W619S;F620L;	+	
574		Q157S;K436G;L623V;K723D;	+	
575		P366G;W619S;S740A;	+	
576		D484T;K547H;W619S;F620L;S740A;	+	
577		D484T;I708V;	+	
578		P366Q;Q556H;W619S;S740A;	+	
579		P366S;D484T;W619S;F620L;I70	+	

		8V;		
580		E103K;Q112L;P366Q;D484T;W619S;I708V;S740A;	+	
581		D130E;Q157S;L623T;Q626M;	+	
582		T131E;S704A;K723D;	+	
583		D130E;R317A;L623T;K723D;	+	
584		E561P;	+	
585		W370K;D484T;W619S;	+	
586		K436G;L623T;	+	
587		P366S;D484T;S740A;	+	
588		T131D;L557V;S639T;K723D;	+	
589		K369D;	+	
590		R317A;L623T;Q626M;K723D;	+	
591		D130E;Q157S;K436G;K723D;	+	
592		Y616T;	+	
593		K128D;D130E;Q157S;K436G;L623T;Q626M;K723D;	+	
594		L557P;	+	
595	91/92	A255G;	+	
596		P366S;D484T;	+	
597		Q112L;P366G;D484T;K547H;W619S;I708V;	+	
598		T131D;T491S;L557V;D709E;K723D;	+	
599		Q71G;	+	
600		D484T;I708V;S740A;	+	
601		S675E;	+	
602		P366S;W370K;D484T;Q556H;W619S;	+	
603		D130E;L623T;	+	
604		A255D;	+	
605		T131D;L557V;	+	
606		L225T;L557V;S704A;D709E;K723D;	+	
607		E103K;W370K;D484T;W619S;I708V;	+	
608		D484T;	+	
609		Q112D;P366S;D484T;	+	
610		Q112L;D484T;I708V;		
611	97/98	F57H;		+
612	99/100	F57C;		+
614	89/90	A67S;		+

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 56 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 2,0 раза увеличены; "++" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 4,0 раза; "+++" > чем в 4,0 раза, но меньше чем в 8,0 раза; "++++" > чем в 8,0 раза.

<sup>2</sup> Уровни увеличенной избирательности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 56 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 2,0 раза увеличены; "++" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 4,0 раза; "+++" > чем в 4,0 раза, но меньше чем в 8,0 раза; "++++" > чем в 8,0 раза.

Пример 14. Усовершенствование ацилирования инсулина в положении A1 по сравнению с SEQ ID № 70 в высокопропускном скрининге

SEQ ID № 70 выбирали в качестве дополнительного родительского фермента на основе результатов, описанных в примере 7. Библиотеки сконструированных генов получали с использованием луночных приемов (например, насыщающий мутагенез и рекомбинация предварительно идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в НТР, как описано в примере 2, а растворимые лизаты создавали, как описано в примере 3, но используя 400 мкл лизирующего буфера вместо 200 мкл.

НТР реакции осуществляли в 96-луночных планшетах с глубокими лунками, содержащими 200 мкл 0,1 М Tris-HCl, pH 9,25, 20% ацетонитрила, 20 г/л инсулина, 17 г/л метилфенилацетата и 10 мкл НТР лизата. НТР планшеты инкубировали во встряхивателях Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 100 об./мин, в течение 5 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 мин, разводили 2 раза в воде и загружали в HPLC для анализа.

Процент превращения относительно SEQ ID № 70 (процент превращения FIOF) вычисляли как процент превращения продукта, образуемого вариантом, относительно процента превращения, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 70. Результаты представлены в табл. 14.1. Процент превращения количественно определяли делением площади пика продукта на сумму площадей пиков субстрата, продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Таблица 14.1. Активность вариантов, ацилирующих по участку A1, относительно SEQ ID № 70

№ варианта	SEQ ID № (н./а.к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 70)	Процент превращения ацилированием (FIOF) <sup>1</sup> по участку A1 (относительно SEQ ID № 70)
642	121/122	R317S; Q380P; G415H; T443D; A517K; T560G; F701W;	+++
643	119/120	A255P; Q380P; G444K; N457T; A517K; T560G;	+++
644	123/124	A255P; R317S; Q380P; G415H; T443D; G444S; A517K; T560G; F701W;	+++
645	113/114	A255P; R317S; Q380P; G415H; T443D; G444S; F454W; N457T; A517K; T560G; F701W;	+++
646	115/116	L55I; A255P; R317S; Q380P; T443D; G444S; F454W; H472P; A517K; T560G;	+++

## 043748

		OG;F701W;	
647	111/1 12	A255P;R317S;Q380P;G415H;G444 S;N457T;A517K;T560G;F701W;	+++
648	117/1 18	A255P;R317S;Q380P;G415H;T443 D;F454W;N457T;A517K;T560G;F7 01W;	+++
649		A255P;R317S;Q380P;T443D;G444 S;F454W;A517K;T560G;F701W;	++
650		A255P;R317S;Q380P;T443D;G444 S;N457T;T560G;F701W;	++
651		A255P;R317S;Q380P;G444K;F454 W;A517K;T560G;	++
652		L253S;	++
653		A255P;R317S;G415H;T443D;G444 S;F454W;N457T;A517K;F701W;	++
654		A255P;R317S;Q380P;G415H;T443 D;F454W;N457T;A517K;F701W;	++
655		A255P;R317S;Q380P;G444K;A517 K;T560G;F701W;	++
656		R317S;Q380P;T443D;G444K;F454 W;A517K;T560G;F701W;	++
657		Q556G;	++
658		A255P;R317S;A373K;G415H;T443 D;F454W;N457T;A517K;T560G;F7 01W;	++
659		N185E;	++
660		W370L;	++
661		A255P;R317S;Q380P;G444S;N457 T;A517K;T560G;F701W;	++
662		A255P;R317S;A373K;G415H;G444 K;N457T;A517K;T560G;F701W;	++
663		A255P;R317S;Q380P;G444K;F454 W;N457T;A517K;T560G;F701W;	++
664		N348D;	+
665		N348H;	+

666		A255P;R317S;A373K;G415H;G444S;F454W;N457T;A517K;T560G;F701W;	+
667		A255P;A373K;G415H;G444S;N457T;A517K;T560G;F701W;	+
668		L557P;	+
669		A362V;	+
670		A255P;R317S;Q380P;T443D;F454W;T560G;F701W;	+
671		E707A;	+
672		A255P;R317S;Q380P;G444S;A517K;T560G;F701W;	+
673		A255P;R317S;Q380P;G444K;N457T;A517K;T560G;F701W;	+
674		T560G;	+
675		A255P;R317S;G415H;G444S;F454W;A517K;T560G;F701W;	+
676		R317S;A373K;G415H;T443D;F454W;A517K;T560G;F701W;	+
677		A255P;R317S;K369T;G415H;T443D;N457T;A517K;F701W;	+
678		A255P;R317S;A373K;G415H;G444K;N457T;A517K;S530D;F701W;	+
679		L557G;	+
680		A255P;R317S;G415H;F454W;N457T;A517K;T560G;F701W;	+
681		A255P;R317S;A373K;G415H;G444K;F454W;A517K;T560G;F701W;	+
682		A255P;R317S;Q380P;G444Q;F454W;A517K;T560G;F701W;	+
683		L253R;	+
684		A255P;R317S;Q380P;G444S;F454W;A517K;S530D;T560G;F701W;	+
685		R317S;A373K;G415H;G444K;F454W;A517K;T560G;F701W;	+
686		A255P;	+
687		L557S;	+
688		A255P;R317S;Q380P;G444K;F454W;N457T;A517K;F701W;	+
689		S386G;	+
690		L557E;	+
691		F254G;	+
692		A451K;	+
693		A255P;R317S;Q380P;G444S;F454W;A517K;T560G;F701W;	+
694		A255P;R317S;Q380P;G444K;F454W;T560G;F701W;	+
695		F756P;	+
696		R317S;Q380P;T443D;N457T;A517K;F701W;	+

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 70 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 1,5 раза увеличены; "++" > чем в 1,5 раза, но меньше чем в 2,0 раза; "+++" > чем в 2,0 раза.

Пример 15. Усовершенствование ацилирования инсулина в положении A1 по сравнению с SEQ ID № 116 в высокопропускном скрининге

SEQ ID № 116 выбирали в качестве следующего родительского фермента на основе результатов, описанных в примере 14. Библиотеки сконструированных генов получали с использованием луночных приемов (например, насыщающий мутагенез и рекомбинация предварительно идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в НТР, как описано в примере 2, а растворимые лизаты создавали, как описано в примере 3, но используя 400 мкл лизирующего буфера вместо 200 мкл.

НТР реакции осуществляли в 96-луночных планшетах с глубокими лунками, содержащим 200 мкл 0,25 М Tris-HCl, pH 9,25, 20% ацетонитрила, 50 г/л инсулина, 17 г/л метилфенилацетата и 10 мкл НТР лизата. НТР планшеты инкубировали во встряхивателях Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 100 об./мин в течение 4 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 мин, разводили 24× в воде и загружали в HPLC для анализа.

Процент превращения относительно SEQ ID № 116 (процент превращения FIOP) вычисляли как процент превращения продукта, образуемого вариантом, относительно процента превращения, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 116. Результаты представлены в табл. 15.1. Процент превращения количественно определяли делением площади пика продукта на сумму площадей пиков субстрата, продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Таблица 15.1. Активность вариантов, ацилирующих по участку A1, относительно SEQ ID № 116

№ вариант	SEQ ID № (н./а.к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 116)	Процент превращения ацилированием (FIOP) <sup>1</sup> по участку A1 (относительно SEQ ID № 116)
697	125/126	L253S;N348D;G415H;N457T;Q556G;L557P;	++++
698	131/132	N185E;L253S;N348H;G415H;N457T;Q556G;L557G;K723E;	++++
699		L253S;S317R;N348H;A362V;G415H;N457T;Q556G;L557G;K723E;	++++
700	133/13	N185E;L253S;S317R;N348D;A362V;	++++

## 043748

	4		
701		N185E;L253S;S317R;N348H;A362V;Q556G ;L557G;	++++
702		L253S;N348D;W370L;N457T;Q556G;L557G ;	++++
703		N185D;L253S;S317R;N348H;A362V;G415H ;N457T;	++++
704		N185E;L253S;S317R;G415H;N457T;L557P ;K723E;	++++
705	129/13 0	N185D;L253S;N348H;A362V;	++++
706		L253S;S317R;N348D;A362V;G415H;N457T ;	++++
707		L253S;N348D;A362V;L557G;K723E;	++++
708		L253S;N348D;A362V;N457T;L557G;K723E ;	++++
709		L253S;A362V;N457T;L557G;	++++
710		L253S;N348D;A362V;G415H;L557G;	++++
711		L253S;S317R;A362V;G415H;L557G;	++++
712		L253S;S317R;N348H;A362V;W370L;Q556G ;L557P;	++++
713		L253S;S317R;N348D;A362V;G415H;Q556G ;L557G;K723E;	++++
714		L253S;N348D;L557P;	++++
715		L253S;N348D;A362V;W370L;N457T;Q556G ;L557G;K723E;	++++
716		N185D;L253S;N348H;G415H;L557G;	++++
717		N185E;L253S;N348H;A362V;K723E;	++++
718		N185D;L253Q;G415H;N457T;L557G;	++++
719		L253S;S317R;N348D;W370L;N457T;K723E ;	++++
720		L253S;S317R;N348D;G415H;L557G;	++++
721		N185D;L253S;S317R;W370L;G415H;Q556G ;L557G;	++++
722		N185E;L253S;S317R;N348H;A362V;L557G	++++

## 043748

		;K723E;	
723		N185D;L253S;S317R;N348H;L557G;R602C ;	++++
724		N185E;L253S;N348D;A362V;N457T;Q556G ;L557P;	++++
725		N185D;L253S;S317R;A362V;	++++
726		L253S;S317R;N348D;A362V;N457T;Q556G ;L557G;K723E;	++++
727		N185D;L253S;N348H;A362V;G415H;	++++
728		N185E;L253S;N348H;A362V;W370L;G415H ;Q556G;L557G;	++++
729		L253S;S317R;N348D;A362V;Q556G;L557P ;	++++
730		L253S;S317R;A362V;N457T;Q556G;L557G ;K723E;	++++
731		N185E;L253S;S317R;N348D;A362V;G415H ;L557G;K723E;	++++
732		L253S;S317R;N348D;L557P;	++++
733		N185E;L253S;S317R;N348H;A362V;G415H ;N457T;K723E;	++++
734	137/138	N185D;L253S;S317R;N348H;A362V;G415H ;	++++
735		N185D;L253S;A362V;L557G;	++++
736		N185D;L253Q;S317R;N348D;A362V;G415H ;N457T;K723E;	+++
737		N185E;L253S;S317R;A362V;W370L;L557G ;K723E;	+++
738		N185E;L253S;G415H;L557G;	+++
739		L253Q;N348D;N457T;Q556G;L557P;	+++
740		N185E;L253S;N348H;A362V;N457T;L557G ;	+++
741		N185D;L253S;S317R;A362V;G415H;N457T ;	+++
742		N185D;L253Q;S317R;N348D;W370L;N457T ;	+++

043748

743		N185D;L253Q;S317R;A362V;G415H;K723E ;	+++
744		N185D;L253S;S317R;G415H;L557G;	+++
745		L253S;N348D;A362V;Q556G;L557G;	+++
746		L253S;S317R;A362V;	+++
747		L253S;S317R;G415H;N457T;	+++
748		L253S;S317R;N348D;A362V;N457T;Q556G ;	+++
749		N185E;L253S;N348H;A362V;L557G;	+++
750		L253S;N348H;A362V;K723E;	+++
751		L253Q;N348D;A362V;N457T;L557P;	+++
752		L253S;S317R;N348D;A362V;	+++
753		N185E;L253S;N457T;L557P;	+++
754		N185E;L253Q;N348D;Q556G;L557G;	+++
755		L253S;N348D;A362V;W370L;L557P;K723E ;	+++
756		L253Q;S317R;N348D;L557G;	+++
757		L253Q;A362V;W370L;N457T;Q556G;L557G ;	+++
758		L253S;N348D;L557G;K723E;	+++
759		L253S;N348D;L557G;	+++
760		N185E;L253S;L557G;K723E;	+++
761		N185D;L253Q;S317R;Q556G;L557G;	+++
762		L253Q;S317R;A362V;N457T;Q556G;L557P ;	+++
763		L253S;A362V;L557G;	+++
764		N185D;L253S;N348D;A362V;G415H;Q556G ;K723E;	+++
765		L253S;S317R;N348H;N457T;Q556G;K723E ;	+++
766		L253S;S317R;A362V;L557G;K723E;	+++
767		N185D;L253S;N457T;L557G;	+++
768	127/12 8	L253S;N348H;G415H;	+++
769		N185E;S317R;N348H;A362V;N457T;L557G	+++

## 043748

		;	
770		N185E;L253Q;N348H;A362V;N457T;	+++
771		L253S;S317R;N348D;K723E;	+++
772		L253S;A362V;G415H;	+++
773		N348D;A362V;N457T;Q556G;L557G;K723E	+++
		;	
774		N185E;L253S;S317R;N348H;A362V;K723E	+++
		;	
775		N185E;L253S;A362V;Q556G;K723E;	+++
776		L253S;S317R;A362V;Q556G;L557G;	+++
777		L253Q;N348D;A362V;Q556G;L557G;	+++
778		N185E;S317R;N348D;A362V;Q556G;L557P	+++
		;	
779		N185E;L253S;S317R;N457T;	+++
780		N185E;L253S;S317R;N348H;G415H;L557G	+++
		;K723E;	
781		T105N;N185D;L253Q;S317R;N348D;L557G	+++
		;	
782		N185D;S317R;N348D;A362V;N457T;	+++
783		L253S;G415H;L557G;	+++
784		N185E;N348D;A362V;G415H;K723E;	+++
785		N185D;L253Q;N348D;G415H;N457T;L557G	+++
		;K723E;	
786		N185E;L253Q;W370L;G415H;Q556G;L557G	+++
		;	
787		N185D;A362V;G415H;Q556G;L557G;K723E	+++
		;	
788		N185D;L253Q;S317R;N348D;N457T;	+++
789		L253Q;N348D;A362V;L557G;	+++
790		N185D;L253S;N348D;N457T;Q556G;L557G	+++
		;K723E;	
791		N185E;S317R;N348H;N457T;Q556G;L557G	+++
		;	
792		L253S;N348D;A362V;G415H;Q556G;L557P	+++
		;	

## 043748

793		N348D;A362V;G415H;L557G;	+++
794		N185D;L253S;A362V;	+++
795		N185D;A362V;W370L;Q556G;L557G;W701F; ;K723E;	+++
796		L253S;G415H;N457T;L557G;	+++
797		N185E;S317R;G415H;N457T;L557G;	+++
798		L253Q;S317R;N348D;A362V;G415H;	+++
799		N185E;L253S;A362V;	+++
800		L253S;L557P;	+++
801		L253Q;S317R;N348H;A362V;G415H;L557G ;	+++
802		N185E;L253Q;S317R;N348D;	+++
803		L253S;S317R;N348H;W370L;G415D;N457T ;K723E;	+++
804		L253Q;S317R;N348D;A362V;N457T;Q556G ;K723E;	+++
805		N185D;S317R;N348D;G415H;L557G;	+++
806		L253Q;S317R;N348D;N457T;Q556G;L557G ;K723E;	+++
807		N185D;L253S;N348H;	+++
808		N185E;S317R;N348H;W701F;K723E;	+++
809		N185E;N348D;A362V;W370L;G415H;K723E ;	+++
810		S317R;A362V;N457T;L557G;K723E;	+++
811		N185D;N348H;A362V;Q556G;L557G;K723E ;	+++
812		L253S;S317R;A362V;K723E;	+++
813		N185E;N348D;N457T;Q556G;K723E;	+++
814		L253S;N348H;A362V;	+++
815		L253S;N348D;	+++
816		S317R;N348D;A362V;G415H;	+++
817		L253Q;N348D;A362V;L557G;K723E;	+++
818		L253Q;N348D;G415H;L557G;K723E;	+++
819		L253Q;N348D;A362V;G415H;L557P;	+++
820	135/13	L253S;S317R;N348D;	+++

	6		
821		N185D;L253Q;S317R;N348D;L557G;K723E ;	+++
822		L253S;S317R;L557G;K723E;	+++
823		N185E;S317R;N348D;A362V;G415H;L557P ;	+++
824		L253S;Q556G;L557G;K723E;	+++
825		N185E;L253S;S317R;	+++
826		N185E;L253Q;S317R;N348D;A362V;K723E ;	+++
827		L253Q;S317R;N348D;A362V;Q556G;K723E ;	+++
828		N185E;L253S;N457T;L557P;R602C;	+++
829		L253Q;A362V;Q556G;L557G;K723E;	+++
830		N185D;N348D;A362V;	+++
831		N185E;L253S;S317R;A362V;	+++
832		L253Q;S317R;A362V;L557G;	+++
833		N185D;N348D;L557G;	+++
834		N185D;L253Q;S317R;N457T;	+++
835		S317R;N348D;A362V;N457T;L557G;	+++
836		L253Q;S317R;G415H;L557P;K723E;	+++
837		N185D;N348D;W370L;G415H;Q556G;L557P ;K723E;	+++
838		K304E;S317R;N348H;A362V;L557G;W701F ;	+++
839		N185D;L253S;	+++
840		N185E;G415H;N457T;Q556G;K723E;	+++
841		G415H;Q556G;	+++
842		L253S;N457T;L557P;	+++
843		S317R;N348D;G415H;N457T;	+++
844		L253Q;G415H;L557G;	+++
845		L253Q;S317R;N348D;	+++
846		N185D;N348H;A362V;L557P;	+++
847		N185D;L253S;N348D;A362V;W370L;G415H ;D428G;Q556G;K723E;	+++

## 043748

848		N348D;Q556G;L557G;	+++
849		N185D;N348D;N457T;K723E;	+++
850		N185E;L253Q;N348D;L557G;	+++
851		N185D;A362V;G415H;L557P;	+++
852		N185E;S317R;A362V;N457T;L557G;K723E ;	+++
853		L253Q;S317R;G415H;Q556G;L557G;K723E ;	+++
854		L253Q;N348H;A362V;L557G;	+++
855		N185E;N348D;A362V;L557P;	+++
856		L253Q;A362V;W701F;K723E;	+++
857		S317R;N348D;A362V;Q556G;L557P;K723E ;	+++
858		N185E;L253S;K723E;	+++
859		N185D;S317R;N348D;	+++
860		N185D;S317R;N348H;A362V;	+++
861		N185E;S317R;N457T;Q556G;L557G;	+++
862		N185E;N348D;A362V;	+++
863		S317R;A362V;L557G;	+++
864		N185E;A362V;N457T;	+++
865		N185D;L253Q;S317R;N348H;K723E;	+++
866		N348H;A362V;N457T;W701F;K723E;	+++
867		N348D;A362V;N457T;	+++
868		N185D;S317R;N348H;N457T;	+++
869		N185E;N457T;Q556G;	+++
870		N185E;S317R;N348D;G415H;L557P;W701F ;	+++
871		L253S;N348H;N457T;	+++
872		N185E;L253Q;N348D;G415H;K723E;	+++
873		L253S;Q556G;L557G;	+++
874		N185E;L253Q;W701F;K723E;	+++
875		N185D;S317R;A362V;Q556G;	+++
876		L253S;N348H;K723E;	+++
877		N185E;L253Q;S317R;N457T;	+++

## 043748

878		N185D;G415H;N457T;K723E;	+++
879		N185E;N348D;G415H;	+++
880		L253Q;N348H;A362V;W370L;L557P;	+++
881		N185D;G415H;Q556G;	+++
882		N185E;N348D;A362V;N457T;K723E;	+++
883		N185D;S317R;L557P;	+++
884		L253S;N348H;L557G;	+++
885		N185D;S317R;W370L;N457T;L557G;	+++
886		N185D;S317R;N348D;A362V;K723E;	+++
887		S317R;A362V;W370L;L557G;	+++
888		N185D;S317R;W701F;	+++
889		L253Q;G415H;N457T;	+++
890		L253S;A362V;	+++
891		N348H;G415H;Q556G;L557P;	+++
892		N185D;N348D;A362V;K723E;	+++
893		N185D;N348H;A362V;	+++
894		N185E;L253Q;S317R;A362V;	+++
895		N185E;L253Q;N348H;L557G;	+++
896		N185D;W701F;	+++
897		L253Q;S317R;A362V;G415H;	+++
898		L253Q;S317R;W370L;N457T;L557G;K723E ;	+++
899		N185E;S317R;A362V;	+++
900		L253S;S317R;	+++
901		L253Q;N348H;L557G;	+++
902		N185D;L557G;K723E;	+++
903		N185E;G415H;L557G;	+++
904		N185E;W701F;	+++
905		S317R;N348D;L557G;	+++
906		L253S;N348H;N457T;Q556G;L557G;Y580N ;K723E;	+++
907		N185E;A362V;N457T;K723E;	+++
908		N348D;A362V;L557G;K723E;	+++
909		L253Q;S317R;A362V;G415H;K723E;	+++

## 043748

910		L253Q;N457T;Q556G;L557G;	+++
911		G415H;N457T;Q556G;L557G;	+++
912		L253Q;S317R;L557G;K723E;	+++
913		S317R;N457T;Q556G;L557G;	+++
914		N348H;G415H;N457T;	+++
915		N185D;L253Q;N348H;L557P;K723E;	+++
916		L253Q;A362V;N457T;K723E;	+++
917		N185D;L253Q;Q556G;L557P;K723E;	+++
918		N185D;G415H;K723E;	+++
919		S317R;A362V;N457T;	+++
920		L253Q;N348D;Q556G;K723E;	+++
921		S317R;L557G;K723E;	+++
922		N185E;Q556G;L557G;K723E;	+++
923		N185D;A362V;L557G;	+++
924		N185E;N348D;K723E;	+++
925		L253Q;A362V;N457T;	+++
926		L253S;Q556G;	+++
927		N185D;N348D;	+++
928		L253Q;S317R;N457T;	+++
929		N185E;L253Q;	+++
930		L253S;L557G;	+++
931		N185E;N348D;	+++
932		L253Q;N348D;A362V;K723E;	+++
933		N185D;A362V;G415H;K723E;	+++
934		N185E;A362V;Q556G;	+++
935		L253Q;L557G;K723E;	+++
936		S317R;N348H;L557G;	+++
937		S317R;A362V;G415H;	+++
938		N185E;L253Q;S317R;	+++
939		N185D;L253Q;L557G;	+++
940		G415H;L557G;	+++
941		S317R;N457T;L557G;	+++
942		A362V;L557G;K723E;	+++
943		L253Q;S317R;Q556G;	+++

## 043748

944		N348D;G415H;	+++
945		N185D;L253Q;N348H;A362V;K723E;	+++
946		N348H;Q556G;	+++
947		A362V;N457T;L557G;	+++
948		L253Q;S317R;N348H;	+++
949		L253Q;N348D;W370L;Q556G;L557G;K723E ;	+++
950		N185E;Q556G;L557P;	+++
951		A362V;W370L;L557G;K723E;	+++
952		L253Q;Q556G;L557G;	+++
953		L253S;N457T;	+++
954		N185E;S317R;N457T;K723E;	+++
955		S317R;A362V;Q556G;L557G;	+++
956		N185D;N348H;N457T;	+++
957		A362V;N457T;Q556G;L557P;	+++
958		G415H;L557P;	+++
959		L253S;	+++
960		N185E;L253Q;N457T;	+++
961		L253S;A642V;	+++
962		N348D;A362V;	+++
963		N185E;S317R;W370L;Q556G;	+++
964		L253Q;A362V;	+++
965		L253Q;N348H;A362V;	+++
966		N457T;Q556G;L557P;	+++
967		A160S;N185E;S317R;A362V;L557G;	+++
968		S317R;W370L;L557G;	+++
969		S317R;W370L;N457T;	+++
970		N457T;L557P;	+++
971		S317R;Q556G;	+++
972		A362V;N457T;	+++
973		S317R;A362V;	+++
974		S317R;Q556G;L557G;K723E;	+++
975		S317R;G415H;	+++
976		N185D;L253S;V360I;G415H;L557G;	+++

977		N348D;	+++
978		N348D;A362V;K723E;	+++
979		N185E;N348H;	+++
980		A362V;Q556G;L557P;	+++
981		N185D;N457T;	+++
982		N185D;A362V;	+++
983		L253Q;S317R;	+++
984		N348H;A362V;	+++
985		A362V;Q556G;K723E;	+++
986		N185E;A362V;	+++
987		A362V;L557G;	+++
988		S317R;Q556G;L557G;	++
989		L253Q;K723E;	++
990		N185D;S317R;	++
991		S317R;N457T;	++
992		S317R;L557G;	++
993		G415H;	++
994		A362V;N457T;K723E;	++
995		N185D;K723E;	++
996		Q556G;L557G;	++
997		A362V;	++
998		N185D;	++
999		L253Q;S317R;	++
1000		S317R;K723E;	++
1001		Q556G;K723E;	++
1002		L253Q;	++
1003		L557G;	++
1004		N185E;	++
1005		S317R;	++
1006		A140E;N185E;L253Q;G415H;N457T;L557G ;	++
1007		N457T;	+
1008		L253S;S317R;A362V;N457T;K723E;S750R ;	+
1009		N185D;A362V;E707A;	+
1010		L557P;	+
1011		L253Q;F277L;L557P;	+
1012		N185D;A362V;L557G;E707A;	+
1013		N348H;	+
1014		K723E;	+
1015		N185D;S317R;A362V;E707A;	+

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 116 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 1,5 раза увеличены; "++" > чем в 1,5 раза, но меньше чем в 2,0 раза; "+++" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 5,0 раза; "++++" > чем в 5,0 раза.

Пример 16. Эффект добавления гистидиновой метки, оказываемый на SEQ ID № 136

Ацилирование по A1 для SEQ ID № 136 (описано в примере 15) и SEQ ID № 142, которая содержит метку из шести гистидинов на С-конце SEQ ID № 136, сравнивали в масштабе встряхиваемой колбы. Порошки встряхиваемых колб получали, как описано в примере 4. Реакции осуществляли в 96-луночных планшетах с глубокими лунками, содержащими 200 мкл 0,25 М Tris-HCl, pH 9,25, 20% ацетонитрила, 50 г/л инсулина, 17 г/л метилфенилацетата и 0,05-0,5 г/л лиофилизированного порошка фермента. Планшеты инкубировали во встряхивателях Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 100 об./мин, в течение 4 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в

течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 мин, разводили 20× в воде и загружали в HPLC для анализа. Результаты представлены на фиг. 3. Как показано на этой фиг., добавление гистидиновой метки оказывало минимальный эффект на фермент относительно версии без гистидиновой метки.

Пример 17. Усовершенствование ацилирования инсулина в положениях A1 и B29 по сравнению с SEQ ID № 40 в высокопропускном скрининге

SEQ ID № 40 выбирали в качестве дополнительного родительского фермента на основе результатов, описанных в примере 11. Библиотеки сконструированных генов получали с использованием луночных приемов (например, насыщающий мутагенез и рекомбинация предварительно идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в НТР, как описано в примере 2, а растворимые лизаты создавали, как описано в примере 3.

НТР реакции осуществляли в 96-луночных планшетах с глубокими лунками, каждая содержала 200 мкл, содержащих 0,2 М TRIS, pH 9,25, 20% ацетонитрила, 50 г/л инсулина, 17 г/л метилфенилацетата и 10 мкл НТР супернатанта. НТР планшеты инкубировали во встряхивателях Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 100 об./мин в течение 2 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 мин и загружали в HPLC для анализа.

Процент превращения относительно SEQ ID № 40 (процент превращения FIOP) вычисляли как процент превращения продукта, образуемого вариантом, относительно процента превращения, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 40. Результаты представлены в табл. 17.1. Процент превращения количественно определяли делением площади пика продукта на сумму площадей пиков субстрата, продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Процент избирательности относительно SEQ ID № 40 (процент избирательности FIOP) вычисляли как процент избирательности продукта, образуемого вариантом, относительно процента избирательности, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 40. Результаты представлены в табл. 17.1. Процент избирательности вычисляли посредством деления площади пика продукта на сумму площадей пиков продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Таблица 17.1. Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участку В29, относительно SEQ ID № 40

№ варианта	SEQ ID № (н./а . к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 40)	Процент превращения ацилированием (FIOP) <sup>1</sup> по участкам А1 и В29 (относительно SEQ ID № 40)	Процент избирательности ацилирования (FIOP) <sup>2</sup> для участков А1 и В29 (относительно SEQ ID № 40)
1018	143/144	L55I;Q71G;A255P;N444S;T560G;	++++	+++
1030		L55I;Q71G;K128W;Y253S;T560G;	++++	++++
1020	147/148	L55I;Q71G;G74D;N444S;	++++	+++
1031		L256Y;N457M;G461R;	++++	++++
1032		L55I;Y253S;H348D;	++++	++++
1019	145/146	L55I;Q71G;K128W;N444S;	++++	+++
1033		L55I;Q71G;G74D;	++++	+++
1034		L55I;Q71G;	++++	+++
1035		H348N;K352T;T384P;	++++	++++
1036		L55I;H348D;	++++	++++
1037		H348N;K352T;T384P;Q559H;	++++	++++
1038		L55I;Q71G;Y253S;A255P;	++++	+++
1039		L55I;G74D;H348D;Q380P;N444S;T560G;	++++	+++
1040		H348N;K352T;P364L;Y616R;	++++	++++
1041		L55I;Q71G;G74D;Y253S;A255P;	++++	+++
1042		L55I;Q71G;G74D;A255P;H348	++++	+++

		D;		
1043		L55I;Q71G;G74D;A517K;	++++	+++
1044		L55I;Q71G;G74D;N444S;F454 W;A517K;	++++	++++
1023	153/1 54	L55I;Q71F;G74D;K390L;	+++	++
1045		H348N;K352T;T384R;N457M;Y 616R;	+++	+++
1046		L55I;Q71G;G74D;H348D;N444 S;T560G;	+++	+++
1047		Q71M;G74S;N185D;K390A;Q62 6M;	+++	++
1048		L55I;Y253S;Q380P;T560G;	+++	++
1022	151/1 52	L55I;Q71M;G74S;Q380P;	+++	++
1021	149/1 50	L55I;Q71M;Q380P;K436G;W61 9F;	+++	++
1049		H348N;K352T;	+++	+++
1050		K128W;Y253S;F254W;A362V;N 457T;Q556G;L557G;	+++	+++
1051		L55I;Q71F;W619F;	+++	++
1052		L55I;Q71G;H348D;F701W;	+++	+++
1053		L55I;Q71M;G74D;N185D;	+++	+
1054		L55I;Q71M;N185D;K436G;W61 9F;	+++	+
1055		L55I;Y253S;N444S;	+++	++
1056		H348N;K352T;T384R;	+++	+++
1057		L55I;Q71F;	+++	++
552		L55I;H348D;Q380P;	+++	+
1058		T129W;H348N;K352T;	+++	+++
1059		L55I;Q71M;Q380P;	+++	+
1060		T129W;G202A;F254K;K352T;R 373K;T384R;N457M;	+++	+++
1061		N185E;K369C;N457T;Q556G;L 557G;D709E;K723E;	+++	++
1062		L55I;N444S;	+++	+
1063		N185E;G415H;N457T;K723E;	+++	+
1064		A67S;Q71F;A255P;L256K;T38 4E;	+++	++++
1065		Q71F;L256K;N444S;T560G;	+++	++
1066		L256Y;H348N;T384R;	+++	+++
1067		Q71F;N444K;Y616E;	+++	++
1068		H546L;	+	+++
1069		N440L;	+	+
1070		D518R;	+	+++
1071		A279P;	+	+
1072		A349E;	+	+
1073		N440Y;	+	+
1074		K682A;	+	+
1075		N333S;	+	+
1076		K682G;	+	+
1077		N333A;	+	+

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 40 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 5,0 раза увеличены; "++" >

чем в 5,0 раза, но меньше чем в 10,0 раза; "+++" > чем в 10,0 раза, но меньше чем в 20,0 раза; "++++" > чем в 20,0 раза.

<sup>2</sup> Уровни увеличенной избирательности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 40 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 5,0 раза увеличены; "++" > чем в 5,0 раза, но меньше чем в 10,0 раза; "+++" > чем в 10,0 раза, но меньше чем в 20,0 раза; "++++" > чем в 20,0 раза.

Пример 18. Усовершенствование ацилирования инсулина в положениях A1 и B29 по сравнению с SEQ ID № 154 в высокопропускном скрининге

SEQ ID № 154 выбирали в качестве следующего родительского фермента на основе результатов, описанных в примере 17. Библиотеки сконструированных генов получали с использованием луночных приемов (например, насыщающий мутагенез и рекомбинация предварительно идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в НТР, как описано в примере 2, а растворимые лизаты создавали, как описано в примере 3.

НТР реакции осуществляли в 96-луночных планшетах с глубокими лунками, каждая содержала 200 мкл, содержащих 0,2 М TRIS, pH 9,25, 20% ацетонитрила, 50 г/л инсулина, 17 г/л метилфенилацетата и 10 мкл НТР супернатанта. НТР планшеты инкубировали во встряхивателях Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 100 об./мин, в течение 2 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 мин и загружали в HPLC для анализа.

Процент превращения относительно SEQ ID № 154 (процент превращения FIOP) вычисляли как процент превращения продукта, образуемого вариантом, относительно процента превращения, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 154. Результаты представлены в табл. 18.1. Процент превращения количественно определяли делением площади пика продукта на сумму площадей пиков субстрата, продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Процент избирательности относительно SEQ ID № 154 (процент избирательности FIOP) вычисляли как процент избирательности продукта, образуемого вариантом, относительно процента избирательности, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 154. Результаты представлены в табл. 18.1. Процент избирательности вычисляли посредством деления площади пика продукта на сумму площадей пиков продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Таблица 18.1. Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участку В29, относительно SEQ ID № 154

№ варианта	SEQ ID №	Различия аминокислот (относительно SEQ ID №	Процент превращени	Процент избиратель
нта	(н./а.к.)	154)	я ацилирован ием (FIOP) <sup>1</sup> по участкам А1 и В29 (относительно SEQ ID № 154)	ности ацилирован ия (FIOP) <sup>2</sup> для участков А1 и В29 (относительно SEQ ID № 154)
1026	159/160	N185E;H348D;K352T;L390A;N444S;	+++	++
1027	163/164	F71G;F254W;H348D;T384P;L390A;N444S;	+++	++
1078		Y253S;H348D;T384P;L390A;N444S;N457T;	+++	++
1079		F71G;N185E;Y253S;F254W;H348D;K352T;T384P;L390A;N444S;	+++	++
1028	161/162	N185E;Y253S;F254W;H348N;K352T;L390A;T560G;	+++	++
1029	165/166	F71G;Y253S;H348D;K352T;T384P;L390A;T560G;	+++	+
1080		H348D;K352T;L390A;N444S;	+++	+
1081		F254W;H348N;T384P;L390A;	+++	++
1082		K352T;L390A;N444S;	++	++
1083		H348D;K352T;L390A;	++	+
1084		N185E;F254W;H348N;K352T;T384P;L390A;N444S;	++	+
1085		Y253S;F254W;K352T;T384P;L390A;	++	+
1086		F254W;T384P;L390A;	++	+
1087		F71G;E165G;N185E;Y253S;F254W;H348D;K352T;L390A;N444S;	++	+
1088		F71G;K352T;L390A;	++	+

## 043748

1089		F71G;T384P;L390A;N444S;T560G;	++	+
1090		F71G;N185E;F254W;H348D;K352T;L390A;N444S;	++	+
1091		F71G;F254W;H348N;K352T;T384P;L390A;N444S;	++	+
1092		G202A;F254W;H348D;T384P;L390A;N444S;	++	+
1093		Y253S;H348D;T384P;L390A;N444S;	++	+
1094		F71G;A466M;	++	+
1095		F71G;Y253S;K352T;T384P;L390A;T560G;	++	+
1096		H348D;L390A;N444S;	++	+
1097		F71G;H348N;T384P;L390A;T560G;	++	+
1098		F254W;K352T;L390A;	++	+
1099		Y253S;F254W;T384P;L390A;	++	+
1100		L390A;N444S;	++	+
1024	155/156	D74S;A362V;Q556G;	++	+
1101		F71G;Y253S;F254W;H348N;K352T;L390A;	++	+
1102		D74S;A362V;	++	+
1103		D74S;A362V;T384R;L557G;	++	+
1104		F71M;S251C;A279P;N333A;N444S;	++	+
1105		H348D;K352T;A362V;N444S;K723E;	++	+
1106		F71G;F254W;H348D;K352T;T384P;L390A;N444S;	++	+
1107		A279P;N440Y;N444S;	++	+
1108		F71G;A250S;A279P;N440L;N444S;A466M;A642E;	++	+
1109		F254W;H348N;L390A;	++	+

1110		D74S;A362V;N444K;	++	+
1025	157/158	D74G;N185E;K352T;Q380P;K436G;Y616R;	++	+
1111		D74S;	++	+
1112		D74S;A362V;N444S;Q556G;	++	+
1113		K352T;T384P;L390A;T560G;	++	+
1114		F71M;D74S;A362V;L390A;G415H;N444K;	++	+
1115		F71G;H348D;T384P;L390A;	+	+
1116		D74G;H348D;Q380P;K436G;K723E;	+	+
1117		F71G;P164S;Y253S;H348D;T384P;L390A;N444S;I637M;	+	+
1118		F71G;D74S;L390A;G415H;W619F;	+	+
1119		N185E;T384P;L390A;H472P;	+	+
1120		F254W;K352T;A362V;K723D;	+	+
1121		D74G;H348D;T560G;K723E;	+	+
1122		A67S;Y253S;F254W;H348D;K352T;G415H;K723D;	+	+
1123		F71G;H348D;K352T;T384P;L390A;N444S;	+	+
1124		F71G;H348D;L390A;	+	+
1125		F71G;N185E;H348N;L390A;	+	+
1126		N185D;H348D;K352T;K436G;T560G;K723D;	+	+
1127		F71G;F254W;T384P;L390A;N444S;T560G;	+	+
1128		D74S;A362V;T384P;	+	+
1129		A279P;N333A;A466M;	+	+
1130		F71G;Y253S;K352T;L390A;	+	+
1131		D74S;L557G;	+	+

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 40 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 2,0 раза увеличены; "++" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 3,0 раза; "+++ > чем в 3,0 раза, но меньше чем в 5,0 раза; "++++" > чем в 5,0 раза.

<sup>2</sup> Уровни увеличенной избирательности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 40 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 2,0 раза увеличены; "++" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 3,0 раза; "+++ > чем в 3,0 раза, но меньше чем в 5,0 раза; "++++" > чем в 5,0 раза.

Пример 19. Усовершенствование ацилирования инсулина в положениях A1 и B1 по сравнению с SEQ ID № 12 в высокопропускном скрининге

SEQ ID № 12 выбирали в качестве дополнительного родительского фермента на основе результатов, описанных в примере 7. Библиотеки сконструированных генов получали с использованием луночных приемов (например, насыщающий мутагенез и рекомбинация предварительно идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в НТР, как описано в примере 2, а растворимые лизаты создавали, как описано в примере 3.

НТР реакции осуществляли в 96-луночных планшетах с глубокими лунками, содержащими 200 мкл 0,1 М TRIS, pH 9,25, 20% ацетонитрила, 10 г/л инсулина, 17 г/л метилфенилацетата и 10 мкл НТР супернатанта. НТР планшеты инкубировали во встряхивателях Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 100 об./мин в течение 5 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила или диметилацетамида и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 мин и загружали в HPLC для анализа.

Процент превращения относительно SEQ ID № 12 (процент превращения FIOP) вычисляли как процент превращения продукта, образуемого вариантом, относительно процента превращения, обеспе-

чиваемого с помощью SEQ ID № 12. Результаты представлены в табл. 19.1. Процент превращения количественно определяли делением площади пика продукта на сумму площадей пиков субстрата, продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Таблица 19.1. Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участку B29, относительно SEQ ID № 12

№ варианта	SEQ ID № (н./а.к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 12)	Процент превращения ацилированием (FIOF) <sup>1</sup> по участкам A1 и B1 (относительно SEQ ID № 12)	Процент избирательности ацилирования (FIOF) <sup>1</sup> для участков A1 и B1 (относительно SEQ ID № 12)
106	65/66	Y27T;D74N;L253V;F254W;W370I;D381K;	++++	+++
141	67/68	Y27T;F254W;A255G;W370I;	++++	+++
117		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G;W370I;D381K;T384P;	++++	+++
120		Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I;D381F;	++++	+++
1132		Y27T;L253V;F254W;N348R;W370I;	+++	++
157		Y27T;L253V;F254W;N348R;W370I;T384P;	+++	++
1133		Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G;N348R;W370I;D381W;T384P;	+++	++
86		Y27T;D74N;L253V;F254W;N348R;W370I;D381K;T384P;	+++	++
137		Y27T;D74S;F254W;A255G;W370I;	+++	++
170		Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R;W370I;D381W;T384P;	+++	++

91		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G; W370I;	+++	++
155		Y27T;L253V;A255G;W370I;D381F ;T384P;	+++	++
1134		Y27T;L253V;F254S;A255G;N348R ;W370I;	+++	++
258		Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R ;W370I;	+++	++
1135		Y27T;L253V;F254W;A255G;N348R ;W370I;	+++	++
126		Y27T;D74G;F254W;A255G;N348R; W370I;	+++	++
143		Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I ;	+++	++
124		Y27T;L253V;F254W;D381F;T384P ;	+++	++
240		Y27T;L253V;F254W;	+++	++
171		Y27T;L253V;F254L;A255G;N348R ;W370I;T384P;	+++	++
275		Y27T;D74G;L253V;F254W;	+++	++
84		Y27T;D74G;L253V;F254W;	+++	++
96		Y27T;L253V;A255G;W370I;	++	++
115		Y27T;D74P;L253V;W370I;	++	++
136		Y27T;D74N;L253V;F254W;A255G; N348R;W370I;T384P;	++	++
153		Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I ;T384P;	++	++
102		Y27T;D74N;L253V;N348R;W370I; D381R;T384P;	++	++
95		Y27T;D74S;L253V;N348R;W370I; D381K;	++	++
1136		Y27T;D74G;F254W;W370I;	++	++
122		Y27T;D74G;L253V;F254W;A255G; D381K;	++	++
145		Y27T;D74G;L253V;D381F;T384P;	++	++
116		Y27T;L253V;N348R;W370I;T384P ;	++	++
154		Y27T;D74G;L253V;F254W;N348R;	++	++
1137		Y27T;L253V;N348R;W370I;T384P ;	++	++
152		Y27T;D74G;L253V;N348R;W370I;	++	++
162		Y27T;D74P;L253V;F254W;N348R; D381F;T384P;	++	++
237		Y27T;D74G;L253V;N348R;W370I;	++	++
113		Y27T;D74G;A255G;W370I;	++	++
1138		Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I ;D381F;T384P;	++	+
208		Y27T;F254W;A255G;N348R;W370I ;D381F;T384P;	++	+
643	119/ 120	K128W;A255P;Q380P;G444K;N457 T;A517K;T560G;	+	+

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности или избирательности определяли относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 12 и определяли следующим образом: "+" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 5 раз увеличены; "++" > чем в 5 раз, но меньше чем в 10 раз; "+++" > чем в 10 раз, но меньше чем в 15 раз; "++++" > чем в 15 раз.

Пример 20. Усовершенствование ацилирования инсулина в положении В29 в присутствии фенилуксусной кислоты по сравнению с SEQ ID № 56 с высокой пропускной способностью

SEQ ID № 56 выбирали в качестве дополнительного родительского фермента на основе результатов, описанных в примере 12. Библиотеки сконструированных генов получали с использованием луночных приемов (например, насыщающий мутагенез и рекомбинация предварительно идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в НТР, как описано в примере 2, а растворимые лизаты создавали, как описано в примере 3, но с использованием 400 мкл лизирующего буфера вместо 200 мкл.

НТР реакции осуществляли в 96-луночных планшетах с глубокими лунками. Каждая реакционная лунка содержала 200 мкл 0,2 М TRIS, 10% ацетонитрила, 50 г/л инсулина, 17 г/л метилфенилацетата, 12,5 или 15 г/л фенилуксусной кислоты и 10 мкл НТР супернатанта (начальный pH перед добавлением лизата составлял 9,4). НТР планшеты инкубировали во встряхивателях Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 100 об./мин в течение 3 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем добавляли 400 мкл воды и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 мин и разводили еще в 2 раза в воде перед загрузкой в HPLC для анализа.

Процент превращения относительно SEQ ID № 56 (процент превращения FIOP) вычисляли как процент превращения продукта, образуемого вариантом, относительно процента превращения, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 56. Результаты представлены в табл. 20.1. Процент превращения количественно определяли делением площади пика продукта на сумму площадей пиков субстрата, продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Таблица 20.1. Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участку В29, относительно SEQ ID № 56

№ вариант а	SEQ ID № (н./а. к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 56)	Процент превращения ацилированием (FIOP) <sup>1</sup> по участку В29 (относительно SEQ ID № 56)
615		T27S;	++
611	97/98	F57H;	+
614	89/90	A67S;	+
616		A160C;	+
612	99/100	F57C;	+
617		F57V;	+
618		S704A;	+
619		R373I;	+
620		T379S;	+

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 56 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 2,0 раза увеличены; "++" > чем в 2,0 раза.

Пример 21. Аналитическое обнаружение инсулина и его ацилированных продуктов.

Данные, описанные в примерах 5-18, собирали с использованием аналитических способов в табл. 21.1, 21.2, 21.3, 21.4 и 21.5. Все способы, предусмотренные в настоящем описании, находят использование при анализе вариантов, получаемых с использованием настоящего изобретения. Однако не предусмотрено, что способы, описанные в настоящем описании, являются исключительными способами в применении к анализу вариантов, предусмотренных в настоящем описании и/или получаемых с использованием способов, предусмотренных в настоящем описании. Результаты, представленные на фиг. 1, соответствуют порядку элюирования соединений для этих способов.

Таблица 21.1. Аналитический способ

Прибор	Agilent HPLC серии 1200	
Колонка	Ascentis Express C18, 4,6 × 100 или 150 мм, 2,7 мкм	
Подвижная фаза	Градиент I (A: 0,05% TFA в воде; B: 0,05% TFA в MeCN)	
	Время (мин)	%A
	0,0	95
	0,1	70
	8, 8,5 или 9	50
	8,1, 8,6 или 9,1	5
	8,2, 8,7, или 9,2	95
	9, 9,2 или 9,5	95
	Градиент II ((A: 0,05% TFA в воде; B: 0,05% TFA в MeCN)	
Подвижная фаза	Время (мин)	%A
	0	70
	7 или 8	50
	7,1 или 8,1	70
	9 или 10	70
Скорость потока	1,0 мл/мин	
Время прохождения	~10 мин	
Порядок элюирования продуктов	Инсулин; A1-ацелированный инсулин; B29-ацелированный инсулин; B1-ацелированный инсулин; ди-A1, B29-ацелированный инсулин; ди-A1, B1-ацелированный инсулин; ди-B1, B29-ацелированный инсулин; три-A1, B1, B29-ацелированный инсулин	
Температура колонки	40°C	
Объем впрыска	5 мкл	
Обнаружение	УФ 218 нм и 280 нм Детектор: MWD (Agilent серии 1200) Щель=4 нм	

Таблица 21.2. Аналитический способ

Прибор	Agilent HPLC серии 1290	
Колонка	Waters Cortecs UPLC C18 2,1 × 50 мм, 1,6 мкм	
Подвижная фаза	Градиент (A: 0,05% TFA в воде; B: 0,05% TFA в MeCN) для образцов	
	Время (мин)	%A
	0,0	72
	2,5	50
	2,51-2,7	10
	2,71	72
	3	72
	Градиент (A: 0,05% TFA в воде; B: 0,05% TFA в MeCN) для промывания	
Время (мин)	%A	

	0,0	72
	1,7	0
	1,71-2	72
Скорость потока	0,9 мл/мин	
Время прохождения	3 мин	
Порядок элюирования продуктов	Инсулин; А1-ацелированный инсулин; В29-ацелированный инсулин; В1-ацелированный инсулин; ди-А1, В29-ацелированный инсулин; ди-А1, В1-ацелированный инсулин; ди-В1, В29-ацелированный инсулин; три-А1, В1, В29-ацелированный инсулин	
Температура колонки	40 °С	
Объем впрыска	0,5 мкл	
Обнаружение	УФ 218 нм и 280 нм Детектор: MWD (Agilent серии 1290); щель=4 нм; ширина пика > 0,1 мин; Эталон=360; BW=8	

Таблица 21.3. Аналитический способ

Прибор	Agilent HPLC серии 1200
Колонка	Ascentis Express C18, 4,6 × 100 или 150 мм, 2,7 мкм
Подвижная фаза	
Скорость потока	1,0 мл/мин
Время прохождения	~10 мин
Порядок элюирования продуктов	Инсулин; А1-ацелированный инсулин; В29-ацелированный инсулин; В1-ацелированный инсулин; ди-А1, В29-ацелированный инсулин; ди-А1, В1-ацелированный инсулин; ди-В1, В29-ацелированный инсулин; три-А1, В1, В29-ацелированный инсулин
Температура колонки	40 °С
Объем впрыска	5 мкл
Обнаружение	УФ 218 нм и 280 нм Детектор: MWD (Agilent серии 1200); щель=4 нм; ширина пика > 0,1 мин; Эталон=360; BW=8

Таблица 21.4. Аналитический способ

Прибор	Agilent HPLC серии 1290
Колонка	Waters Cortecs UPLC C18 2,1 × 50 мм, 1,6 мкм
Подвижная фаза	
Скорость потока	0,9 мл/мин
Время прохождения	3 мин
Порядок элюирования продуктов	Инсулин; А1-ацелированный инсулин; В29-ацелированный инсулин; В1-ацелированный инсулин; ди-А1, В29-ацелированный инсулин; ди-А1, В1-ацелированный инсулин; ди-В1, В29-ацелированный инсулин; три-А1, В1, В29-ацелированный инсулин
Температура колонки	40 °С
Объем впрыска	0,5 мкл
Обнаружение	УФ 218 нм и 280 нм Детектор: MWD (Agilent серии 1290); щель=4 нм; ширина пика > 0,1 мин; эталон=360; BW=8

Таблица 21.5. Аналитический способ

Прибор	Система Agilent UPLC 1290, оборудованная четырехкомпонентным насосом и DAD UV детектором, или система Thermo Vanquish UPLC, оборудованная DAD UV детектором.
Колонка	Колонка Waters Cortecs UPLC C18 (50 × 2,1 мм, 1,6μ)
Подвижная фаза	
Скорость потока	1,0 мл/мин
Время прохождения	3,25 мин
Порядок элюирования продуктов	Фенилуксусная кислота, 0,32 минуты; инсулин, 0,78 минуты; А1-моноацилинсулин, 0,91 минуты; В29-моноацилинсулин, 0,95 минуты; В1-моноацилинсулин, 1,02 минуты; А1,В29-диацилинсулин, 1,09 минуты; А1,В1-диацилинсулин, 1,14 минуты; В1,В29-диацилинсулин, 1,21 минуты; А1,В1,В29-триацилинсулин, 1,38 минуты
Температура колонки	40°C
Объем впрыска	1,0 мкл
Обнаружение	УФ обнаружение (λ=218 нм, щель=4 нм, ширина пика > 0,1 мин, эталон=360 нм)

Пример 22. Усовершенствование ацилирования инсулина в положениях А1 и В2 9 по сравнению с SEQ ID № 160 в высокопропускном скрининге

SEQ ID № 160 выбирали в качестве дополнительного родительского фермента на основе результатов, описанных в примере 18. Библиотеки сконструированных генов получали с использованием луночных приемов (например, насыщающий мутагенез и рекомбинация предварительно идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в НТР, как описано в примере 2, а растворимые лизаты создавали, как описано в примере 3.

НТР реакции осуществляли в 96-луночных планшетах с глубокими лунками, каждая содержала 200 мкл, состоящих из 0,5 М TRIS, рН 10,0, 20% ацетонитрила, 50 г/л инсулина, 17 г/л метилфенилацетата и 5-10 мкл НТР супернатанта. НТР планшеты инкубировали во встряхивателях Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 100 об./мин, в течение 2 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 мин и загружали в HPLC для анализа.

Процент превращения относительно SEQ ID № 160 (процент превращения FIOP) вычисляли как процент превращения продукта, образуемого вариантом, относительно процента превращения, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 160. Результаты представлены в табл. 22.1. Процент превращения количественно определяли делением площади пика продукта на сумму площадей пиков субстрата, продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Таблица 22.1. Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участкам A1 и B29, относительно SEQ ID № 160

№ варианта	SEQ ID № (н./а.к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 160)	Процент превращения ацилированием (FIOP) <sup>1</sup> по участкам A1 и B29 (относительно SEQ ID № 160)	Процент избирательности ацилирования (FIOP) <sup>2</sup> для участков A1 и B29 (относительно SEQ ID № 160)
1139		S251G;	+	
1140		N44S;	+	+
1141		N44R;	+	
1142		N44M;	+	+
1143		F254H;	+	
1144		N44Q;	+	+
1145		S251A;	+	+
1146		R317A;	+	+
1147		D348H;	+	+
1148		F254V;	+	+
1149		F254L;	+	+
115		S444A;	+	+
1151		I55V;	+	
1152		S444K;	+	
1153		S444R;	+	+
1154		N44D;	+	+
1155		N44E;	+	+
1156		R317W;	+	+
1157		N44T;	+	+
1158		F254C;	+	+
1159		S444L;	+	+
116		N44H;	+	+
1161		N44I;	+	+
1162		A39T;	+	+
1163		F254T;	+	+
1164		F254G;	+	+
1165	167/168	K172R; D484T	+	+
1166		F254Y;	+	+
1167		S444T;	+	+
1168		F254S;	++	+
1169	169/17	S251T;	++	+
117	171/172	A466M;A47T;K723E;	++	+
1171	173/174	E185D;A279P;Q38P;A466M;	++	+
1172	175/176	F254W;	+++	++
1173	177/178	F254A;	+++	++
1174	179/18	A39S;	+++	++

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 160 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 2,0 раза увеличены; "++" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 3,0 раза; "+++" > чем в 3,0 раза, но меньше чем в 5,0 раза; "++++" > чем в 5,0 раза.

<sup>2</sup> Уровни увеличенной избирательности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 160 и определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 2,0 раза увеличены; "++" > чем в 2,0 раза, но меньше чем в 3,0 раза; "+++" > чем в 3,0 раза, но меньше чем в 5,0 раза; "++++" > чем в 5,0 раза.

Пример 23. Усовершенствование ацилирования инсулина в положении В29 по сравнению с SEQ ID № 100 в высокопропускном скрининге

SEQ ID № 100 выбирали в качестве следующего родительского фермента на основе результатов, описанных в примере 13. Библиотеки сконструированных генов получали с использованием луночных приемов (например, насыщающий мутагенез и рекомбинация предварительно идентифицированных полезных мутаций). Полипептиды, кодируемые каждым геном, получали в НТР, как описано в примере 2, а растворимые лизаты создавали, как описано в примере 3, но с использованием 400 мкл лизирующего буфера, вместо 200 мкл.

НТР реакции осуществляли в 96-луночных планшетах с глубокими лунками. Каждая реакционная лунка содержала 200 мкл 0,5 М TRIS, 20% ацетонитрила, 50 г/л инсулина, 17 г/л метилфенилацетата и 40 мкл НТР супернатанта (начальный pH перед добавлением лизата=10). НТР планшеты инкубировали во встряхивателях Thermotron® (амплитуда 3 мм, модель № AJ185, Infors) при 30°C, 100 об./мин, в течение 5 ч. Реакции гасили с использованием 200 мкл ацетонитрила и перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Добавляли 400 мкл воды и планшеты снова перемешивали в течение 5 мин с использованием настольного встряхивателя. Затем планшеты центрифугировали на 4000 об./мин в течение 5 минут и разбавляли еще в 2 раза в воде перед загрузкой в HPLC для анализа.

Процент превращения относительно SEQ ID № 100 (процент превращения FIOP) вычисляли как процент превращения продукта, образуемого вариантом, относительно процента превращения, обеспечиваемого с помощью SEQ ID № 100, и он показан далее в таблице. Процент превращения количественно определяли делением площади пика продукта на сумму площадей пиков субстрата, продукта и примесей/побочного продукта, как наблюдали по HPLC анализу.

Таблица 23.1. Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участку В29, относительно SEQ ID № 100

№ варианта	SEQ ID (н./а.к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 100)	Процент превращения ацилированием (FIOP) <sup>1</sup> по участку В29 (относительно SEQ ID № 100)
1175	195/196	N444S;N457T;A466M;D709E;	++
1176	201/202	N333A;A362V;N457T;Y616T;	++
1177	193/194	A255G;K390Q;Y616T;S675E;	++
1178	199/200	N333A;N444S;N457T;Y616T;D709E;	++
1179		A255G;L557G;Y616T;	++
1180	181/182	A255G;L557G;E561P;Y616T;S675E;	++
1181		F254H;A255G;L557G;Y616T;	++
1182		A255G;R373N;Y616T;	++
1183		R373N;L557G;E561P;Y616T;S675E;	++
1184		A160T;A255G;L557G;Y616T;	++
1185		L557G;Y616T;S675E;	++
1186		A160T;A255G;K390Q;L557G;S675E;	++
1187		K390Q;Y616T;	++
1188		C57H;A255G;K369D;K390Q;	++
1189		N444S;N457T;D709E;	++
1190		L557G;Y616T;	+
1191		K390Q;L557G;	+
1192		N333A;A362V;T384E;Y616T;	+
1193		F254H;A255G;L557G;S675E;	+
1194		C57H;A255G;L557G;S675E;	+
1195		Q157S;R316H;A362V;K390A;N444S;T560G;	+
1196		A28V;P249A;T560G;D709E;	+
1197		K390Q;	+

1198		C57H;A255G;L557G;E561P;S675E;	+
1199		A160T;L557G;Y616T;	+
1200		L256Y;N333A;N444S;N457T;T560G;	+
1201		A255G;R373N;	+
1202		Y616T;	+
1203		R373N;E561P;	+
1204		K369D;L557G;E561P;	+
1205		L557G;S675E;	+
1206		C57H;A255G;L557G;	+
1207		A160T;F254H;K390Q;L557G;Y616T;	+
1208		A255G;K369D;R373N;S675E;	+
1209		V56L;A255G;Y616T;	+
1210		N333A;N444S;T560G;	+
1211		C57H;Y616T;	+
1212		F254H;A255G;K369D;K390Q;	+
1213		L557G;	+
1214		K369D;E561P;S675E;	+
1215		C57H;A255G;	+
1216		N333A;N444S;T560G;D709E;	+
1217		V56L;L557G;Y616T;	+
1218		V56L;C57H;A255G;L557G;E561P;	+
1219		L256Y;N333A;Y616T;D709E;	+

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 100, который демонстрировал превращение  $33,9 \pm 1,4\%$ . Усовершенствования эффективности определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 2,0 раза увеличены; "++" > чем 2.

Таблица 23.2

Активность и избирательность вариантов, ацилирующих по участку B29, относительно SEQ ID № 100

№ варианта	SEQ ID № (н./а. к.)	Различия аминокислот (относительно SEQ ID № 100)	Процент превращения
			ацилирование м (FIOP) <sup>1</sup> по участку B29 (относительно SEQ ID № 100)
1220	189/190	A28T;L557V;K723D;	+
1221	187/188	C57H;A255G;L557G;Y616T;S675E;	+
1222	197/198	A362V;N444S;N457T;	+
1223	185/186	C57H;A255G;Y616T;S675E;	+
1224	183/184	C57H;F254H;A255G;L557G;Y616T;	+
1225	191/192	A28T;C57V;K723D;	+
1226		E561P;Y616T;	+
1227		A255G;S675E;	+
1228		N333A;H348N;A362V;N444S;T560G;Y616T;	+
1229		V56L;C57H;F254H;A255G;R373N;Y616T;S675E;	+
1230		F254H;A255G;L557G;S675E;	+
1231		Y616T;S675E;	+
1232		V56L;C57H;E561P;Y616T;S675E;	+
1233		N333A;A362V;N444S;D709E;	+
1234		A28T;Q112D;	+
1235		L557V;W619S;K723D;	+
1236		L557G;Y616T;	+
1237		C57H;F254H;A255G;S675E;	+
1238		C57V;Q112D;Q157S;A160C;L557V;L623T;K723D;	+
1239		C57H;L557G;Y616T;	+
1240		A28T;C57V;L557V;	+
1241		A362V;N444S;D709E;	+
1242		Y616T;	+

1243		L557V;W619S;L623T;	+
1244		Q112D;A160C;W619S;	+
1245		A255G;	+
1246		P249A;A362V;N444S;A466M;D709E;	+
1247		D484T;S704A;	+
1248		F254H;K390Q;Y616T;	+
1249		Q112D;Q157S;L557V;W619S;L623T;	+
1250		D484T;L557V;L623T;	+
1251		Q112D;Q157S;L623T;	+
1252		C57H;A160T;A255G;Y616T;S675E;	+
1253		L557V;L623T;K723D;	+
1254		C57H;A255G;L557G;	+
1255		L623T;	+
1256		D484T;L623T;	+
1257		Q112D;A160C;D484T;L557V;W619S;L623T;K723D;	+
1258		A362V;	+
1259		C57H;F254H;A255G;	+
1260		C57H;R373N;D484T;L557G;S675E;	+
1261		C57H;R373N;L557G;S675E;	+
1262		C57H;A255G;R373N;	+
1263		P249A;R316H;A362V;N444S;A466M;Y616T;	+
1264		L557V;K723D;	+

<sup>1</sup> Уровни увеличенной активности устанавливали относительно эталонного полипептида из SEQ ID № 100, который демонстрировал превращение 52,1±2,2%. Усовершенствования эффективности определяли следующим образом: "+" > чем в 1,2 раза, но меньше чем в 2,0 раза увеличены; "++" > чем 2.

Все публикации, патенты, патентные заявки и другие документы, цитируемые в этой заявке, включены, таким образом, посредством ссылки во всей соевой полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждую отдельную публикацию, патент, патентную заявку или другой документ индивидуально указывали для включения по ссылке для всех целей.

Хотя проиллюстрированы и описаны конкретные варианты осуществления, следует принимать во внимание, что можно выполнять различные изменения, не отступая от сущности и объема изобретения (й).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сконструированная ацилаза пенициллина G, способная к ацилированию инсулина в положении B29, где полипептидная последовательность указанной ацилазы пенициллина G по меньшей мере на 97, 98, 99% или больше идентична SEQ ID № 100 и где сконструированная ацилаза пенициллина G имеет ферментативную активность, составляющую по меньшей мере 1,5 крат ферментативной активности сконструированной ацилазы пенициллина G с последовательностью SEQ ID № 4.

2. Сконструированная ацилаза пенициллина G по п.1, где указанная ацилаза пенициллина G содержит SEQ ID № 100, 24, 40, 56, 82, 108, 110, 154 или 160.

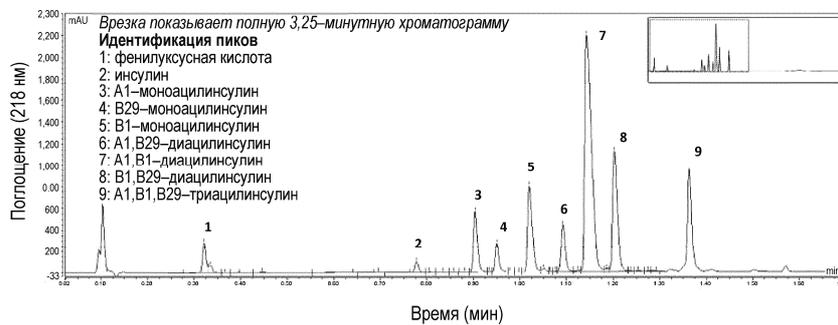
3. Сконструированная ацилаза пенициллина G по п.1 или 2, где указанная ацилаза пенициллина G имеет ферментативную активность, составляющую 2, 5, 10, 20, 25, 50, 75, 100 или более крат ферментативной активности сконструированной ацилазы пенициллина G с последовательностью SEQ ID № 4.

4. Сконструированная ацилаза пенициллина G по любому из пп.1-3, где указанная сконструированная ацилаза пенициллина G содержит гистидиновую метку.

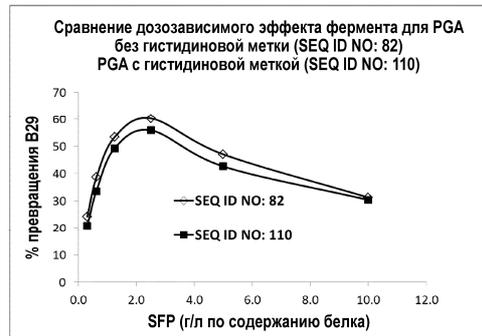
5. Сконструированная ацилаза пенициллина G по п.4, где указанная гистидиновая метка присутствует на С-конце указанной сконструированной ацилазы пенициллина G, необязательно, где указанная ацилаза пенициллина G содержит полипептидную последовательность, выбранную из SEQ ID № 100 и SEQ ID № 110.

6. Сконструированная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая сконструированную ацилазу пенициллина G по любому из пп.1-5.

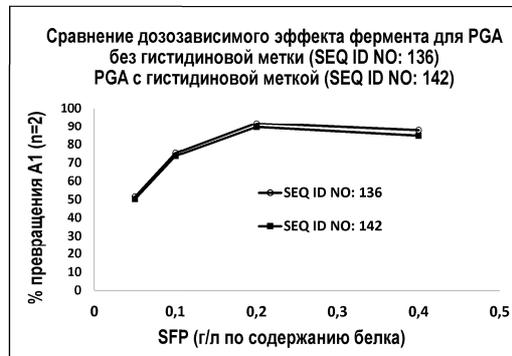
7. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.6.
8. Вектор по п.7, дополнительно содержащий по меньшей мере одну управляющую последовательность.
9. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.7 и/или 8.
10. Способ получения ацилированного инсулина, который включает предоставление сконструированной ацилазы пенициллина G по любому из пп.1-5 и инсулина; экспонирование указанной сконструированной ацилазы пенициллина G и указанного инсулина в таких условиях, что указанная сконструированная ацилаза пенициллина G ацилирует указанный инсулин, тем самым образуя ацилированный инсулин.
11. Способ по п.10, в котором указанное ацилирование проводят в присутствии метилфенилацетата.
12. Способ по п.10 или 11, в котором указанное ацилирование происходит в положении B29 указанного инсулина, или указанное ацилирование происходит в положении A1, B1 и B29 указанного инсулина.
13. Способ по п.10 или 11, в котором указанная сконструированная ацилаза пенициллина G образует более чем 90% более ацилированного инсулина по сравнению с получением ацилированного инсулина с помощью полипептида из SEQ ID № 4.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

